

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA CAMPUS DE  
BOTUCATU.

**KAREN REGINA PERES**

**PRINCÍPIOS DA CRIOPRESERVAÇÃO DE  
EMBRIÕES DE EQÜÍDEOS**

Monografia apresentada à  
disciplina de Seminários I, do  
Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária, área de  
concentração em Reprodução  
Animal, curso de Mestrado.

ORIENTADOR(A): Prof<sup>a</sup>. Ass. Dr<sup>a</sup> . Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga

PROFESSORES RESPONSÁVEIS: Prof<sup>a</sup>. Adj. Maria Denise Lopes  
Prof<sup>o</sup>. Adj. Sony Dimas Bicudo

Botucatu – S.P.  
18/04/2002

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS _____	3
2. MORFOLOGIA E FISIOLOGIA DO EMBRIÃO EQÜINO _____	4
3. ASPECTOS DA CRIOPRESERVAÇÃO _____	11
3.1. Princípios da Criopreservação Celular _____	11
3.2. Crioprotetores _____	14
3.2.1. Mecanismos de ação dos crioprotetores _____	14
3.2.2. Remoção do Crioprotetor _____	16
3.3. Vitrificação _____	17
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS _____	18
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS* _____	19

## INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A demanda de técnicas viáveis para o transporte e comercialização de embriões, bem como a necessidade de se preservar genes desejáveis dentro de raças selecionadas tem estimulado as pesquisas sobre criopreservação de embriões eqüinos.

A capacidade de se criopreservar embriões de mamíferos é um poderoso auxiliar nos métodos de reprodução assistida. Dezenas de milhares de ratos e centenas de milhares de bovinos tem sido produzidos a partir de embriões criopreservados. Em contraste, cerca de 50 gestações e um pouco mais de 10 potros são frutos de embriões eqüinos criopreservados (LEIBO, 2000).

A primeira prenhez de um embrião eqüino criopreservado foi relatado por Griffin et al. (1981), sendo que o primeiro potro nascido de um embrião congelado foi reportado por Yamamoto et al. (1982); e desde então, várias tentativas para se congelar embriões eqüinos tem sido relatadas. Contudo, apesar dos estudos usando-se diferentes estágios do desenvolvimento embrionário, taxas de resfriamento e diferentes tipos e concentrações de crioprotetores, os resultados obtidos não são satisfatórios. Outro fator a ser considerado é a inabilidade em se superovular éguas, o que limita o número de embriões avaliados nas pesquisas (DOBRINSKY, 2002).

A tecnologia de embriões também apresenta grande importância na conservação de eqüídeos, visto que pode ser a salvação de espécies que estão desaparecendo devido a caça predatória ou ao cruzamento indiscriminado com outras raças de cavalos, como o cavalo selvagem de Roraima e o jumento nordestino, entre outros (FARINASSO et al., 1989).

A criopreservação de oócitos também tem sido bem sucedida em várias espécies de mamíferos com a intenção de se preservar o material genético de animais valiosos que podem morrer inesperavelmente. Nas espécies murina, bovina e humana os oócitos criopreservados conseguem se desenvolver após o descongelamento, entretanto, oócitos eqüinos criopreservados não são fertilizados com sucesso (HOCHI et al., 1994 apud HURTT, 1999). Recentemente, Maclellan et al. (2002) relataram o nascimento dos dois primeiros potros produzidos através da transferência de óocitos vitrificados.

Com o objetivo de delimitarmos as possíveis causas do insucesso da criopreservação de embriões de eqüídeos, em contraposição a outras espécies, este estudo apresenta aspectos morfo-fisiológicos do embrião eqüino e os princípios da criopreservação celular.

## 1. MORFOLOGIA E FISIOLOGIA DO EMBRIÃO EQÜINO

Quando um folículo ovariano maduro ovula, o oócito é referido como oócito secundário; o primeiro corpo polar está formado e o desenvolvimento está parado na fase de metáfase da segunda divisão meiótica (Metáfase II); em 30% dos casos, o oócito é ovulado imaturo, em Metáfase I, completando a segunda divisão meiótica na tuba uterina. Após a ovulação, o oócito não fertilizado, circundado pelas células do “cumulus oophorus”, uma matriz celular gelatinosa, é captado pelo infundíbulo do oviduto (tuba uterina) e é rapidamente transportado para a junção ístmo - ampola onde ocorre a fertilização. A fertilização pode ser reconhecida pela presença de dois pró-núcleos (masculino e feminino), pela formação do segundo corpúsculo polar ou pela clivagem (VANDERWALL, 1996).

