

# ASPECTOS DA VITRIFICAÇÃO EMBRIONÁRIA EM EQUINOS- REVISÃO LITERÁRIA

## ASPECTS OF VITRIFICATION IN EQUINE EMBRYO-LITERATURE REVIEW

<sup>1</sup>STURION, D.J.; <sup>1</sup>MOYA-ARAUJO, C.F.; <sup>1</sup>BAZZO, I.; <sup>2</sup>ROSA, L.J.; <sup>2</sup>THO, J. S.; <sup>2</sup>SILVA, N. L. T.;  
<sup>2</sup>NAUMES, L. B.; <sup>2</sup>PAULIN, C. D.; <sup>1</sup>ARAUJO, G.H.M.

<sup>1</sup> Docente de Medicina Veterinária nas Faculdades Integradas de Ourinhos - FIO

<sup>2</sup> Discentes em Medicina Veterinária nas Faculdades Integradas de Ourinhos – FIO

### RESUMO

A necessidade do aprimoramento de técnicas para o transporte e comercialização de embriões tem estimulado diversas pesquisas sobre criopreservação de embriões nas espécies domésticas. A criopreservação visa manter o metabolismo celular em estado latente, tornando possível a conservação de células e tecidos por tempo indeterminado em nitrogênio líquido. As técnicas utilizadas para o armazenamento dos embriões são a congelação tradicional e a vitrificação. O método de vitrificação de embriões tem despertado o interesse em várias espécies por requerer equipamentos de baixo custo e permitir sua execução de modo mais rápido. O princípio fundamental da vitrificação reside na necessidade da adição de altas concentrações de crioprotetores, promovendo a solidificação das células sem que haja a formação de cristais de gelo intra e extracelular, pelo aumento de viscosidade. O objetivo dessa revisão é descrever os métodos já existentes para a vitrificação de embriões equinos, e discutir o procedimento ideal para estabelecer gestações de equinos após a vitrificação e o aquecimento de embriões.

**Palavras-chave:** Criopreservação. Crioprotetor. Estado Vítreo.

### ABSTRACT

The need for improvement of techniques for the transportation and selling of embryos has stimulated many researches on cryopreservation of embryos in domestic species. Cryopreservation aims to maintain cellular metabolism in perfect condition, making possible the preservation of cells and tissues indefinitely. The techniques used for the storage of embryos are traditional freezing and vitrification. The method of cryopreservation of embryos has raised interest in several species because requires inexpensive equipment and allow it perform more quickly. The fundamental principle of vitrification is the need to increase the osmolarity as possible from the cells by the addition of high concentrations of cryoprotectants, promoting solidification of cells without the formation of ice crystals intracellular and extracellular in a ultra-rapid freeze curve. The objective of this review is to discusse the method of existing development for vitrification of embryos horses, and the ideal procedure to establish equine pregnancies after vitrification and warming of embryos.

**Keywords:** Cryopreservation. Cryoprotector. Vitriified State.

### INTRODUÇÃO

O Brasil possui o terceiro maior rebanho equino do mundo (CNA, 2003). Essa atividade forma hoje uma das mais importantes interações dos setores ligados ao lazer, cultura e turismo, sendo uma das cadeias produtivas zootécnicas que oferece mais oportunidades de trabalho, conquistando posição de destaque na economia nacional. (CURCIO, 2005).

A produção animal vem sendo fortemente incrementada pelo emprego do melhoramento e pela utilização de técnicas reprodutivas como a inseminação artificial, a transferência de embriões, a fecundação *in vitro*, a clonagem e a transgenia animal. (NICACIO et al., 2006).

A fecundação *in vitro* de embriões é uma das biotécnicas reprodutivas utilizadas em animais da espécie equina e, apesar dos custos ainda elevados, a América do Sul, responde por uma boa porcentagem das transferências de embriões produzidos *in vitro* no mundo. (VIANA, 2006).

