

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**USO DE PROPANEDIOL OU DMSO NA VITRIFICAÇÃO DE  
EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*, CULTIVADOS OU  
NÃO NA PRESENÇA DE FORSKOLIN**

Bruno Valente Sanches  
Orientador: Prof. Dr. Benedito Dias de Oliveira Filho

GOIÂNIA  
2009

BRUNO VALENTE SANCHES

**USO DE PROPANEDIOL OU DMSO NA VITRIFICAÇÃO DE  
EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*, CULTIVADOS OU  
NÃO NA PRESENÇA DE FORSKOLIN**

Dissertação apresentada para obtenção do grau  
de Mestre em Ciência Animal junto à Escola  
de Veterinária da Universidade Federal de Goiás

**Área de Concentração:**

Produção Animal

**Orientador:**

Prof. Dr. Benedito Dias de Oliveira Filho – EV/UFG

**Comitê de Orientação:**

Prof. Dr. Cirano José Ulhoa - UFG

Dr<sup>a</sup> Christina Ramires Ferreira – In Vitro Brasil Ltda

GOIÂNIA

2009

Dedico este trabalho aos meus pais  
Edson e Angela, que sempre  
foram um exemplo a ser seguido

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Edson F. Sanches e Maria Angela V. Sanches, que nunca mediram esforços para me apoiar, ensinaram-me seus valores e foram minha referência de cidadãos íntegros, honestos e trabalhadores.

À minha irmã Karla, ao Luiz Carlos e a minha afilhada Luíza, que me deram força para transpor os obstáculos e foram o porto seguro mais perto nestes anos que resido em Goiás.

À minha querida Cássia, pelo seu carinho, companheirismo, atenção e incrível paciência nos momentos mais difíceis.

Ao médico veterinário José Henrique F. Pontes pelo incentivo ao aprendizado continuado e por me ensinar a trabalhar com profissionalismo.

À médica veterinária Dra. Andrea Basso, pelos seus ensinamentos e contribuição nos experimentos.

À médica veterinária e co-orientadora Dra. Christina Ramires Ferreira pela sua inesgotável disposição em colaborar e por sua grande ajuda no planejamento, execução e revisão do presente trabalho.

À empresa In Vitro Brasil Ltda. pela contrapartida empenhada para a realização do trabalho.

Ao prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda, que sempre foi muito mais que um mestre, ensinando-me não só a gostar da “nobre área” (Reprodução Animal), mas também me ajudando a crescer como ser humano.

À professora Dra. Maria Lucia G. Meirinhos, que desde o início teve participação ativa no acompanhamento dos trabalhos, sempre orientando e sugerindo boas idéias.

Aos amigos e colegas de profissão Rodrigo Untura e Ismael Nonato Jr., pela amizade, ajuda e incentivo.

Aos colegas de trabalho Alessandra de Oliveira, Fabiana Approbato e Valdeci Honória por contribuírem de forma incansável durante a realização dos experimentos.

Aos colegas, professores e funcionários do PPG em Ciencia Anumal-UFG e a todos os funcionários da In Vitro Brasil.

Ao meu orientador professor Dr. Benedito Dias de Oliveira pela atenção, pelo voto de confiança e pelos ensinamentos.

A todos vocês, minha eterna gratidão!

## SUMÁRIO

|                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO .....                                            | 1  |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA .....                                 | 3  |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS .....                                   | 10 |
| 3.1. Obtenção dos oócitos e maturação <i>in vitro</i> .....   | 10 |
| 3.2. Preparo do sêmen e fertilização <i>in vitro</i> .....    | 10 |
| 3.3. Cultivo <i>in vitro</i> (CIV) de embriões.....           | 11 |
| 3.4. Descongelamento dos embriões (experimentos 1 e 2) .....  | 17 |
| 3.5. Coleta dos dados pós vitrificação e descongelamento..... | 18 |
| 3.6. Análise estatística .....                                | 19 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                | 20 |
| 5. CONCLUSÃO.....                                             | 32 |
| REFERÊNCIAS.....                                              | 33 |
| ANEXOS .....                                                  | 39 |

## RESUMO

Os embriões bovinos de raças zebuínas produzidos *in vitro* (PIV) são mais sensíveis ao congelamento, devido, em parte, ao acúmulo de gotas lipídicas no citoplasma das células embrionárias. A criopreservação de embriões é um passo fundamental para a aplicação prática de outras técnicas de embriologia nos animais domésticos. Além disso, o sucesso da criopreservação de embriões Nelore PIV é fundamental para o desenvolvimento da comercialização de material genético nos mercados interno e externo. Neste trabalho, foram conduzidos dois experimentos: no primeiro, o objetivo foi avaliar a taxa de eclosão de embriões bovinos da raça Nelore PIV vitrificados no estágio de blastocisto expandido (Bx) empregando a metodologia CRYOTOP com o uso das soluções Etileno Glicol (EG) + Dimetil Sulfóxido (DMSO) e EG + 1,2 Propanediol (PRO). No segundo experimento, objetivou-se determinar a taxa de eclosão de embriões bovinos da raça Nelore PIV cultivados ou não em meio contendo 10  $\mu$ M do agente lipolítico forskolin, vitrificados no estágio de BX. No experimento 1, a taxa de eclosão dos embriões do grupo não vitrificado (G3) foi de 86,4%, superior ( $P<0,05$ ) aos grupos vitrificados, os quais apresentaram taxas de eclosão de 77,1% e 72,9% nos grupos G1 (EG+PRO) e G2 (EG+DMSO), respectivamente. No experimento 2 observou-se maior viabilidade ( $P<0,05$ ) do G3-F (grupo não vitrificado; 85,4%) em relação ao G1-F (cultivo com SOF controle; 63,3%) e ao G2-F (cultivo com forskolin; 70,5%). Entre os grupos vitrificados, os embriões cultivados com forskolin obtiveram taxa de eclosão superior ao grupo não tratado ( $P<0,05$ ). Sendo assim, conclui-se que as soluções de EG+PRO e EG+DMSO apresentaram resultados semelhantes na vitrificação de embriões PIV de bovinos e o uso do agente lipolítico forskolin no cultivo de embriões PIV de bovinos da raça Nelore pode melhorar a criotolerância dos embriões.

Palavras-chave: Cryotop, criopreservação, embrião, vitrificação

## ABSTRACT

Considering the *in vitro* method of embryo production, field results have shown a lower resistance to cryopreservation for *B. indicus*, when compared to *B. taurus* embryos. A possible explanation for this is a great concentration of lipid droplets in the cytoplasm of cells from *B. indicus* embryos. The objective of this study was to compare two cryoprotectants (Propanediol and DMSO) to vitrification and evaluate the effect of adding 10 $\mu$ M Forskolin to the SOF medium for embryo culture prior to cryopreservation. For all the experiments, ovaries from slaughtered Nelore *Bos indicus* donors were recovered and maintained at 30-35°C in NaCl solution until recovery of the *cumulus-oocyte* complexes. Embryos submitted to vitrification were expanded blastocysts at day seven of *in vitro* culture. In the first experiment embryos were first incubated in 10% Ethylene Glycol (EG) plus 10% DMSO dissolved in holding medium (TCM-Hepes with 20% calf serum) for 1 min and then transferred to droplet of 20% EG plus 20% DMSO in holding medium and 0.5M sucrose for 20 seconds before immersing in liquid nitrogen (n = 107; group EG+DMSO). For the group EG+Propanediol (EG+PRO; n = 96) blastocysts were placed in 10% EG plus 10% PRO in holding medium for 1 min, and then transferred to a droplet of 20% EG plus 20% PRO in holding medium and 0.5M sucrose for 20 seconds before immersing in liquid nitrogen. Both treatments were performed using the Cryotop system. Results were compared with embryos (n = 118) not submitted to cryopreservation. The evaluation was done by the hatching rate of blastocysts at Day 9, being higher (86.4%) for embryos not cryopreserved, when comparing to 77.1% for group EG+PRO and 72.9% for group EG+DMSO (P<0.05). In the second experiment, day 5 embryos obtained *in vitro* from Nelore donors were cultured using SOF medium with 10 $\mu$ M Forskolin (n = 112) or not (control; n = 101), being all submitted to cryopreservation using Cryotop and the same vitrification method for group EG+DMSO. Results were compared with embryos cultured with SOF medium and not submitted to cryopreservation (n = 96). The evaluation was performed by considering hatching rate at Day 9, being higher - 85.4% - for not cryopreserved, when compared with 63.3% for control and 70.5% for Forskolin group (P<0.05). Considering embryos submitted to cryopreservation, the hatching rate was higher (P<0.05) for Forskolin group.

## 1. INTRODUÇÃO

A pecuária moderna exige o manejo mais eficiente dos recursos disponíveis. A necessidade de contribuir não só para a sobrevivência do homem, mas, principalmente, a importância de se deixar às gerações futuras um meio ambiente saudável e que seja capaz de produzir maior quantidade de alimentos, imporá, cada vez mais, o uso racional dos recursos ambientais.

O agronegócio é responsável por 33% do PIB brasileiro, emprega quase 40% da mão de obra disponível e responde por 42% das exportações totais. Sem qualquer dúvida, é o setor mais pujante da economia brasileira, sendo que a pecuária representa algo em torno de 12% deste montante, atingindo um valor de mais de R\$ 75 bilhões (MAPA, 2007).

Segundo as estimativas do IBGE (2006), referentes ao ano de 2005, o Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças, constituído basicamente de raças zebuínas (*Bos taurus indicus*).

A pecuária, cada vez mais, deverá se tornar uma atividade empresarial. O aumento da competitividade, até mesmo com outros produtos agropecuários, como por exemplo, a cultura da cana-de-açúcar, com reflexos em incrementos de custo, resultará em diminuição de lucro e aumento de risco.

Nessa perspectiva, há necessidade de melhorar o nível gerencial do empreendimento pecuário. É também imprescindível que os produtores trabalhem por crescentes índices de produtividade, por meio do emprego de técnicas que permitam aumentar a eficiência de todos os sistemas de produção, focando principalmente o manejo nutricional, especialmente no que se refere à qualidade das pastagens, assim como na promoção de ganho genético dos rebanhos.

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma ferramenta eficaz para otimizar o processo de seleção e multiplicação de animais geneticamente superiores.

A PIV de embriões bovinos apresenta como vantagens favorecer a determinação e controle do sexo dos produtos, elevar a eficiência dos sistemas de produção impondo rapidez aos programas de cruzamento, facilitar a exportação de material genético da fêmea, maximizar a utilização do sêmen



congelado oriundo de animais de alto valor genético, além de permitir o desenvolvimento de outras biotécnicas reprodutivas.

Por isso, esta técnica tem se mostrado uma ferramenta em franca ascensão, sendo cada vez mais divulgada em nível nacional. Boa parte das instituições dedicadas à pesquisa utiliza-a com sucesso, e esta biotecnologia é uma realidade consolidada no país.

Recentemente a iniciativa privada vislumbrou a perspectiva favorável de disponibilizar a produção *in vitro* de embriões aos pecuaristas. Desta forma, a PIV vem sendo exercida por um número crescente de profissionais, com resultados promissores (VIANA & CAMARGO, 2007).

Assim, uma adequada e eficiente metodologia de criopreservação de oócitos e embriões PIV torna-se fundamental na proteção e manutenção de espécies e populações animais, além de possibilitar o comércio internacional destes oócitos e embriões. Com isso, seria evitado o transporte de animais vivos, com seus riscos e barreiras sanitárias.

Em nível nacional, existe um forte interesse econômico na criopreservação de embriões PIV, visto que os custos do processo seriam diminuídos, com melhor aproveitamento das receptoras e a criação de bancos de embriões congelados, que poderiam ser comercializados futuramente, ao invés de serem descartados.

Neste trabalho, foram realizados dois experimentos. No primeiro, o objetivo foi avaliar a taxa de eclosão de embriões PIV vitrificados no estágio de blastocisto expandido (Bx), empregando a metodologia CRYOTOP com o uso das soluções Etileno Glicol (EG) + Dimetil Sulfóxido (DMSO) e EG + 1,2 Propanediol (PRO). A hipótese testada neste experimento foi de que a baixa toxicidade do Propanediol possa melhorar criotolerância dos embriões, aumentando assim a taxa de eclosão pós-congelação e reaquecimento.

No segundo experimento, o objetivo foi determinar a taxa de eclosão de embriões PIV cultivados em meio contendo o agente lipolítico forskolin, vitrificados no estágio de blastocisto expandido (Bx). A hipótese deste experimento foi de que a capacidade de sobrevivência à criopreservação pode ser melhorada após parcial remoção lipídica promovida pelo estímulo à lipólise intracelular.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A produção de embriões bovinos PIV em larga escala depende da alta porcentagem de produção de embriões de boa qualidade.

Nos últimos anos, a maior parte dos esforços dos grupos de pesquisa foi direcionada para melhorar a taxa de sobrevivência de embriões PIV após a criopreservação, e a maioria destas pesquisas concentrou-se em bovinos (RIZOS et al., 2003; VAJTA et al., 1998; LEIBO & LOSKUTOFF, 1993).

Pode-se observar na Figura 1, que o número de embriões produzidos no Brasil por superovulação (TE) tem caído significativamente nos últimos anos, ao passo que a produção de embriões pela técnica de fertilização *in vitro* (FIV) cresceu no mesmo período (VIANA & CAMARGO, 2007).