Após a fertilização, as células do “cumulus oophorus” são perdidas, e o segundo corpúsculo polar encontra-se evidente em 12 horas após a ovulação. A primeira clivagem ocorre aproximadamente 24 horas após a fecundação e as divisões subsequentes ocorrem com 12 a 24 horas de intervalo (BEZARD et al., 1989). Após a primeira clivagem, cada célula é denominada de blastômero. O estágio de clivagem do embrião é referido de acordo com o número de células presentes, tal como, uma-célula, duas-células, quatro e então até o estágio de 16 células (VANDERWALL, 1996).

Oócitos recém ovulados apresentam um formato esférico, em contraste aos embriões de duas ou quatro células que normalmente são elipsoidais. No estágio de 8 células os embriões geralmente voltam a ser esféricos. No estágio de 8 a 16 células junções comunicantes são formadas entre os blastômeros causando a compactação. Entre os estágios de 16 e 32 células, como os blastômeros não são facilmente identificados, o embrião é referido como mórula pré-compacta ou inicial. A continuidade das divisões celulares e a formação de junções comunicantes levam a formação da mórula compacta, que é uma massa compacta de pelo menos 32

blastômeros. A mórula compacta é o último estágio de desenvolvimento do embrião encontrado no oviduto (BETTERIDGE et al., 1982).

Baseado em lavagens do oviduto, normalmente são coletados embriões de 4 a 8 células no 2º dia após a detecção da ovulação, e embriões de 8 a 16 células no 3º dia. Geralmente os embriões com 6 dias estão no estágio de mórula compacta ou de blastocisto inicial. Com 7 dias geralmente são blastocistos expandidos (McKINNON et al., 1993). Assim, cada estágio do desenvolvimento embrionário, normalmente é encontrado dentro de uma faixa de tempo após a ovulação, e não em um dia fixo; além disso, também ocorre variações entre as espécies, demonstrando haver diferença no tempo de migração do embrião, do oviduto até o útero (SUGIE et al., 1995). Freeman et al. (1991) determinaram o tempo exato do transporte do embrião através do oviduto da égua, que é entre 130 e 142 horas após a ovulação (5 dias e 10 hs a 5 dias e 22 horas). Eles também determinaram que os embriões não aumentam significativamente de tamanho até o momento em que eles entram no lúmen uterino; o diâmetro do embrião (incluindo a zona pelúcida) imediatamente antes, durante e imediatamente após o período de transporte no oviduto, relatado por Freeman et al., foi de 157, 163 e 168µm, respectivamente; e, o diâmetro de um oócito não fertilizado foi de aproximadamente 152µm.

A égua é o único animal doméstico que geralmente retém no oviduto os oócitos não fertilizados, que acabam se degenerando ao longo de um período de 7-8 meses (NIEKERK & GERNEKE, 1966 apud MCKINNON et al., 1993). O transporte seletivo parece ser iniciado por uma característica do embrião equino, mas, que não está presente em óvulos não fertilizados (VANDERWALL et al., 1993; WEBER & WOODS, 1993). Weber & Woods (1993) observaram que embriões de 6 dias incubados *in vitro* secretaram quantidades mínimas de proteínas, esteróides e prostaglandina  $F_{2\alpha}$ , entretanto, secretaram quantidades relativamente altas de prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ),  $42,0 \pm 11,5$  pg ( $10^{-12}$ g) de  $PGE_2$  por embrião. Essa secreção embrionária não foi detectada no 3º e 4º dia, mas, no 5º dia, detectou-se uma quantidade de  $5,7 \pm 1,0$  pg de  $PGE_2$ , por embrião. Uma correlação positiva entre o diâmetro do embrião e a secreção de  $PGE_2$  foi demonstrada por Vanderwall et al. (1993).

Portanto, a PGE<sub>2</sub> parece ser o sinal do embrião equino que inicia o transporte seletivo do oviduto em éguas, provocando um relaxamento da musculatura da junção ampola-istmo e do istmo, enquanto os não fertilizados são retidos na ampola do oviduto. A secreção de PGE<sub>2</sub> também está envolvida na manutenção inicial do corpo lúteo, a partir de uma ligação específica com o oviduto equino (VANDERWALL et al., 1993).