Embriões para vitrificação devem ser coletados de úteros de éguas doadoras, entre 6 a 6,5 dias após a ovulação, sendo a variação do tamanho dos embriões colhidos dentro deste período uma característica individual de cada égua. A vitrificação de embriões será bem-sucedida quando o procedimento for feito com embriões pequenos, com menos de 300µm, pois assim neste estágio o embrião ainda não desenvolveu por completo uma estrutura acelular proteica, chamada cápsula embrionária, que circunda externamente os embriões mais velhos, propiciando, se respeitados os detalhes técnicos, um método mais rápido e eficaz para a criopreservação de embriões equinos. (CARNEVALE, 2006).

A presente revisão tem por objetivo descrever os métodos desenvolvidos existentes para a vitrificação de embriões equinos, e discutir qual procedimento ideal para estabelecer gestações de equinos após a vitrificação e o aquecimento de embriões.

## REVISÃO DE LITERATURA

A técnica de vitrificação pode ser considerada um método de criopreservação em que a formação de cristais de gelo é totalmente eliminada. Nela a solidificação é atingida pelo aumento extremo da viscosidade do meio e não pela cristalização, chegando diretamente à um estado vítreo. (MASSIP, 2001; YAVIN; ARAV, 2007).

A vitrificação permite a passagem pela zona crítica de temperatura de maneira rápida, sem que ocorra o estresse térmico do embrião, sendo este, um dos principais causadores da não eficácia do procedimento. (MASSIP, 2001).

Na espécie equina a puberdade da fêmea tem início entre o 12º e 18º mês de vida. Sendo considerada poliéstrica estacional, isto é, seu ciclo estral, de 21 dias,

permanece em atividade durante períodos de alta luminosidade e temperatura, e cessa no outono e inverno. É uma espécie monovulatória, tendo apenas um filhote por gestação. (GINTHER, 2002).

Logo após o nascimento, os ovários de uma fêmea equina contêm milhares de folículos, entretanto, muito poucos desenvolvem, maturam e ovulam durante sua vida reprodutiva. Por um mecanismo independente de gonadotrofinas, são recrutados em grupos para iniciar o desenvolvimento. Do grupo de folículos recrutados que iniciam a emergência da onda, um deles é selecionado, torna-se dominante e continua se desenvolvendo, enquanto os outros entram em atresia. Os hormônios atuantes neste período são o FSH (hormônio folículo estimulante) e o LH (hormônio luteinizante), produzidos pela adenohipófise, estimulados pelo GnRH, que por sua vez é produzido no hipotálamo. (McKINNON, 2002).

No final da fase de dominância, o folículo mais desenvolvido está pronto para a ovulação, sendo denominado de folículo pré-ovulatório com tamanho > 35mm. Neste período é realizada a monta natural (MN) ou a biotécnica de inseminação artificial (IA). O estro da égua dura de 4 a 8 dias, sendo que a ovulação ocorre entre o 6º e 7º dia do cio. (CARNEVALE, 2004).

A IA eqüina é uma biotécnica que, consiste em coletar o sêmen de um garanhão, fracionar as doses inseminantes (400 a 800 milhões de espermatozoides viáveis no mínimo) e em seguida depositar a dose no interior do útero das éguas em estro próximo à ovulação. (BOCHIO, 2011).

Ao constatar o término do processo ejaculatório na colheita de sêmen, deve-se retirar a vagina artificial, mantendo-a na posição vertical e levando-a para o laboratório para processamento, onde o sêmen será devidamente preparado e analisado para a IA. (BOCHIO, 2011).

Após a correta higienização da genitália externa da égua, com uma luva de palpação estéril lubrificada, deve-se introduzir a mão na vagina até a localização da cérvix. Encontrando a abertura desta, introduz-se a pipeta no útero. Feito isso, pressiona-se o êmbolo da seringa, depositando-se o sêmen no interior do corpo do útero. (BOCHIO, 2011).

Os espermatozóides ao serem depositados no útero após a IA são transportados até o terço superior dos cornos uterinos, adentrando a tuba uterina, onde vai ocorrer a fecundação do oócito liberado pelo folículo ovariano. (GONSALVES et al., 2002).