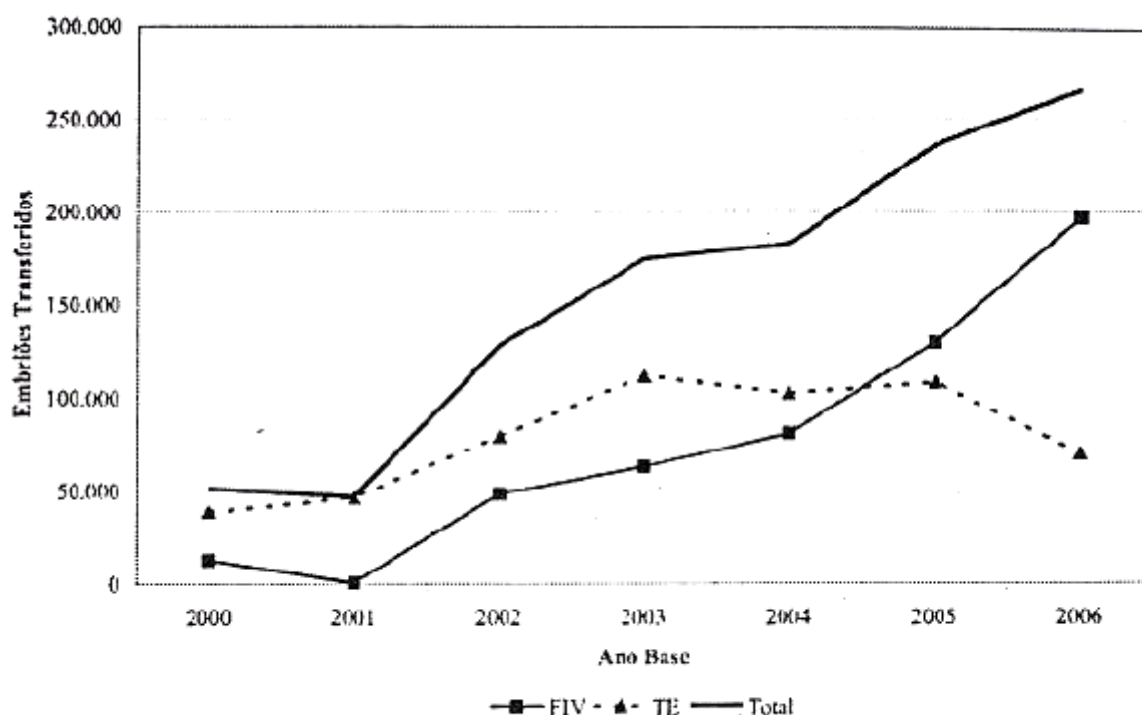


FIGURA 1- Transferência de embriões produzidos por superovulação comercial (TE) ou fertilização *in vitro* (FIV) no período 2000-2006 no Brasil (VIANA & CAMARGO, 2007).

De acordo com os dados divulgados pelo Data Retrieval Committee da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), referentes ao ano de 2005, dos 265.000 embriões produzidos *in vitro* no mundo, a América do Sul, particularmente o Brasil, respondeu por cerca de 50% das transferências registradas, sendo a quase totalidade realizada a fresco (THIBIER, 2006). Este mesmo autor relatou que a única região onde a TE apresentou evolução semelhante à do Brasil foi a Ásia, particularmente na República Popular da China. Porém, na China há o predomínio de embriões congelados e importados.

Segundo VIANA & CAMARGO (2007), a baixa taxa de prenhez pós-descongelação é a principal justificativa pelo inexpressivo número de embriões PIV congelados no Brasil e no mundo (Tabela 1). Somente 3,7% dos embriões PIV foram congelados no ano de 2006. Já na TE, este percentual ficou acima de 10%.

Desta forma, uma adequada tecnologia de criopreservação para os embriões excedentes poderia maximizar a utilização da técnica de PIV de embriões bovinos, possibilitando ao Brasil despontar como um grande produtor e exportador de embriões de origem zebuína (WERLICH et al. 2006)

TABELA 1 – Produção, transferência a fresco e criopreservação de embriões bovinos no Brasil em 2006.

|       | TE        |              |               | FIV        |              |              |
|-------|-----------|--------------|---------------|------------|--------------|--------------|
|       | Coletados | Transferidos | Congelados    | Produzidos | Transferidos | Congelados   |
| Leite | 12.052    | 8.652        | 2600 (23,1%)  | 14.290     | 13.182       | 1.016 (7,2%) |
| Corte | 69.062    | 61.234       | 6.954 (10,2%) | 190.043    | 183.481      | 6.562 (3,5%) |
| Total | 81.114    | 69.886       | 9.554 (12,9%) | 204.333    | 196.663      | 7.578 (3,7%) |

Fonte: VIANA & CAMARGO (2007)

Novos métodos de criopreservação, como por exemplo, a vitrificação, têm sido propostos para simplificar a transferência de embriões, constituindo-se em alternativas rápidas e econômicas para a congelação destes embriões (CAMPOS-CHILLON et al., 2006; SOMMERFELD & NIEMANN, 1999).

A transferência convencional de embriões em bovinos cresceu em parte devido a criopreservação utilizando a técnica de congelação lenta com

Etileno Glicol (EG) para transferência direta (LEIBO, 1984; VOELKEL & HU, 1992).

No protocolo para congelação lenta, os embriões são colocados em uma solução de 10 a 11% de EG (aproximadamente 1,5 M) e a temperatura começa a decrescer lentamente. Inicia-se a formação de cristais de gelo na solução e, à medida que os cristais de gelo aumentam, a água da solução é transformada do estado líquido para o sólido. Isto aumenta a concentração do soluto, promovendo a desidratação das células embrionárias. Quanto menor a temperatura, mais água da solução é transformada em cristal de gelo. Porém, a velocidade com que a água deixa o interior da célula embrionária também é menor conforme diminui a temperatura.

Portanto, o sucesso da congelação lenta depende do perfeito ponto de equilíbrio entre a taxa de desidratação da célula e a velocidade com que esta água é transformada em cristal de gelo (VISINTIN et al., 2002).

A maioria das estratégias de criopreservação é baseada em dois principais fatores: crioprotetores e velocidades de congelação-descongelação. Sendo assim, as metodologias mais utilizadas são: a congelação lenta e a vitrificação (VAJTA & KUWAYAMA, 2006).

Entretanto, os embriões PIV são mais sensíveis à criopreservação que os produzidos *in vivo* (IMAI et al., 2002; POLLARD & LEIBO, 1994) e a vitrificação é o método mais eficaz para congelar estes embriões (VAJTA et al., 1998), pois o embrião é exposto a altas concentrações de crioprotetor(es), por curtos períodos de tempo.

Na vitrificação, a alta osmolaridade da solução de vitrificação faz com que a maior parte da água presente dentro das células embrionárias saia rapidamente, deixando-as suficientemente desidratadas e permeáveis ao crioprotetor, suportando a imersão direta no nitrogênio líquido (-196 °C). A rápida imersão no nitrogênio líquido imediatamente solidifica as células, fazendo com que a água intracelular remanescente não tenha tempo de formar cristais de gelo (VAJTA et al., 1998).

Uma das maneiras de se aumentar a taxa de resfriamento, ou seja, fazer com que o embrião passe mais rapidamente pela zona crítica de temperatura, é usar o menor volume possível de meio crioprotetor circundando o

embrião, estabelecendo um contato direto entre a solução e o nitrogênio líquido (VAJTA & NAGY, 2006).

Com esse objetivo, inúmeras ferramentas têm sido desenvolvidas baseadas na “open-pulled straw” (OPS) descrita por VAJTA et al. (1998), que reduz o diâmetro de uma palheta convencional de 0,25 mL para diminuir o volume de solução envolvendo o embrião e, portanto, aumentar a velocidade de congelação.

Ao comparar algumas dessas ferramentas, KUWAYAMA (2007) relatou que a taxa de congelação em uma palheta convencional de 0,25 mL contendo 25 µL de solução de vitrificação mergulhada diretamente no nitrogênio líquido foi de 4.460°C/min, em uma OPS com 1,5 µL de solução de vitrificação foi de 16.340°C/min e em um CRYOTOP com 0,1 µL de solução de vitrificação foi de 22.800°C/min (Quadro 1).

QUADRO 1 – Comparação da velocidade de congelação entre as diferentes ferramentas de vitrificação.

| <b>Ferramenta</b>  | <b>Volume de Crioprotetor</b> | <b>Velocidade de Congelamento</b> |
|--------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| Palheta de 0,25 mL | 25 µL                         | 4.460°C/min                       |
| OPS                | 1,5 µL                        | 16.340°C/min                      |
| Cryotop            | 0,1 µL                        | 22.800°C/min                      |

Fonte: KUWAYAMA, 2007

Todos os embriões sofrem consideráveis danos morfológicos e funcionais durante a criopreservação (MENEZO, 2004). A extensão destas injúrias dependerá de vários fatores como o tamanho e a forma das células do embrião, a permeabilidade das membranas, além da qualidade e sensibilidade dos embriões (VAJTA & KUWAYAMA, 2006).

Outro ponto fundamental a ser considerado é a toxicidade dos agentes crioprotetores. CESARO et al. (2007) demonstraram que, na vitrificação de oócitos bovinos, a associação dos crioprotetores EG e DMSO foi mais tóxica que a associação de EG e PRO. Porém, os mesmos autores observaram que, em baixas concentrações, o PRO não tem grande eficácia como agente crioprotetor,

sugerindo que novos protocolos com diferentes concentrações necessitam ser testados, tanto para oócitos como para embriões.

No entanto, os embriões apresentam uma surpreendente capacidade de reparação destes danos (total ou parcialmente) e, em alguns casos, continuam seu desenvolvimento normalmente. A proposta de vitrificação de embriões é justamente diminuir os danos causados durante a congelação e ajudar as células a se recuperarem (VAJTA et al., 1998).

As diferenças entre embriões PIV e embriões *in vivo* têm sido estudadas por vários autores (THOMPSON, 1997; GREVE et al., 1993).

BARCELÓ-FIMBRES & SEIDEL JR., (2007) demonstraram que a composição do meio de cultivo, principalmente o soro fetal bovino (SFB), exerce influência na morfologia e aparência citoplasmática do embrião produzido *in vitro*, o qual aparenta ser mais escuro.

VISINTIN et al. (2002) relataram diferenças morfológicas entre os embriões taurinos e zebuínos produzidos *in vivo*, como por exemplo, a maior quantidade de lipídeos intracelular nos embriões *Bos taurus taurus*. Estas peculiaridades talvez expliquem o fato de haver sensíveis diferenças entre os resultados de sobrevivência embrionária pós congelação-descongelação quando comparadas as duas espécies.

Embriões PIV de *Bos taurus taurus* apresentam maiores taxas de sobrevivência quando comparados embriões *Bos taurus indicus*, criopreservados pelo método convencional (VARAGO, 2006). Esta redução na criotolerância de embriões PIV tem sido relacionada à presença de grande quantidade de gotas lipídicas encontradas no citoplasma desses embriões (ABE et al., 2002a; LEIBO & LOSKUTOFF, 1993)

Em trabalho com embriões PIV de vacas Nelore, congelados pela técnica de vitrificação, VARAGO et al. (2006) relataram taxas de 44,1% e 23,5% de re-expansão e eclosão, respectivamente. Já outros autores, trabalhando com embriões *Bos taurus taurus*, obtiveram taxas de re-expansão e eclosão bem maiores, 96,1% e 49,6%; 94,8% e 75,9%, respectivamente (MEZZALIRA et al., 2004; VIEIRA et al., 2006).

Em experimentos de criopreservação de embriões, a taxa de re-expansão da blastocle e posterior eclosão do embrião são os parâmetros mais

utilizados para avaliar a sobrevivência embrionária *in vitro* pós descongelação (VARAGO et al., 2006; DIEZ et al., 2001; VAJTA et al., 1998).

Durante o processo de congelação de um blastocisto, ocorre desidratação das células e diminuição considerável do diâmetro da blastocèle. Ao serem reaquecidos e mantidos em cultivo, são considerados sobreviventes aqueles embriões capazes de re-expandir e manter a blastocèle após 24 horas e também eclodir (sair da zona pelúcida) após 48 horas de cultivo.

O método convencional de congelação lenta é considerado inadequado para a criopreservação de embriões PIV (KAIDI et al., 2001; POLLARD & LEIBO, 1994), principalmente em função do excessivo tempo de exposição à faixa térmica correspondente à solidificação dos lipídeos (ZENON et al., 1999).

A quantidade de lipídeo intracelular pode ser influenciada pelo meio de cultivo dos oócitos e embriões. A presença de soro fetal bovino (SFB) no meio de cultivo é tido como responsável pelo excessivo acúmulo de lipídeos, seja pelo maior aporte de lipídeos fornecido pelo meio, seja por distúrbios no metabolismo mitocondrial (ABE et al., 2002a).

O conceito de que lipídeos interferem negativamente no sucesso da criopreservação de embriões foi inicialmente demonstrado em suínos (NAGASHIMA et al., 1994) e posteriormente em bovinos (DIEZ et al., 2001), onde se melhorou a congelabilidade dos embriões promovendo a diminuição do conteúdo lipídico por remoção micro-cirúrgica das gotas citoplasmáticas de lipídeo. Nestes trabalhos, os autores centrifugaram os embriões em altas rotações para reunir as gotas lipídicas em um dos pólos do citoplasma e removê-las com a ajuda de uma micropipeta.

Outra maneira de diminuir o acúmulo de lipídeos citoplasmáticos envolve a remoção parcial dos lipídeos por estímulo da lipólise química no citoplasma celular. Essa técnica foi descrita em suínos (MEN et al., 2006).

A maior parte do lipídeo intracelular dos oócitos e embriões são compostos por triacilgliceróis (TAG) (DIEZ et al., 2001).

A principal função dos TAG armazenados no citoplasma é servir como fonte de energia. O metabolismo intracelular dos lipídeos é regulado por hormônios como as catecolaminas, glucagon e insulina. Porém, algumas drogas como norepinefrina, isoproterenol e forskolin ( $7\beta$ -acetoxi-8,13-epoxi-1 $\alpha$ , 6 $\beta$ , 9 $\alpha$ -

trihidroxi-labd-14-ene-11-one) também são capazes de estimular a lipólise dos TAG. Em condições fisiológicas normais, a lipase ativada catalisa a hidrólise dos TAG em glicerol e ácidos graxos livres. (HOLM, 2003).

O forskolin é uma substância derivada da planta indiana *Coleus forskohlii* e MEN et al. (2006) observaram o aumento da atividade lipolítica em blastocistos de suínos, cultivados na presença de forskolin, mensurando a produção de glicerol no meio de cultivo dos embriões. Estes autores demonstraram que os embriões cultivados com forskolin apresentaram maiores taxas de re-expansão da blastocele, após vitrificados e descongelados, em comparação com o grupo não tratado.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Exceto quando mencionado, todos os reagentes foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, EUA).

#### 3.1. Obtenção dos oócitos e maturação *in vitro*

A produção *in vitro* dos embriões utilizados nos experimentos 1 e 2 estendeu-se de outubro de 2008 a janeiro de 2009, sendo necessárias oito repetições.

No total, 225 ovários de vacas da raça Nelore abatidas no Frigorífico Frigo Forte, distante 25 minutos do laboratório, foram transportados ao laboratório em solução salina a 25-30°C. Os folículos visualizados foram aspirados utilizando uma agulha 19G acoplada a uma seringa de 20 mL. Recuperou-se um total de 1537 complexos *cumulus*-oócitos (COCs) com pelo menos três camadas de células e citoplasma homogêneo, classificados como grau 1 (LEIBFRIED & FIRST, 1979). Os oócitos foram lavados em TCM-199 (GIBCO BRL; Grand Island, NY, EUA) tamponado com Hepes, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO BRL; Grand Island, NY, EUA), 0,20 mM de piruvato de sódio e 83,4 µg/mL de amicacina (Instituto Biochimico, Rio de Janeiro, Brasil) e mantidos durante 24 h em incubadora (38,5°C com 5% CO<sub>2</sub> em ar e umidade máxima), sob óleo mineral em gotas de 100 µL de meio TCM-199 suplementado com 10% de SFB, um µg/mL FSH (Folltropin™, Bioniche Animal Health, Belleville, Ont., Canadá), 50 µg/mL hCG (Profasi™, Serono, São Paulo, Brasil) e estradiol (1 µg/mL), 0,20mM de piruvato de sódio e 83,4 µg/mL de amicacina.

#### 3.2. Preparo do sêmen e fertilização *in vitro* (FIV)

A FIV foi realizada com sêmen convencional de um único touro Nelore, previamente testado para a PIV, descongelado (35°C por 30 seg) e lavado duas vezes por centrifugação (600 rpm por 5 min) em 2 mL de meio TALP suplementado com 0,2 mM de piruvato e 83,4 g/mL de amicacina, tamponado com 10 mM de Hepes. A concentração do sêmen foi ajustada para 25x10<sup>6</sup>

espermatozoides (sptz) móveis/mL. O volume de quatro microlitros de sêmen ( $10^5$  sptz) foi adicionado em cada gota de 90  $\mu$ L de TALP-FIV (TALP suplementado com 10 g/mL de heparina, 18 M de penicilamina, 10 M de hipotaurina e 8 M de epinefrina) sob óleo mineral. Posteriormente, foram adicionados 25 a 30 oócitos em cada gota.

O período de incubação foi de 20-24 h em incubadora a 38,5°C com 5% CO<sub>2</sub> em ar e umidade máxima.

### 3.3. Cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões

Os prováveis zigotos foram co-cultivados (grupos de 25) na incubadora (38,5°C com 5% CO<sub>2</sub> em ar e umidade máxima) com células da granulosa em gotas de 100  $\mu$ L de SOF (WELLS et al., 1999) 2,5% SFB + 0,5% de albumina sérica bovina (BSA) sob óleo mineral. No dia três (D3) e no dia cinco (D5) do CIV foi realizada a substituição de 50% do volume de meio das gotas por meio novo (“feeding”). O meio de cultivo do “feeding” foi o mesmo meio do início do cultivo.

A taxa de clivagem foi avaliada no terceiro dia de cultivo (D3).

## EXPERIMENTO 1

### Determinação das taxas de eclosão de embriões vitrificados utilizando as soluções de vitrificação Etileno Glicol + Dimetil Sulfóxido e Etileno Glicol + Propanediol.

Ao final do período de cultivo (D7 do cultivo), os blastocistos expandidos e classificados como grau 1, foram aleatoriamente divididos entre os tratamentos, conforme descrito a seguir:

**Grupo 1 (G1):** 96 embriões foram expostos a 1 min na solução de equilíbrio (SE= 10% de EG + 10% de PRO) e, em seguida, a 20 seg na solução de vitrificação (SV= 20% de EG + 20% de PRO). Durante os 20 seg de exposição a solução de vitrificação, os embriões foram alojados no **CRYOTOP** (três a cinco embriões) e imediatamente colocados no nitrogênio líquido.

**Grupo 2 (G2):** 107 embriões foram expostos a 1 min na solução de equilíbrio (SE= 10% de EG + 10% de DMSO) e, em seguida, a 20 seg na solução

de vitrificação (SV= **20%** de EG + **20%** de DMSO) enquanto os embriões foram alojados na **CRYOTOP** (três a cinco embriões) e imediatamente colocados no nitrogênio líquido.

**Grupo 3 (G3) – controle:** 118 embriões aleatoriamente selecionados não foram vitrificados e foram avaliados até o dia 9 do cultivo para observação da taxa de eclosão.

QUADRO 2 – Detalhamento dos grupos do Experimento 1.

| Metodologia | Grupo | Crioprotetor     | Concentração | Tempo  |
|-------------|-------|------------------|--------------|--------|
| Cryotop     | G1    | EG + Propanediol | 10% + 20%    | 1'20'' |
|             | G2    | EG + DMSO        | 10% + 20%    |        |
| Controle    | G3    | -                | -            | -      |

A vitrificação dos embriões foi baseada na técnica CRYOTOP descrita previamente por KUWAYAMA et al. (2005). Essa metodologia utiliza o conceito de mínimo volume, onde os embriões são acondicionados em um filme plástico muito fino (Figura 3), acoplado a uma haste de plástico utilizada para facilitar o manuseio.

As soluções utilizadas na vitrificação foram preparadas em placa de quatro poços (NUNC S/A, Roskilde, Dinamarca) (Figura 4).

O meio TCM-Hepes (TCM-199 + 25 mM Hepes + 10% de SFB) serviu de base na preparação das soluções contendo PRO ou DMSO, sendo que estes foram adicionados apenas no momento do uso. Nos dois grupos, a solução de equilíbrio (SE) foi suplementada com 20% de SFB e à solução de vitrificação (SV) foi acrescentado 0,5 M de sacarose.

Primeiramente os embriões foram colocados no meio de manutenção (TCM-Hepes), de onde eram retirados (três a cinco de cada vez) e passados para o poço 1, contendo a SE. Nesta solução os embriões permaneceram por um minuto e logo após eram transferidos para o poço 2, contendo a SV, onde ficaram expostos durante 20 segundos (Figura 3).

Assim, imediatamente os embriões foram pipetados e alojados sobre o filme plástico na ponta da haste (CRYOTOP) e a amostra foi imersa no nitrogênio líquido.

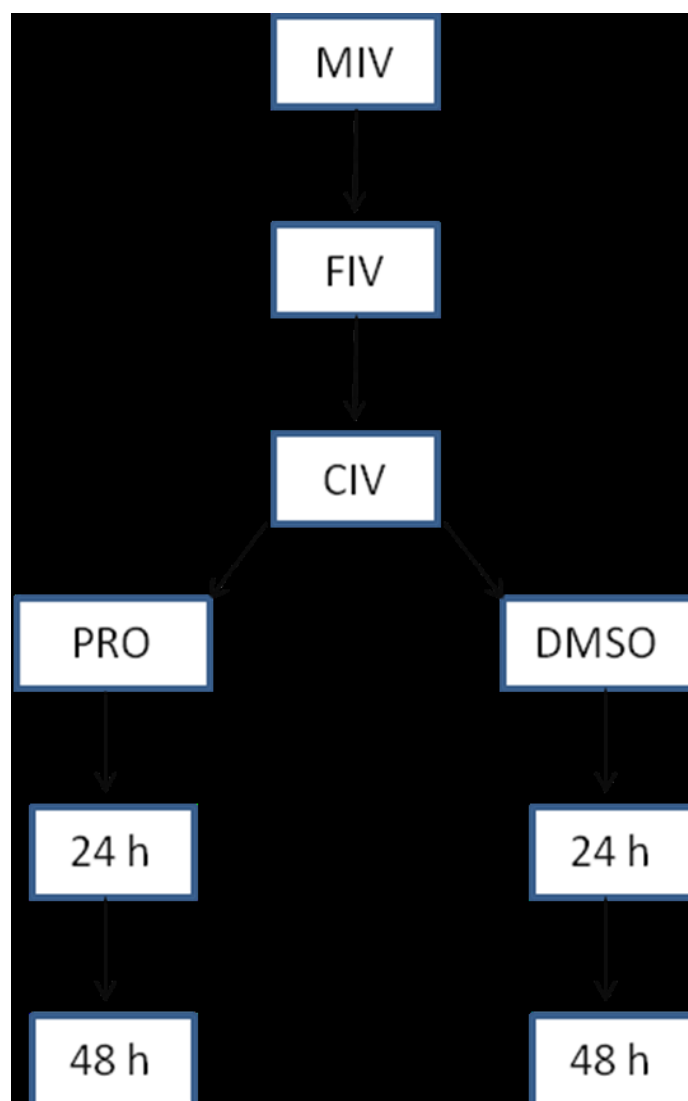


FIGURA 2 – Fluxograma dos grupos do Experimento 1

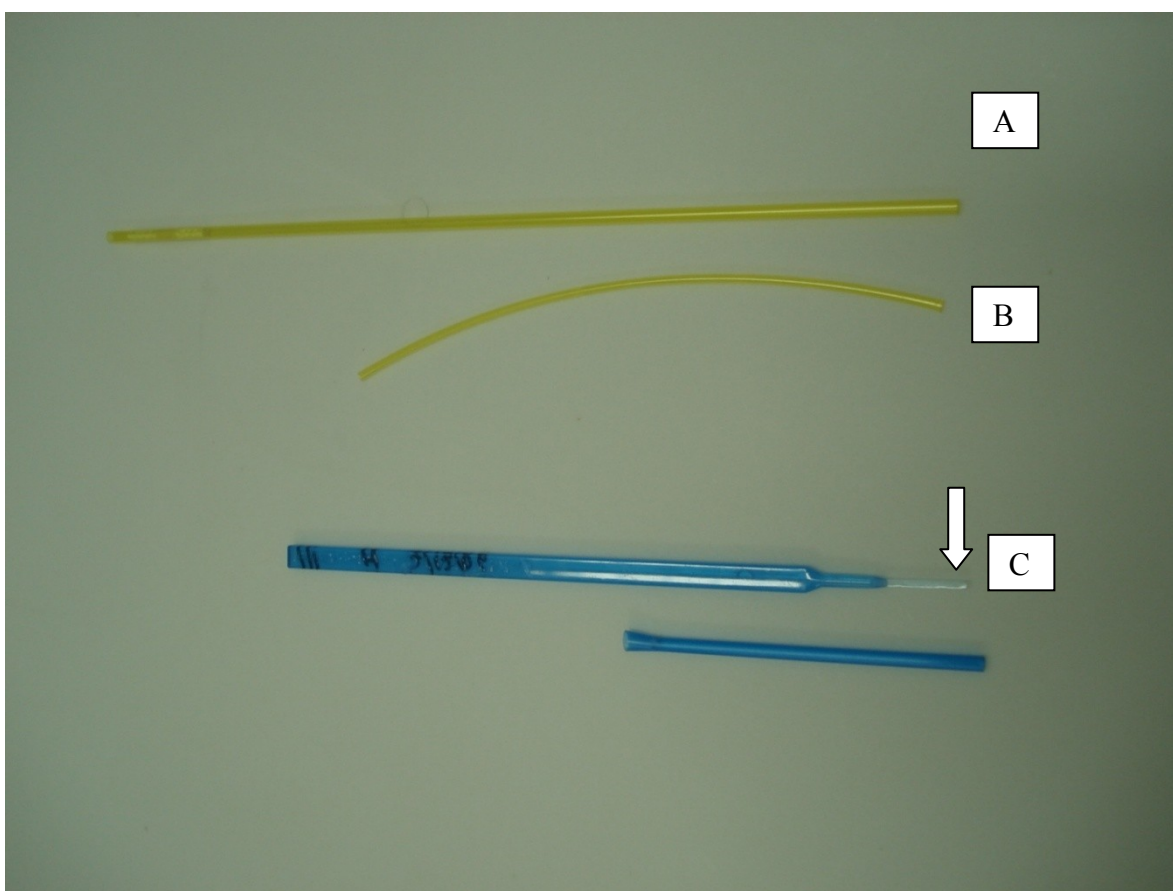


FIGURA 3 – Diferentes ferramentas para criopreservação de embriões e oócitos. Em (A) palheta de 0,25 mL, em (B) OPS e em (C) Cryotop. A seta indica local de acondicionamento dos embriões na extremidade do Cryotop.