Para a colheita do embrião são necessários alguns materiais, como o estereomicroscópio (lupa); micropipeta de 200 µl (microlitro); palhetas; filtros para embrião; Ringer Lactato (RL); nitrogênio líquido; recipiente isolado; sondas. (HUDSON et al., 2006).

O método utilizado para esse procedimento consiste em uma lavagem uterina, usando uma solução de Lactato de Ringer (RL), aquecido em banho maria com temperatura equivalente a 37°C, que deverá ser introduzido com o auxílio da sonda. Assim o embrião é retirado do útero. (CARNEVALE, 2004).

Após a lavagem o embrião é recuperado do útero junto com uma parte do RL, passando pela sonda e indo até o filtro, onde ocorre a separação do embrião com a solução, usando uma peneira. Feito isso, o embrião é levado até um laboratório onde é colocado no estereomicroscópio para localização e lavagem, para retirar algumas células uterinas (debris) que possam estar aderidas a ele. A última etapa é o envasamento do embrião em uma palheta de 0,25mL, sendo que a coluna contendo o embrião e o meio de vitrificação deve ser separada por duas colunas de ar e duas colunas de galactose a 0,5M para, em seguida, ele ser vitrificado. (CARNEVALE, 2004).

O processo de vitrificação é definido como a solidificação de uma solução sem a cristalização, por meio da elevação da viscosidade durante o rápido resfriamento. (FAHY et al., 1984; VAJTA et al., 1998).

Quando comparada com a congelação convencional, a vitrificação reduz o tempo do procedimento, bem como a economia em gastos com equipamentos para a execução da técnica. (CARNEVALE et al., 2004; ELDRIDGE-PANUSKA et al., 2005; CARNEVALE, 2006).

Segundo Rall e Fahy (1985), Carnevale et al. (2004) e também Moussa et al. (2005), durante esse procedimento o embrião é exposto a altas concentrações de crioprotetores por curto período de tempo e resfriado a uma velocidade de 2500°C/minuto, para que ocorra a formação de um estado vítreo ao invés de cristais de gelo.

A vitrificação proposta para embriões eqüinos é realizada em três passos. O meio 1 contém 1,4M de glicerol, onde o embrião permanece por 5 minutos; o meio 2 contém 1,4M de glicerol e 3,6M de etilenoglicol, onde o embrião permanece por 5 minutos e o meio 3 contém 3,4M de glicerol e 4,6M de etilenoglicol, neste o embrião deve permanecer por <1 minuto. O envase é realizado em palheta de 0,25mL, sendo

que as gotas das extremidades possuem 0,5M de galactose. (CARNEVALE et al. 2004; CARNEVALE, 2006).

As primeiras duas gestações de embriões eqüinos vitrificados foi descrita por Hochi et al. (1994) utilizando solução de vitrificação contendo 20% etilenoglicol em PBS por 10 a 20 minutos. A congelação ultra-rápida foi utilizada com sucesso para criopreservar embriões eqüinos por Oberstein et al. (2001), que compararam a eficiência de dois métodos ultra-rápidos de congelação (OPS e Cryoloop) com a congelação convencional de embriões <300µm grau 1 e 2. (VANDERWALL, 2000).

O meio de congelação teve como base 1,8M de etilenoglicol e 0,1M de sacarose e o meio de vitrificação utilizado neste experimento teve como base 16,5% de etilenoglicol, 16,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 0,5M de sacarose. Após a descongelação, os embriões foram cultivados por 20 horas e em seguida corados com iodeto de propídio e Hoechst 33342 para determinar a porcentagem de células vivas. A porcentagem destas foi de 74% para os embriões congelados e de 51% para os vitrificados. Esse estudo demonstrou que a vitrificação de embriões pequenos (<300µm) apresentou resultados semelhantes à congelação convencional.