## EXPERIMENTO 2

**Determinação das taxas de eclosão de embriões PIV cultivados em meio contendo ou não o agente lipolítico Forskolin, vitrificados no estágio de blastocisto expandido (Bx)**

Para a produção dos embriões utilizados no experimento 2, as etapas de obtenção dos ovários, maturação *in vitro* e fertilização *in vitro* dos oócitos foram idênticas às descritas no experimento 1.

No quinto dia do cultivo *in vitro* (D5), embriões 8-16 células foram aleatoriamente divididos entre os dois grupos experimentais descritos a seguir:

**Grupo 1 (G1-SOF):** 101 embriões cultivados com meio SOF Controle foram expostos a **1 min** na solução de equilíbrio (SE= **10%** de EG + **10%** de DMSO) e, em seguida, a **20 seg** na solução de vitrificação (SV= **20%** de EG + **20%** de DMSO). Durante os 20 seg de exposição à solução de vitrificação, os embriões foram alojados no **CRYOTOP** (três a cinco embriões) e imediatamente colocados no nitrogênio líquido.

**Grupo 2 Forskolin (G2-F):** 112 embriões cultivados em meio SOF acrescido de 10  $\mu$ M de forskolin foram expostos a **1 min** na solução de equilíbrio (SE= **10%** de EG + **10%** de DMSO) e, em seguida, a **20 seg** na solução de vitrificação (SV= **20%** de EG + **20%** de DMSO) enquanto os embriões foram alojados na **CRYOTOP** (três a cinco embriões) e imediatamente colocados no nitrogênio líquido.

**Grupo 3 (G3-SOF) – controle não vitrificado:** 96 embriões aleatoriamente selecionados não foram vitrificados e foram avaliados até o dia 9 do cultivo para observação da taxa de eclosão.

QUADRO 3 – Detalhamento dos grupos do Experimento 2.

| Metodologia | Grupo  | Cultivo   | Crioprotetor | Concentração | Tempo  |
|-------------|--------|-----------|--------------|--------------|--------|
| Cryotop     | G1-SOF | SOF       | EG +DMSO     | 10% + 20%    | 1'20'' |
|             | G2-F   | Forskolin | EG + DMSO    | 10% + 20%    |        |
| Controle    | G3-SOF | SOF       | -            | -            | -      |

No G1-SOF os embriões receberam o “feeding” com meio SOF igual ao do início do cultivo e serviram como grupo controle vitrificado. No G2-F os embriões receberam o “feeding” com o meio SOF acrescido de 10  $\mu$ M de forskolin. Já no G3-SOF, os embriões receberam o “feeding” com meio SOF igual ao do início do cultivo e serviram como grupo controle não vitrificado.

No experimento 2, todos os embriões (G1-SOF e G2-F) foram vitrificados utilizando a ferramenta CRYOTOP e o mesmo protocolo de vitrificação descrito no experimento 1, porém neste caso foi utilizada apenas a solução de EG + DMSO como solução de vitrificação (Figura 3).

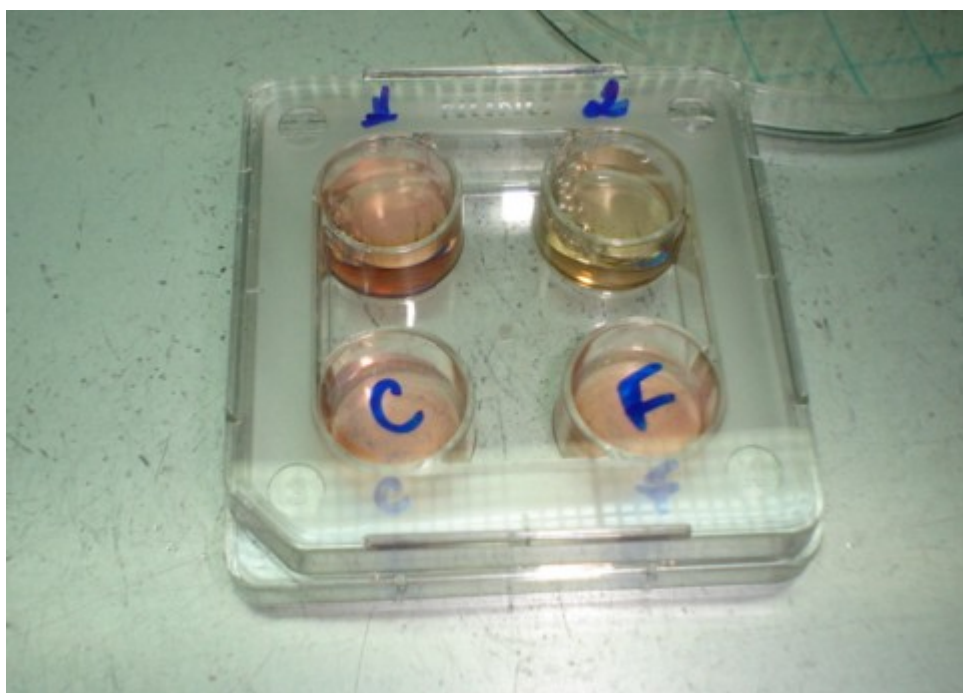


FIGURA 4 – Placa de vitrificação. Em (1) SE= **10%** de EG + **10%** de DMSO; em (2) SV= **20%** de EG + **20%** de DMSO; em (C) solução de manutenção contendo os embriões do G1-SOF; em (F) solução de manutenção contendo os embriões do G2-F.

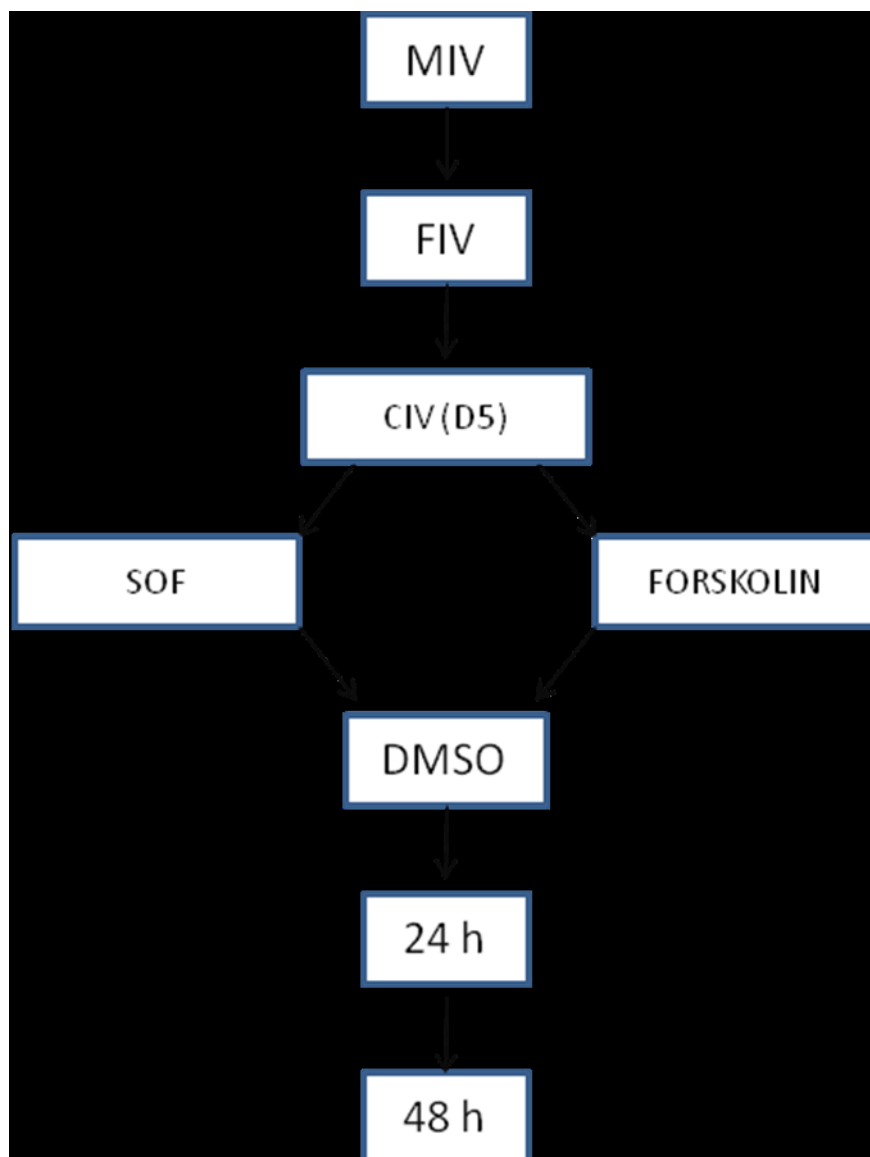


FIGURA 5 – Fluxograma dos grupos do Experimento 2

### 3.4. Descongelamento dos embriões (experimentos 1 e 2)

Para o reaquecimento dos embriões (experimentos 1 e 2), os CRYOTOPs contendo os embriões foram expostos ao ar por quatro segundos e em seguida mergulhados na solução de reaquecimento (TCM-Hepes + sacarose) com temperatura aproximada de 35°C. A remoção da solução de vitrificação foi feita com dois períodos de exposição (5 minutos cada) em gradientes de 0,3 e 0,15 M de sacarose, respectivamente, antes de passarem para o meio de manutenção TCM-Hepes (VIEIRA et al., 2002; MEZZALIRA et al., 2004).



### 3.5. Coleta dos dados pós vitrificação e descongelção

No mínimo duas horas após a vitrificação dos embriões, os mesmos foram descongelados conforme protocolo descrito acima e cultivados novamente na incubadora (38,5°C com 5% CO<sub>2</sub> em ar e umidade máxima) em gotas de 100µL de SOF com 2,5% SFB + 0,5% BSA sob óleo mineral.

As taxas de re-expansão da blastocèle as taxas de eclosão dos grupos experimentais foram avaliadas 24 e 48 horas após o descongelamento respectivamente (Figuras 6, 11, 12, 13 e 14).

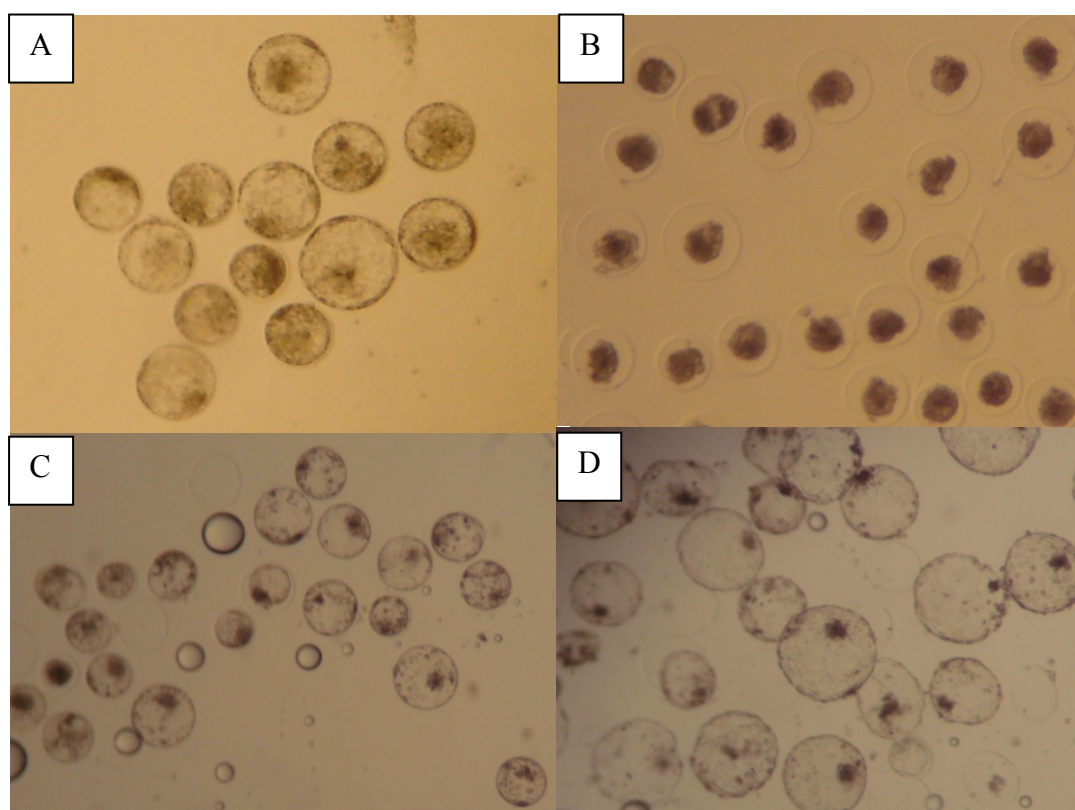


FIGURA 6 – Diferentes etapas do experimento 1. Em (A) blastocistos do grupo G1 no D7 do cultivo antes de serem congelados; em (B) embriões imediatamente após a descongelção (0 hora), podendo-se observar a grande retração dos embriões provocada pela desidratação ocorrida durante a congelação; em (C) embriões 24 hs de CIV pós-descongelamento (a maioria dos embriões já re-expandiram a blastocèle; em (D) Blastocistos eclodidos 48 hs de CIV pós-descongelamento.

### **3.6. Análise estatística**

As variáveis (taxa de re-expansão e taxa de eclosão) foram analisadas por qui-quadrado e quando  $P < 0,05$ , os tratamentos foram comparados por análise de resíduos, utilizando o programa SAS System (SAS, 2000). A probabilidade  $P < 0,05$  foi considerada significativa.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados de desenvolvimento embrionário (total de 630 embriões) estão mostrados na Figura 7. De acordo com a linha de tendência (linha pontilhada nos gráficos), a taxa de clivagem foi constante no período dos experimentos. Ao contrário, a porcentagem de desenvolvimento a blastocisto apresentou-se bastante variável. Durante este período houve uma repetição com baixa produção de blastocistos (~20%), fazendo com que a linha de tendência se direcionasse para baixo. Já a taxa de eclosão apresentou tendência de aumento do início para o final dos experimentos.

Esses resultados, principalmente em relação à produção de blastocistos, indicam um fenômeno bastante comum em experimentos com material de abatedouro: a variação na qualidade oocitária independentemente da estação do ano. A qualidade dos oócitos pode ser influenciada por muitos fatores, entre os quais o estado nutricional, a idade dos animais abatidos, a fase do ciclo estral e o tempo de transporte dos ovários até o laboratório. Não é possível controlar as condições dos animais abatidos e houve certa variação no período entre o início do abate e o processamento dos ovários (2 a 5 horas) dependendo da programação de abate de fêmeas.

Acredita-se que a qualidade oocitária deva se refletir com maior intensidade na taxa de blastocistos. Os oócitos fertilizados iniciam o desenvolvimento embrionário (avaliado pela taxa de clivagem, a qual permaneceu homogênea) e podem não alcançar a fase de blastocisto devido ao bloqueio embrionário ou à degeneração.

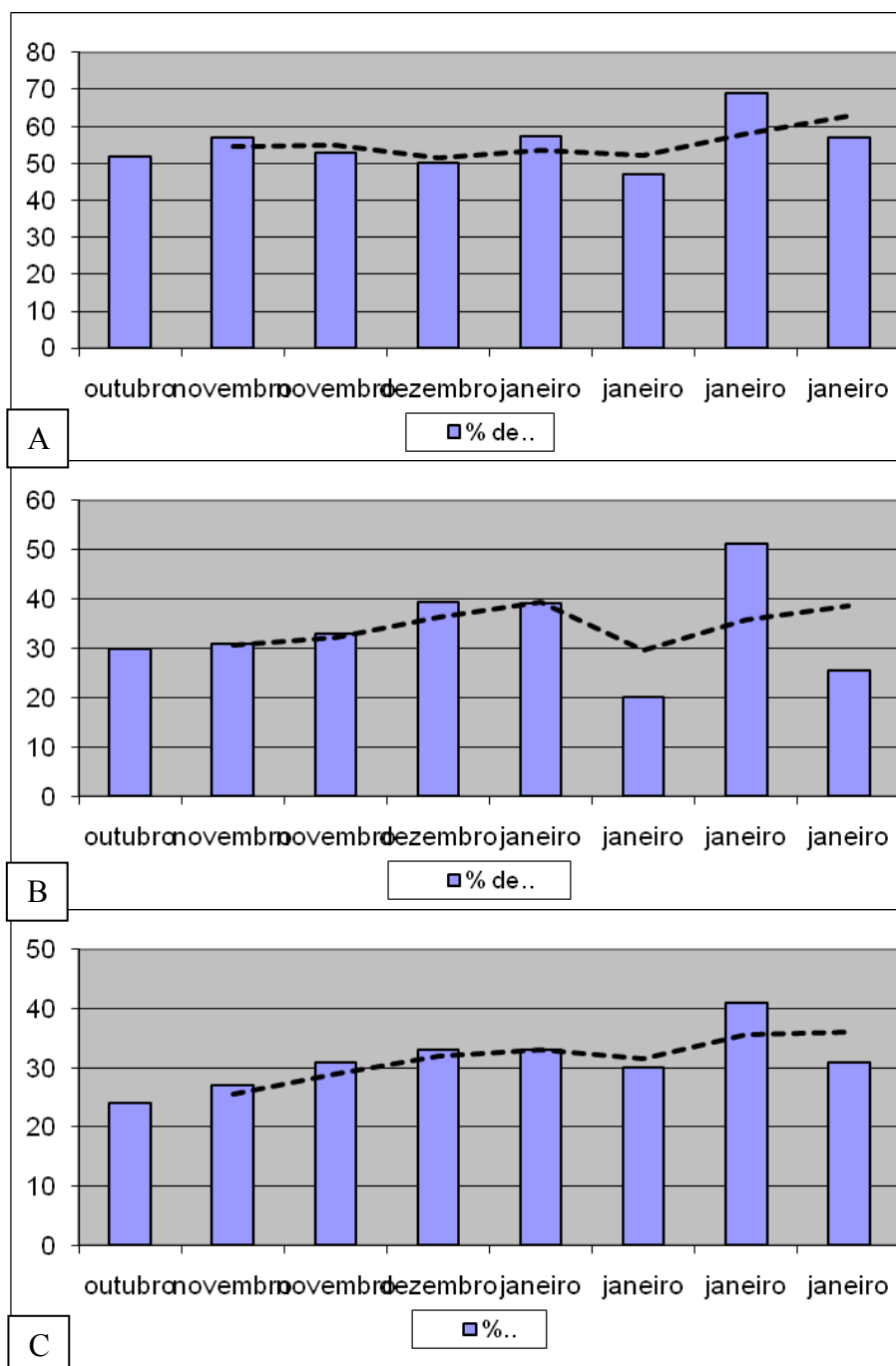


Figura 7 - Dados de PIV das rotinas de abatedouro realizadas de outubro de 2008 a janeiro de 2009. Em (A) estão mostradas as taxas de clivagem, em (B) as taxas de blastocistos e (C) as taxas de eclosão dos blastocistos. Em cada gráfico foi incluída uma linha de tendência (linha pontilhada).

O bloqueio embrionário está relacionado à qualidade citoplasmática (MEIRELLES et al., 2004). Os oócitos contêm o RNAm e as proteínas necessárias para alcançar o quarto ou quinto ciclo celular. A partir daí, os embriões que não conseguem transcrever seu próprio genoma por incompetência citoplasmática, não prosseguem no desenvolvimento.

Ressalta-se, entretanto, a taxa de eclosão de blastocistos, que representa uma medida indireta e sugestiva de sua qualidade, permaneceu satisfatória, sugerindo que não houve problemas com o sistema de PIV durante os experimentos.

No experimento 1, o grupo G3 (embriões não vitrificados) apresentou taxa de eclosão de 86,4%, superior ( $P < 0,05$ ) aos grupos vitrificados. Entre os grupos submetidos à congelação, a maior taxa de eclosão foi observada no G1 (EG+PRO), sendo igual a 77,1%. Já no G2 (EG+DMSO) a taxa de eclosão foi de 72,9%, como demonstrado na Tabela 2 e Figura 8, não se observando diferença significativa entre o G1 e G2 ( $P > 0,05$ ).

TABELA 2 – Taxa média de re-expansão e eclosão de blastocistos bovinos vitrificados com diferentes soluções crioprotetoras.

| Tratamento                      | Embriões<br>Recuperados | Re-expandidos |                   | Eclodidos |                   |
|---------------------------------|-------------------------|---------------|-------------------|-----------|-------------------|
|                                 |                         | 24 hs         |                   | 48 hs     |                   |
|                                 |                         | N             | %                 | N         | %                 |
| <b>G1 (EG+PRO)</b>              | 96                      | 84            | 87,5 <sup>b</sup> | 74        | 77,1 <sup>b</sup> |
| <b>G2 (EG+DMSO)</b>             | 107                     | 100           | 93,5 <sup>a</sup> | 78        | 72,9 <sup>b</sup> |
| <b>G3 (não<br/>vitrificado)</b> | 118                     | -             | -                 | 102       | 86,4 <sup>a</sup> |

<sup>a,b</sup> Letras diferentes indicam efeito significativo ( $P < 0,05$ )

O processo de congelação promove alterações celulares que interferem com o desenvolvimento posterior do embrião (GÓMEZ et al., 2008).

Existe uma relação estreita entre a velocidade de congelação e o aparecimento de lesões celulares. À medida que a velocidade de congelação aumenta, o índice de sobrevivência embrionária também aumenta após a descongelação até que seja alcançada uma relação ideal, na qual o índice de sobrevivência será máximo (KUWAYAMA, 2007; LEIBO, 2008; REICHENBACH et al., 2001).

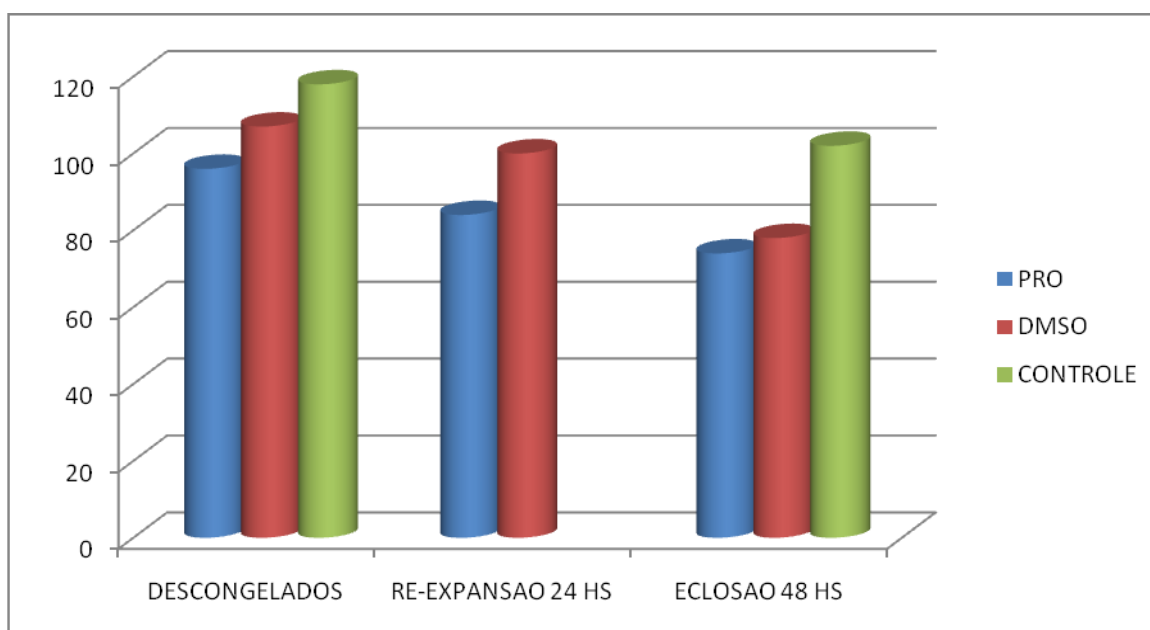


FIGURA 8 – Experimento 1: Número de embriões recuperados, taxas de re-expansão com 24 horas e de eclosão com 48 horas e os respectivos percentuais

Investigações na ultra-estrutura do embrião revelaram várias injúrias causadas pela congelação tanto em embriões produzidos *in vivo*, quanto em embriões PIV congelados. Alterações em mitocôndrias, no retículo endoplasmático rugoso (RER) e baixo desenvolvimento dos desmossomos foram danos considerados mais severos nos embriões PIV descongelados (FAIR et al., 2001; VAJTA et al., 1997).

GÓMEZ et al. (2008) também observaram que a vitrificação de embriões PIV de bovinos reduziu o número de células da massa celular interna ( $p < 0,0001$ ), enquanto a quantidade de células do trofoderma permaneceu inalterada. Esta redução pode explicar porque a sobrevivência *in vitro* à criopreservação é, algumas vezes, pouco informativa sobre a viabilidade do embrião após a transferência do embrião para receptoras.

Apesar de haver certo grau de regeneração das células embrionárias após 24 horas de cultivo (VAJTA et al., 1997), a menor taxa de eclosão ( $P < 0,05$ ) dos grupos vitrificados em relação aos grupos controle caracteriza danos que comprometem posterior desenvolvimento dos embriões.

Neste trabalho, as taxas de eclosão dos grupos controle (86,4% e 85,4% para o experimento 1 e 2, respectivamente) foram superiores ( $P < 0,05$ ) às observadas dos grupos vitrificados do experimento 1 (77,1% e 72,9%) e experimento 2 (63,3% e 70,5%), respectivamente. A menor taxa alcançada nos grupos em que os embriões foram vitrificados deve-se, provavelmente, às injúrias celulares provenientes do processo de vitrificação.

Entretanto, PEREIRA et al. (2005) sugeriram que essa diferença pode ser eliminada caso o sistema de cultivo embrionário pré e pós-vitrificação forneça adequadas condições de desenvolvimento para os embriões. Sendo assim, utilizou-se no presente estudo apenas 2,5% de SFB e 0,5% de BSA no meio de cultivo dos embriões (experimento 1 e 2) na tentativa de proporcionar desenvolvimento embrionário satisfatório, com menor acúmulo de lipídeos intracelulares.

Na vitrificação, utiliza-se altas concentrações de um ou mais crioprotetor(es) permeável(eis) para promover a desidratação das células embrionárias antes da congelação (etileno glicol, glicerol, DMSO, propanediol).