Carnelave et al. (2004) realizaram experimento vitrificando embriões colhidos no dia 6 após a ovulação (D6), D7 e D8 para comparar a eficiência da técnica em criopreservar embriões pequenos e grandes, além de avaliar o método de transferência direta em relação a remoção dos crioprotetores após o aquecimento seguida de transferência. A taxa de desenvolvimento embrionário no D16 foi de 62% e 45% para os embriões pequenos (D6) vitrificados e transferidos diretamente e para os embriões pequenos que foi feita a remoção do crioprotetor, respectivamente. Os embriões grandes (D7 e D8) não resultaram em gestação após a vitrificação. A taxa de recuperação embrionária nesse experimento foi de 78% (28/36) para o D6 e 63% (30/48) para os D7 e D8, indicando que a taxa de recuperação de embriões no D6 é similar ao D7 e D8, contrariando Boyle et al. (1989), Vanderwall (2000), Castanheira et al. (2004) Stout et al. (2005) e Scherzer et al. (2008) que mostram menores taxas de recuperação para embriões menores coletados D6 ou D6,5. Carnevale et al. (2004) relataram taxas de 75% de gestação quando vitrificaram embriões <300µm. A recuperação embrionária no lavado das doadoras, 8 dias após o tratamento com hCG ou com outro indutor de ovulação nesse estudo foi de 80%, tornando essa técnica uma promessa comercial na indústria de cavalos de esporte.

No momento da vitrificação, o principal cuidado deve ser com a mudança repentina de temperatura. (MASSIP, 2011).

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

O procedimento ideal de vitrificação gera a possibilidade de utilizar um protocolo de criopreservação prático, rápido e eficaz, como a vitrificação, estimulando a aplicação técnica associada à transferência de embriões por um maior número de equipes em nível de campo. Nos tempos atuais, a técnica tradicional de congelamento continua sendo a mais largamente utilizada para a criopreservação de embriões *in vivo* e *in vitro*. Entretanto, na última década a técnica de vitrificação vem sendo testada e aprimorada em diferentes espécies, buscando um elevado grau de aproveitamento dos embriões criopreservados e aquecidos. Os efeitos benéficos da vitrificação são amplamente conhecidos, como a redução das crioinjúrias causadas pela não formação de cristais extra e intracelulares. Recentemente, a vitrificação vem sendo estudada e utilizada na criopreservação de embriões produzidos *in vitro* (FIV ou clonados) e embriões biopsados, gerando a obtenção de melhores resultados com embriões >300µm. Essa metodologia ideal com consistência de resultado para todo tipo de embrião equino ainda não foi desenvolvida, sendo necessário o incentivo a estudos aplicando diferentes meios de vitrificação (crioprotectores/concentrações), dispositivos para envasamento, curvas ultrarrápidas, micromanipulação, na tentativa de se obter uma melhor taxa de sobrevivência embrionária à criopreservação pela vitrificação.

### REFERÊNCIAS

BOYLE, M.S.; SANDERSON, M.W.; SKIDMORE, J.A.; ALLEN, W.R. Use of serial progesterone measurements to assess cycle length, time of ovulation and timing of uterine flushes in order to recover equine morulae. **Equine Vet. J.**, suppl.8, p.10-13, 1989.

CARNEVALE, 2006. **Vitrification of equine embryos** - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17129806> . Acessado em: 05 de Maio, 2013.

CARNEVALE, E.M.; ELDRIDGE-PANUSKA, W.D.; CARACCILO DI BRIENZA, V.; SEIDEL JUNIOR, G.E.; SQUIRES, E.L. Embryo development rates after vitrification and transfer of equine embryos. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE EMBRYO TRANSFER, 6, 2004, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Rio de Janeiro: ISEET, 2004. p.45-46.

CASTANHEIRA, P.N.; AMARAL, D.C.G.; VASCONCELOS, A.B.; ARANTES, R.M.E.; STAHLBERG, R.; LAGARES, M.A. Cryopreservation of equine embryo by vitrification. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE EMBRYO TRANSFER, 6, 2004, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Rio de Janeiro: ISEET, 2004. p.50-52,. CNA, 2003 - <http://www.cna.org.br/AgropecuariaAgora/Agora03/ag297.htm> . Acessado em: 05 de Maio, 2013.