A permeabilidade dos crioprotetores depende de muitos fatores como o tipo e a concentração do crioprotetor, a temperatura da solução, o tamanho das células e a duração do tempo de exposição (KAIDI et al., 2000; MASSIP, 2001).

Os crioprotetores permeáveis normalmente constituem-se de pequenas moléculas que penetram facilmente na membrana celular e formam pontes de hidrogênio com as moléculas de água intracelular, diminuindo o ponto de congelamento da água, prevenindo assim a formação de cristais de gelo (PEREIRA & MARQUES, 2008), o que minimiza as injúrias às células embrionárias.

No experimento 1, as soluções de vitrificação compostas por EG + PRO e EG + DMSO proporcionaram taxas de eclosão 48 horas pós-descongelação de 77,1% e 72,9%, respectivamente. Esses dados foram superiores aos descritos na literatura, onde taxas de eclosão de 53,5 e 52,8%

(WERLICH et al., 2006) foram obtidas com embriões PIV de vacas *Bos taurus taurus*, vitrificados em EG + PRO e EG + DMSO, respectivamente.

Taxas de eclosão de 23,5%, 47,1%, 54% e 70,0% foram relatadas por autores que utilizaram a associação de EG + DMSO (VARAGO et al., 2006; MEZZALIRA et al., 2001; MEZZALIRA et al., 2004; PEREIRA et al., 2005), respectivamente. Nestes estudos, VARAGO, (2006) e PEREIRA, (2005) utilizaram embriões de vacas zebuínas, enquanto MEZZALIRA et al.(2001) e MEZZALIRA et al. (2004) trabalharam com embriões de vacas taurinas. A taxa de eclosão obtida no experimento 1 com a associação de EG + DMSO (72,9%) foi superior às encontradas por aqueles autores, tanto nos trabalhos com vacas zebuínas como com as taurinas.

CESARO et al. (2007) relataram que a associação de EG + PRO é menos tóxica que a solução composta por EG + DMSO, na vitrificação de oócitos bovinos imaturos. Porém, apesar da menor toxicidade, o PRO não se mostrou eficiente na criopreservação de oócitos. A dificuldade encontrada na vitrificação de oócitos pode estar relacionada ao grande tamanho dos oócitos e ao fato destas células apresentarem respostas individuais e variadas aos protocolos de congelamento (PEREIRA & MARQUES, 2008).

KARTBERG et al. (2008) relataram que exposição de embriões de camundongos a soluções de vitrificação contendo DMSO mostraram-se ser mais efetivas em proteger a membrana celular comparada com soluções sem DMSO.

Assim, acredita-se que as associações de EG + PRO e EG + DMSO podem ser utilizadas na criopreservação de embriões PIV de bovinos, com resultados *in vitro* satisfatórios. Porém, são necessários outros estudos aplicados a campo, para se observar como os embriões vitrificados em cada uma das soluções se comportam após descongelados e transferidos para o útero de receptoras sincronizadas.

A decisão de se utilizar a associação de EG + DMSO no experimento 2, foi baseada em resultados de estudos preliminares feitos pela empresa In Vitro Brasil Ltda (PONTES, 2008 – comunicação pessoal), nos quais as taxas de prenhez de embriões PIV de vacas zebuínas vitrificados com EG + DMSO foram superiores aos vitrificados com EG + PRO.



Assim como foi observado no experimento 1, neste segundo experimento a taxa de eclosão do grupo não vitrificado G3-SOF (85,4%) também foi superior ( $P<0,05$ ) às taxas dos grupos vitrificados G1-SOF (63,3%) e ao G2-F (70,5%), conforme pode ser observado na Tabela 3 e Figura 9, o que está de acordo com os relatos da literatura (VIEIRA et al., 2006; VAJTA et al., 1998).

TABELA 3 – Taxa média de re-expansão e eclosão de blastocistos bovinos vitrificados após delipidação química com forskolin.

| Tratamento                         | Embriões<br>Recuperados | Re-expandidos |                   | Eclodidos |                   |
|------------------------------------|-------------------------|---------------|-------------------|-----------|-------------------|
|                                    |                         | 24 hs         |                   | 48 hs     |                   |
|                                    |                         | N             | %                 | N         | %                 |
| <b>G1-SOF</b>                      | 101                     | 80            | 79,2 <sup>b</sup> | 64        | 63,3 <sup>c</sup> |
| <b>G2-F</b>                        | 112                     | 98            | 87,5 <sup>a</sup> | 79        | 70,5 <sup>b</sup> |
| <b>G3-SOF</b><br>(não vitrificado) | 96                      | -             | -                 | 82        | 85,4 <sup>a</sup> |

<sup>a,b,c</sup> Letras diferentes indicam efeito significativo ( $P<0,05$ )

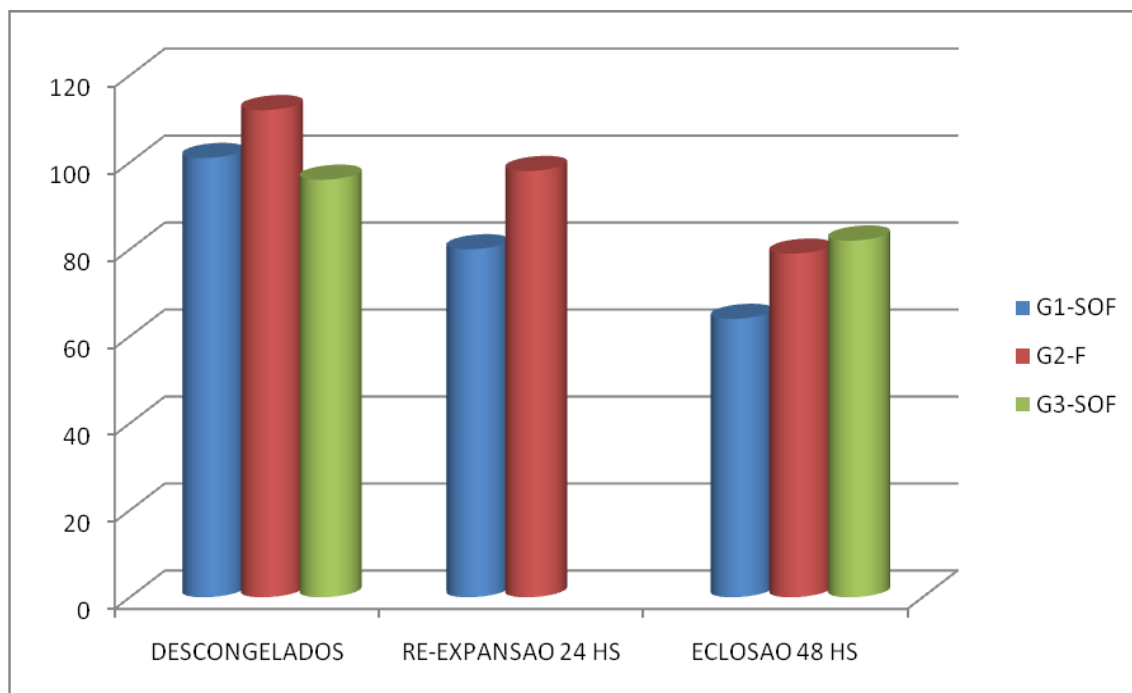


FIGURA 9 - Experimento 2: Número de embriões recuperados, taxas de re-expansão com 24 horas e de eclosão com 48 horas e os respectivos percentuais, cultivados ou não com forskolin.

O conteúdo lipídico de oócitos e embriões é um importante parâmetro ligado tanto à qualidade quanto à criotolerância. Alterações nas características físicas dos lipídeos submetidos às baixas temperaturas são apontadas como as maiores causas das crioinjúrias (PEREIRA & MARQUES, 2008)

A reduzida criotolerância de embriões PIV, especialmente aqueles cultivados em meios suplementados com soro, parece estar diretamente correlacionada com o excessivo acúmulo de lipídeos durante o desenvolvimento *in vitro* do embrião.

O cultivo de embriões bovinos em sistemas sem soro reduz o acúmulo citoplasmático de gotas lipídicas no blastocisto, assim como a remoção mecânica do excesso de lipídeos intracelular significativamente aumenta a resistência do embrião à criopreservação (USHIJIMA et al., 1999; DIEZ et al., 2001; ABE et al., 2002b). O acúmulo excessivo de lipídeos em embriões bovinos tem sido associado também com anormalidades de mitocôndrias e microvilos, prejudicando a qualidade do embrião (ABE et al., 2002a,b; RIZOS et al., 2003).

Durante o cultivo *in vitro* ocorre acúmulo de lipídeos no citoplasma das células embrionárias. A maior parte dos lipídeos intracelulares em oócitos e embriões são os triacilgliceróis (TAG) (DIEZ et al., 2001). Enquanto os TAG são os mais sintetizados e estocados, representando 40-50% do total de lipídeos em embriões bovinos produzidos *in vivo*, em embriões *in vitro* eles podem alcançar até 88% (FERGUSON & LEESE, 1999). Além disso, os autores relataram que a concentração de TAG em embriões bovinos produzidos *in vivo* permanece estável do estágio de duas células até blastocisto, enquanto em embriões PIV as reservas de TAG podem dobrar desde o estágio de quatro células até blastocisto, quando expostos a meio contendo 10% de soro.

A principal função biológica dos TAG é servir como fonte de energia metabólica a ser usada em eventos específicos do desenvolvimento embrionário, como a eclosão do blastocisto (DIEZ et al., 2001). Os mesmos autores observaram efeito benéfico na criotolerância de embriões bovinos após remoção micro-cirúrgica das gotas de lipídeo e cultivados *in vitro* após o descongelamento, porém este fato não se confirmou nos embriões transferidos para as receptoras (10,5% de prenhez do grupo congelado contra 47% dos não congelados). Sendo assim, não houve relação direta *in vitro* – *in vivo* na taxa de sobrevivência pós congelação-descongelação dos embriões que sofreram remoção dos lipídeos.

Pesquisas recentes com lipídeos mostraram a possibilidade de se reduzir o conteúdo lipídico intracelular de embriões bovinos e de suínos, aumentando assim a tolerância à criopreservação. O forskolin, um agente lipolítico capaz de estimular a lipólise dos TAG, foi utilizado por MEN et al. (2006). Estes autores relataram que o forskolin aumentou a criosobrevivência de embriões PIV suínos após remoção parcial dos lipídeos por estímulo químico da lipólise intracelular. Observaram também o aumento da atividade lipolítica e, consequentemente, maior criotolerância de embriões suínos cultivados na presença de forskolin. A maior produção de glicerol do grupo tratamento (forskolin) comparada ao grupo controle ( $P < 0,05$ ), foi uma das hipóteses defendidas pelos autores. A manipulação da lipólise intracelular em cultivo de células adiposas, utilizando agentes lipolíticos, vem sendo estudada há muitos anos nas linhas de pesquisa de metabolismo de lipídeos e patologias dos

distúrbios da lipólise em várias espécies (LITOSCH et al., 1982; MORIMOTO et al., 2001; HOLM, 2003).

Embora existam vários relatos (FERGUSON & LEESE, 1999; ABE et al., 2002b; RIZOS et al., 2003) no sentido de que o acúmulo excessivo de lipídeos em embriões bovinos produzidos *in vitro* em meio contendo soro influencia a qualidade do embrião e a sua criopreservação, as informações disponíveis ainda não são suficientes para explicar o significado das gotas lipídicas nos oócitos e embriões.

O mecanismo pelo qual agentes lipolíticos, como o forskolin, podem aumentar a criotolerância dos embriões PIV é pela parcial redução das gotas de lipídeos intracelulares, pela estimulação da lipólise (LITOSCH et al., 1982; MORIMOTO et al., 2001). A hidrólise do lipídeo intracelular é catalisada pela lipase endógena, que por sua vez, é regulada por vários hormônios. Glucagon e catecolaminas, por exemplo, estimulam sua atividade enquanto a insulina e melatonina atenuam a sua ação (HOLM, 2003).

Os hormônios ligam-se aos seus receptores na membrana celular e ativam a adenilato ciclase. Esta, quando ativada, estimula o segundo mensageiro adenosina monofosfato cíclico (AMPC) e a proteína kinase (PK) dependente de AMPC. Pela fosforilação, a PK ativa a lipase endógena (JOOST et al., 1986), que desloca-se do citoplasma para a gota de lipídeo e catalisa a hidrólise enzimática do lipídeo intracelular. (HOLM, 2003). O primeiro alvo da lipase são os TAG, que são hidrolisados em ácidos graxos e glicerol (Figura 8).

A lipase ativada também catalisa a hidrólise dos diacilgliceróis, monogliceróis e outros lipídeos (JOOST et al., 1986).

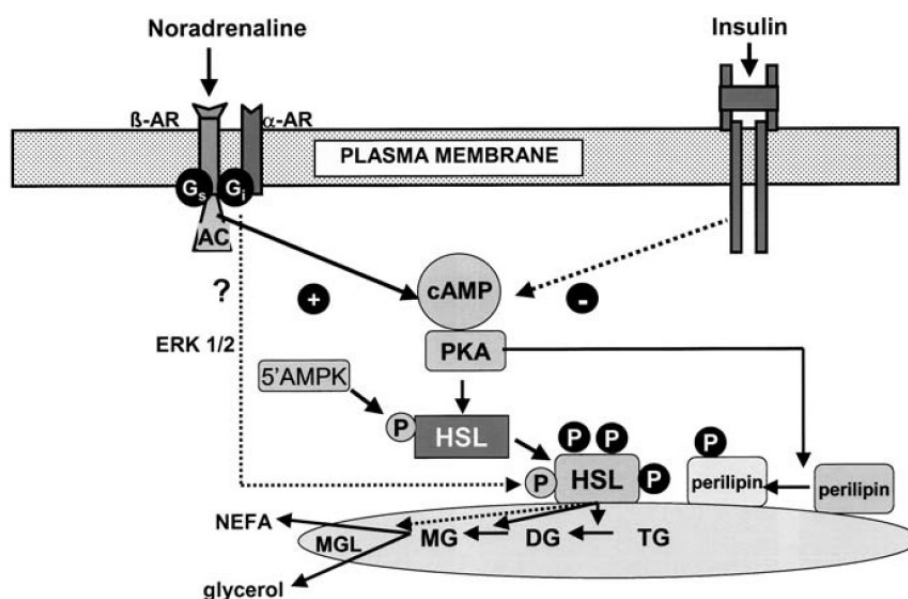


FIGURA 10 – Controle hormonal da lipólise (HOLM, 2003)

Segundo MEN et al. (2006), o aumento dos níveis de glicerol intracelular, resultante do estímulo à hidrólise dos lipídeos nas células embrionárias pode, em parte, contribuir para o aumento da tolerância dos blastocistos à criopreservação.

Em relação aos protocolos e crioprotetores avaliados, os resultados da literatura apresentam grande variabilidade e freqüentes contradições de resultados, o que sugere a influência de fatores como a procedência dos embriões, os meios de cultivo embrionário, a formulação das soluções ou o protocolo utilizado na congelção.

A maior taxa de eclosão ( $P < 0,05$ ) do grupo G2-F em relação ao grupo G1-SOF sugere que a adição de forskolin ao meio de cultivo dos embriões PIV aumentou a criotolerância dos embriões, sendo uma alternativa muito interessante do ponto de vista científico, financeiro e comercial.

Isto porque, ao se considerar laboratórios de PIV com escala comercial, a produção de 5 a 7% a mais de embriões viáveis em um ano de trabalho, pode representar 500 a 2000 embriões comercializados no mesmo período, dependendo do potencial de cada laboratório. Se o valor médio do embrião PIV comercializado no Brasil atualmente gira em torno de U\$ 35,00 (trinta e cinco dólares), o equivalente a oitenta e cinco reais, 500 embriões significariam

uma receita extra de U\$ 17.500,00 dólares, valor que representa aproximadamente 40 mil reais.

## 5. CONCLUSÃO

No experimento 1, as taxas de eclosão dos embriões bovinos PIV da raça Nelore, vitrificados utilizando-se a metodologia CRYOTOP e as associações de EG + PRO e EG + DMSO foram similares, o que sugere que ambas soluções podem ser utilizadas em protocolos de vitrificação de embriões bovinos PIV, não comprovando a hipótese de que a baixa toxicidade do Propanediol pudesse aumentar a criotolerância dos embriões.

No experimento 2, os embriões cultivados na presença do agente lipolítico forskolin apresentaram taxa de eclosão 48 horas pós-descongelação superior ( $P < 0,05$ ) aos embriões cultivados em meio SOF-controle, vitrificados pelo mesmo protocolo. Sendo assim, a hipótese de que a remoção lipídica provocada pelo agente lipolítico forskolin pode aumentar a criotolerância dos embriões foi comprovada.

## REFERÊNCIAS

1. ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmatic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos develops in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 61, p. 57-66, 2002a.
2. ABE, H.; MATSUZAKI, S.; HOSHI, H. Ultrastructural differences in bovine morulae classified as high and low qualities by morphological evaluation. **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, p. 1273-1283, 2002b.
3. BARCELÓ-FIMBRES, M.; SEIDEL JR., G.E. Effects of fetal calf serum, phenazine ethosulphate and either glucose or fructose during in vitro culture of bovine embryos on embryonic development after cryopreservation. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 74(11), p. 1395-1405, 2007.
4. CALLEGARI-JACQUES, S.M. Bioestatística: princípios e aplicações. **Artmed**, Porto Alegre, 2003.
5. CAMPOS-CHILLON, L.F.; WALKER, D.J.; DE LA TORRE-SANCHEZ, J.F.; SEIDEL JR, G.E. In vitro assessment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v. 65, p. 120-1214, 2006.
6. CESARO, M.P.; MARTINS, L.T.; CRUZ, F.B.; RODRIGUES, M.F.; CLAUDINO, P.; OHLWEILER, L.U.; BERTOLINI, M.; VIEIRA, A.D.; MEZZALIRA, A. Toxicidade e crio proteção de duas soluções crio protetoras utilizadas na vitrificação de oócitos bovinos imaturos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. 1009, 2007.
7. DIEZ, C.; HEYMAN, Y.; LE BOURHIS, D.; GUYADER-JOLY, C.; DEGROUARD, J.; RENARD, J.P. Delipidating in vitro-produced bovine zygotes: effect on further development and consequences for freezability. **Theriogenology**, Stoneham, v. 55, p. 923-936, 2001.
8. FAIR, T.; LONERGAN, P.; DINNYES, A.; COTTELL, D.C.; HYTELL, P.; WARD, F.A.; BOLAND, M.P. Ultrastructure of bovine blastocysts following



- cryopreservation: effect of method of blastocysts production. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 58, p. 186-195, 2001.
9. FERGUSON, E.M.; LEESE, H.J. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryo. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 116, p. 373-378, 1999.
  10. GÓMEZ, E.; MUÑOZ, M.; RODRÍGUEZ, A.; CAAMAÑO, J.N.; FACAL, N.; DÍEZ, C. Vitrification of bovine blastocysts produced in vitro inflicts selective damage to the inner cells mass. **Reproduction in Domestic Animals**, Germany, resumo, 2008.
  11. GREVE, T.; AVERY, B.; CALLESEN, H. Viability of in vivo and in vitro-produced bovine embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, Germany, v. 28, p. 164, 1993.
  12. HOLM, C. Molecular mechanisms of regulating hormone-sensitivity lipase and lipolysis. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, p. 1120-1224, 2003.
  13. IBGE. Sistema IBGE de recuperação automática. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, Atualizado em 14 mai. 2007. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em 14 mai. 2007.
  14. IMAI, K.; MATOBA, S.; DOCHI, O.; SHIMOIRA, T. Different factors affect competence and cry tolerance in *in vitro* produced bovine embryos. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 64, p. 887-891, 2002.
  15. JOOST, H.G. & STEINFELDER, H.J. Forskolin inhibits insulin-stimulated glucose transport in rat adipose cells by a direct interaction with glucose transporter. **Molecular Pharmacology**, v. 31, p. 279-283, 1986.
  16. KAIDI, S.; DONNAY, I.; LAMBERT, P.; DESSY, F.; MASSIP, A. Osmotic behavior of in vitro produced bovine blastocysts in cryoprotectant solutions as a potential predictive test of survival. **Cryobiology**, San Diego, v. 41, p. 106-115, 2000.
  17. KAIDI, S.; BERNARD, S.; LAMBERT, P.; MASSIP, A.; DESSY, F.; DONNAY, I. Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced in vitro. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 65, p. 1127-1134, 2001.

- 18.KARTBERG, A.J.; HAMBILIKI, F.; ARVIDSSON, T.; STAVREUS-EVERS, A.; SVALANDER, P. Vitrification with DMSO protects embryo membrane integrity better than solutions without DMSO. **Reproductive Bio-Medicine Online**, v. 17(3), p. 378-384, 2008.
- 19.KUWAYAMA, M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. **Theriogenology**, Stoneham, v. 67, p. 73-80, 2007.
- 20.KUWAYAMA, M.; VAJTA, G.; KATO, O. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. **Reproductive Bio-Medicine Online**, v. 11, p. 300-308, 2005.
- 21.KUWAYAMA, M. & KATO, O. All-round vitrification method human oocytes and embryos. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 17, p. 477, 2000.
- 22.LEIBFRIED, L.; FIRST, N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. **Journal of Animal Science**, v. 48, p. 76-86, 1979.
- 23.LEIBO, S.P. One-step method for direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v. 21, p. 767-790, 1984.
- 24.LEIBO, S.P.; LOSKUTOFF, M.N. Cryobiology of *in vitro* derived bovine embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v. 39, p. 81-94, 1993.
- 25.LEIBO, S.P. Cryopreservation of oocytes and embryos: Optimization by theoretical versus empirical analysis. **Theriogenology**, Stoneham, v. 69, p. 37-47, 2008.
- 26.LITOSCH, I.; HUDSON, T.H.; MILLS, I.; LI, S.Y.; FAIN, J.N. Forskolin as an activator of cyclic AMP accumulation and lipolysis in rat adipocytes. **Molecular Pharmacology**, v. 22, p. 109-115, 1982.
- 27.MASSIP, A. Cryopreservation of embryos of farm animals. **Reproduction in Domestic Animals**, Germany, v. 36, p. 49-55, 2001.
- 28.MEIRELLES, F.V.; CAETANO, A.R.; WATANABE, Y.F.; RIPAMONTE, P.; CARAMBULA, S.F.; MERINGHE, G.K.; GARCIA, S.M. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 13-20, 2004.

- 29.MEN, H.; AGCA, Y.; RILEY, L.K.; CRITSER, J.K. Improved survival of vitrified porcine embryos after partial delipation through chemically stimulated lipolysis and inhibition of apoptosis. **Theriogenology**, Stoneham, v. 66, p. 2008-2016, 2006.
- 30.MENEZO, Y. Cryopreservation of IVF embryos: which stage? **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**. v. 1135, p. 528-532, 2004.
- 31.MEZZALIRA, A.; MEZZALIRA, J.C.; MORAES, A.N.; THALER NETO, A.; VIEIRA, A.D.; BARRETA, M.H.; DAMIANI, J. Vitrification of bovine IVP embryos: age of embryos and exposure time to cryoprotectant influence viability. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 107-111, 2004.
- 32.MEZZALIRA, A.; THALER NETO, A.; BARBIERI, D.P.; MACHADO, M.F.; VIEIRA, A.D.; RUBIN, M.I.B.; LEHMKUHL, R.C. Vitricificação de embriões bovinos produzidos PIV tratados com citocalasina B. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 25, p. 422-423, 2001.
- 33.MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA, Agronegócio Brasileiro: Uma Oportunidade de Investimentos, 23/11/2007. Disponível em: [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br). Acesso em: 24/11/2007.
- 34.MORIMOTO, C.; KAMEDA, K.; TSUJITA, T.; OKUDA, H. Relationships between lipolysis induced by various lipolytic agents and hormone-sensitive lipase in rat fat cells. **Journal of Lipid Research**, v. 42, p. 120-127, 2001.
- 35.NAGASHIMA, H.; KASHIWAZAKI, N.; ASHMAN, R.J.; GRUPEN, C.G.; SEAMARK, R.F.; NOTTLE, M.B. Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 51, p. 618-622, 1994.
- 36.PEREIRA, D.C.; DODE, M.A.N.; RUMPF, R. Evaluations of different culture systems on the *in vitro* production of bovine embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, p. 1131-1141, 2005.
- 37.PEREIRA, R.M. & MARQUES, C.C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. **Cell Tissue Banking**, v. 9, p. 267-277, 2008.

38. POLLARD, J.W. & LEIBO, S.P. Chilling sensitivity of mammalian embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v. 41, p. 101-106, 1994.
39. PONTES, J.H.F. In Vitro Brasil Ltda., Mogi Mirim, comunicação pessoal, 2008
40. REICHENBACH, H.D.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F.; SANTOS FILHO, A.S.; ANDRADE, J.C.O. Transferência e Criopreservação de Embriões Bovinos. In \_\_\_ **Biotécnicas aplicadas a reprodução animal**, 1.ed. São Paulo, 2001. cap. 8, p. 127-178.
41. RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNELO, S.; DE LA FUENTE, J. BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance and messenger RNA expression. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 68, p. 236-243, 2003.
42. SOMMERFELD, V. & NIEMANN, H. Cryopreservation of bovine embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. **Cryobiology**, San Diego, v. 38(2), p. 95-105, 1999.
43. THIBIER, M. Transfers of both in vivo derived and in vitro produced embryos in cattle still on the rise and contrasted trends in others species in 2005. **Embryo Transfer Newsletter**, n. 24, p. 12-18, 2006.
44. THOMPSON, J.G. Comparison between in vivo-derived and in vitro-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. **Reproduction Fertility and Development**. v. 9(3), p. 341-354. 1997.
45. USHIJIMA, H.; YAMAKAWA, H.; NAGASHIMA, H. Cryopreservation of bovine premorula-estage in vitro matured/ in vitro fertilized embryos after delipidation and before use in nucleus transfer. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 60, p. 534-539, 1999.
46. VAJTA, G. & NAGY, Z.P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reproductive BioMedicine**, v. 12, n. 6, p. 779-796, 2006.
47. VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P.J.; JACOBSEN, H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 51, p. 53-58, 1998.