CURCIO, Bruna da Rosa. **Maturação e Vitriificação de Oócitos Equinos Incubados em Meio Contendo Hormônio do Crescimento e Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-I.** 75f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal De Pelotas, Pelotas. 2005.

ELDRIDGE-PANUSKA, W.D.; CARACCILO DI BRIENZA, V.; SEIDEL JUNIOR, G.E.; SQUIRES, E.L.; CARNEVALE, E.M. Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos. **Theriogenology**, v. 63, p.1308-1319, 2005.

FAHY, G.M.; MACFARLANE, D.R.; ANGELL, C.A.; MERYMAN, H.T. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, v.21, p.407-426, 1984.  
GONSALVES, P. B. D; DE FIGUEIREDO, J. R; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas – Aplicadas à reprodução animal.** São Paulo: Editora Varela, p. 127 a 177. 2002.

HOCHI, S.; FUJIMOTO, T.; BRAUN, J.; OGURI, N. Pregnancies following transfer of equine embryos cryopreserved by vitrification. **Theriogenology**, v.42, p.483-488, 1994.

HUDSON, J.; MCCUE, P.M.; CARNEVALE, E.M.; WELCH, S.; SQUIRES, E.L. The effects of cooling and vitrification of embryos from mares treated with equine follicle-stimulating hormone on pregnancy rates after nonsurgical transfer. **J. Equine Vet. Sci.**, v.26, p.51-54, 2006.

MASSIP, Cryopreservation of embryos of farm animals. **Reprod Domest Anim**, v.36, p.49-55. 2001.

MOUSSA, M.; BERSINGER, I.; DOLIGEZ, P.; GUIGNOT, F.; DUCHAMP, G.; VIDAMENT, M.; MERMILLOD, P.; BRUYAS, F. In vitro comparisons of two cryopreservation techniques for equine embryos: Slow-cooling and open pulled straw (OPS) vitrification. **Theriogenology**, v. 64, p. 1619-1632, 2005.

NICACIO, A.C.; ASSUMPÇÃO, M.E.O; CAETANO, H.V.A.; GERGER, R.P.C.; MARQUES, M.G.; MELLO, M.R.P.; MENDES, C.M.; MILAZZOTTO M.P.; OLIVEIRA, V.P.; SIMÕES, R.; YAMADA, C.; VISINTIN, J.A. Criopreservação e desenvolvimento in vitro de embriões bovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 1, p. 51- 56, 2006.

OBERSTEIN, N.; O'DONOVAN, M.K.; BRUEMMER, J.E.; SEIDEL JR., G.E.; CARNEVALE, E.M.; SQUIRES, E.L. Cryopreservation of equine embryos by opened pulled straws, cryolop, or convencional slow cooling methods. **Theriogenology**, v.55, p.607-613, 2001.

RALL, W.F.; FAHY, G.M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. **Nature**, v.313, p.573-575, 1985.

SCHERZER, J.; FAYRER-HOSKEN, R.A.; RAY, L.; HURLEY, D.J.; HEUSNER, G.L. Advancements in large animal embryo transfer and related biotechnologies. **Reprod. Dom. Anim.**, v.43, p. 371-376, 2008.

STOUT, T.A.; MEADOWS, S.; ALLEN, W.R. Stage-specific formation of the equine blastocyst capsule is instrumental to hatching to embryonic survival *in vivo*. **Anim. Reprod. Sci.**, v.87, p.269-281, 2005.

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. **Mol. Reprod. Dev.**, v.51, p.53-58, 1998.

VANDERWALL, D.K. Current Equine Embryo Transfer Techniques. In: BALL, B.A. (Ed.). **Recent advances in equine theriogenology New Orleans**: International Veterinary Information Service, p.45-68. 2000,