- 48.VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**, Stoneham, v. 65, p. 236-244, 2006.
- 49.VAJTA, G.; HYTELL, P.; CALLESEN, H. Morphological changes of in vitro-produced bovine blastocysts after vitrification, in straw direct rehydration, and culture. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 48, p. 9-17, 1997.
- 50.VARAGO, F.C.; SALIBA, W.P.; ALVIM, M.T.T.; VASCONCELOS, A.B.; OLIVEIRA, C.H.; STAHLBERG, R.; LAGARES, M.A. Vitrification of *in vitro* produced Zebu embryos. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v.3, p. 353-358, 2006.
- 51.VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. A produção de embriões bovinos no Brasil: Uma nova realidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. 915-924, 2007.
- 52.VIEIRA, A.D.; MEZZALIRA, A.; BARBIERI, D.P.; LEHMKUHL, R.C.; RUBIN, M.I.B.; VAJTA, G. Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. **Cryobiology**, San Diego, v. 45, p. 91-94, 2002.
- 53.VISINTIN, J.A.; MARTINS, J.F.P.; BEVILACQUA, E.M.; MELLO, M.R.B.; NICÁCIO, A.C.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.A. Cryopreservation of Bos Taurus vs Bos indicus embryos: are they really different? **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, p. 345-359, 2002.
- 54.VOELKEL, S. A.; HU, Y.X. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v. 37, p. 23-37, 1992.
- 55.WELLS, D.N.; MISICA, P.M.; TERVIT, H.R. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 60, p. 996-1005, 1999.
- 56.WERLICH, D.E.; BARRETA, M.H.; MARTINS, L.T.; VIEIRA, A.D.; MORAES, A.N.; MEZZALIRA, A. Embriões bovinos PIV vitrificados em diferentes soluções crioprotetoras com ou sem o uso de nitrogênio super-resfriado. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 77-82, 2006.
- 57.ZENON, Y.; PEARL, M.; BOROCHOV, A.; ARAV, A. Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature oocytes. **Cryobiology**, San Diego, v. 38, p. 35-42, 1999.

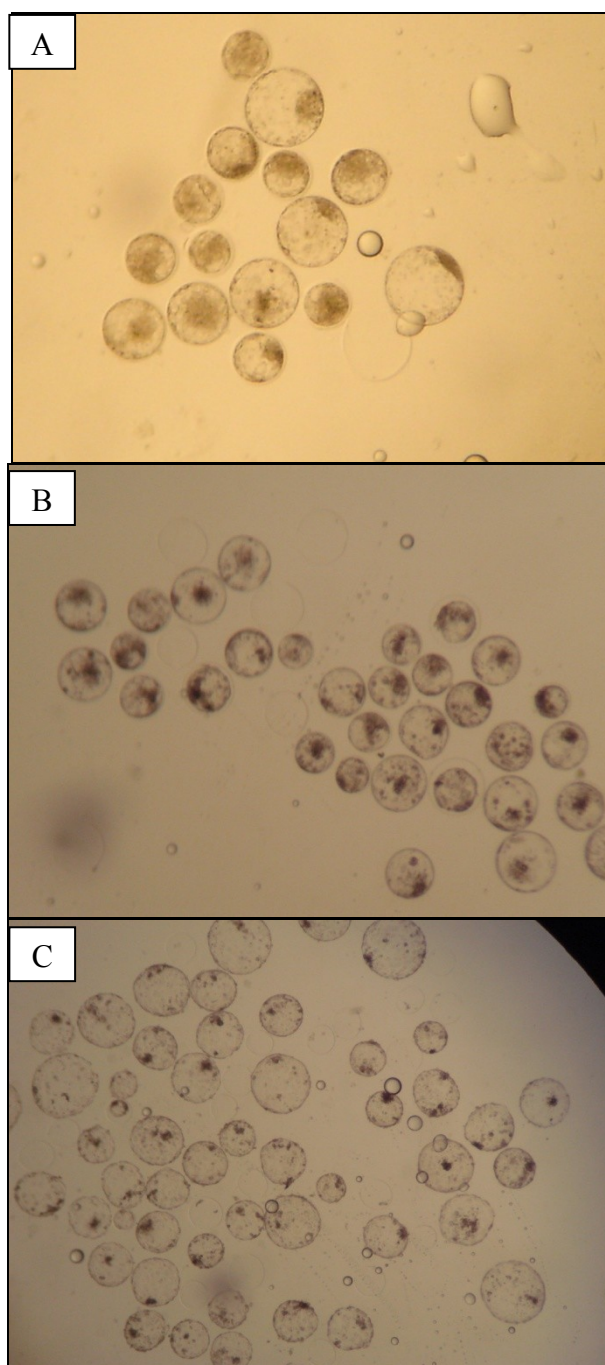
**ANEXOS**

FIGURA 11 – Diferentes etapas do experimento 1. Em (A) embriões do grupo G1 no D7 do cultivo antes da vitrificação, em (B) embriões do grupo G1 24 horas pós-descongelção e em (C) embriões do grupo G1 eclodidos 48 horas após a descongelção.

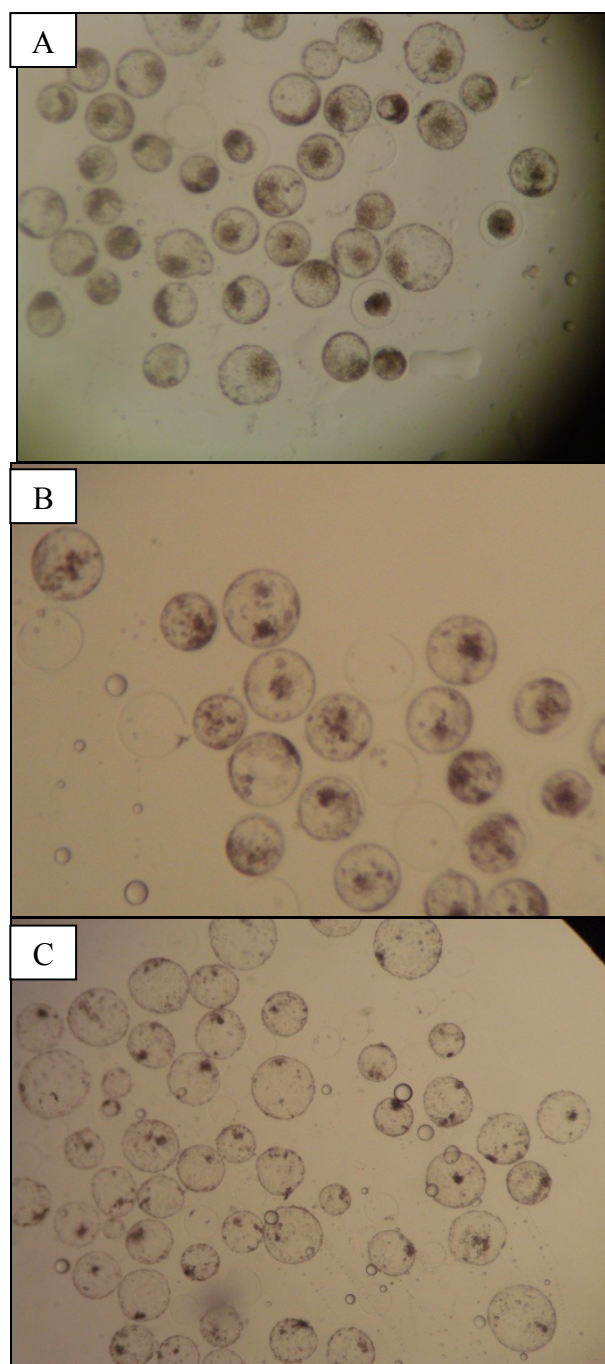


FIGURA 12 – Diferentes etapas do experimento 1. Em (A) embriões do grupo G2 no D7 do cultivo antes da vitrificação, em (B) embriões do grupo G2 24 horas pós-descongelamento e em (C) embriões do grupo G2 eclodidos 48 horas após a descongelamento.



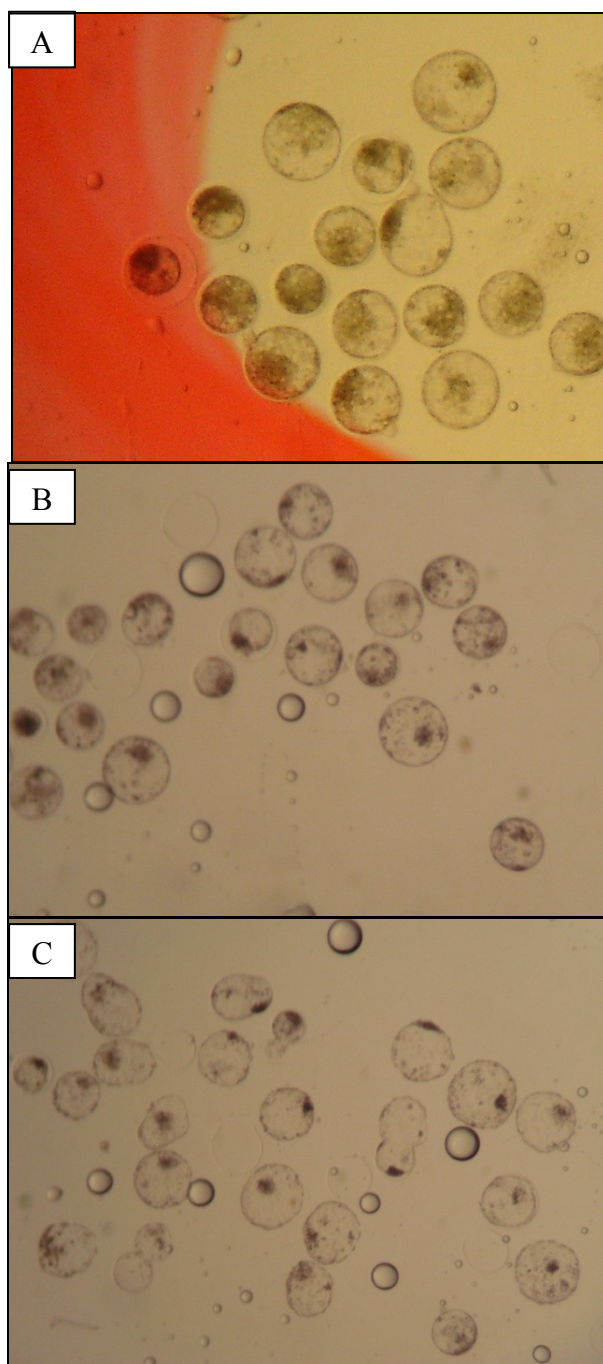


FIGURA 13 – Diferentes etapas do experimento 2. Em (A) embriões do grupo G1-SOF no D7 do cultivo antes da vitrificação, em (B) embriões do grupo G1-SOF 24 horas pós-descongelção e em (C) embriões do grupo G1-SOF eclodidos 48 horas após a descongelção.



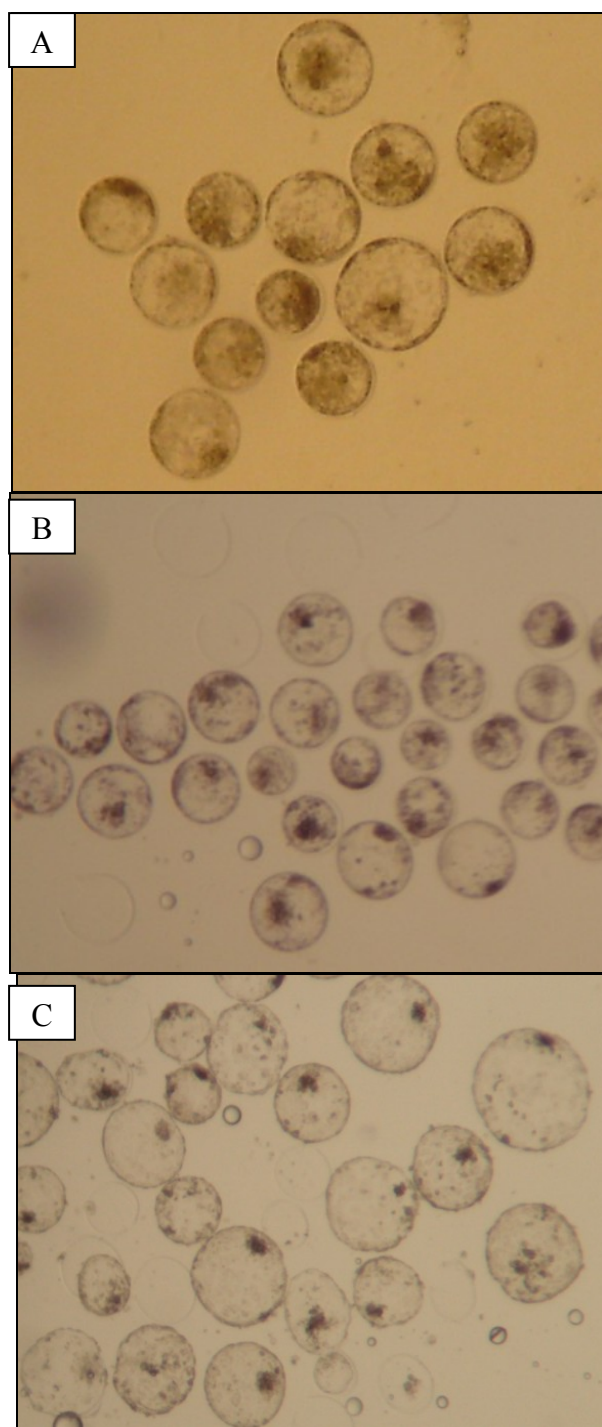


FIGURA 14 – Diferentes etapas do experimento 2. Em (A) embriões do grupo G2-F no D7 do cultivo antes da vitrificação, em (B) embriões do grupo G2-F 24 horas pós-descongelamento e em (C) embriões do grupo G2-F eclodidos 48 horas após a descongelamento.