A administração sistêmica de PGE<sub>2</sub> não prolonga a função do corpo lúteo em éguas não - gestantes, mas a infusão local (intraoviduto) de PGE<sub>2</sub> é efetiva, porque o transporte do embrião no oviduto é acelerado pela administração de PGE<sub>2</sub> por esta via (VANDERWALL et al., 1993). Weber & Woods (1993) verificaram que o transporte pelo oviduto é acelerado significativamente em éguas, cujo oviduto, foi infundido continuamente com PGE<sub>2</sub> (0,01 mg / 24 hs), em relação a éguas cujo oviduto foi infundido com solução salina ou que não foram tratadas (6/11 x 0/11 x 0/11, respectivamente).

O entendimento do mecanismo de transporte no oviduto, tem implicações no desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida na égua. Por exemplo, a criopreservação de embriões de equinos tem apresentado melhores resultados para embriões com diâmetros menores que 250µm (SLADE et al., 1985; SQUIRES et al., 1989; MEIRA et al., 1993); contudo, existem duas limitações inerentes para se obter embriões nesta faixa de tamanho. Primeiro, os embriões devem ser recuperados do lúmen uterino no dia 6 pós-ovulação, quando alguns autores relatam que as taxas de recuperação são menores (SLADE et al., 1985; MEIRA et al., 1993; FERREIRA et al., 1997), possivelmente porque o embrião ainda esteja no oviduto na hora da recuperação do embrião, por exemplo, quando o momento da ovulação não foi adequadamente observado (1 palpação por dia), ou também, pela dificuldade do técnico em identificar o embrião. Segundo, alguns embriões já são maiores do que 250µm no dia 6 (Tabela 2). A menor taxa de sobrevivência após o congelamento, de embriões com diâmetro maior que 250µm possivelmente deve-se a baixa permeabilidade ao crioprotetor, decorrente da existência da cápsula, durante a adição e/ou a remoção; e também pela pequena relação superfície – volume (YOUNG et al., 1997).

A tabela 1 apresenta taxas de recuperação embrionária obtidas por alguns autores do dia 6 ao dia 9, após a detecção da ovulação; podemos observar que a informação de que a taxa de recuperação embrionária é menor no 6º dia, não é unânime. A tabela 2, por sua vez, apresenta o diâmetro embrionário de embriões coletados do 6º ao 9º dia após a ovulação.

<b>TABELA 1- Taxas de Recuperação Embrionária realizada do 6º ao 9º dia após a detecção da ovulação.</b>		
<b>Dia após a ovulação</b>	<b>Índice de Recuperação</b>	<b>Referência</b>
<b>6</b>	61% (63/103) 55% (70/127) 62 % (86/137) 55 % (70/127) 46% (60/130) 63 % (127/203)	Slade et al., 1985 Meira et al., 1993 Squires, 1993 Landim e Alvarenga, 1995 Ferreira et al., 1997 Peres et al., 2002
<b>7</b>	76 % (73/96) 56% (23/41) 69% (18/26) 49,3 % 60 %	Squires, 1993 Meira et al., 1993 Ferreira et al., 1997 Fleury, 1998 Peres et al., 2002
<b>8</b>	74,4 % (218/293) 58% 65% (195/301)	Squires, 1993 Fleury, 1998 Peres et al., 2002
<b>9</b>	81,1 % (43/53) 54,4 % 72 % (18/25)	Squires, 1993 Fleury, 1998 Peres et al., 2002

<b>TABELA 2 – Efeito do dia da coleta sobre o diâmetro do embrião.</b>			
<b>Dia da Coleta</b>	<b>Diâmetro do Embrião em <math>\mu\text{m}</math> (<math>10^{-6}</math>)</b>		<b>Referência</b>
	<b>Média</b>	<b>Taxa de variação</b>	
<b>6</b>	201	132-380	Squires, 1993
	208	132-756	Vanderwall, 1996
<b>7</b>	488	136-1284	Squires, 1993
	406	136-1460	Vanderwall, 1996
<b>8</b>	1368	369-3980	Squires, 1993
	1132	120-3980	Vanderwall, 1996
<b>9</b>	2220	730-4520	Vanderwall, 1996

Após entrar no útero, continuando o desenvolvimento, a mórula desenvolve a blástula, que é caracterizada pela formação de uma cavidade repleta de fluido (blastocele) dentro da mórula. Durante os estágios iniciais do desenvolvimento da blastocele, o embrião é referido como blastocisto inicial (VANDERWALL, 1996). Quando a blastocele encontra-se plenamente formada, ela está forrada por uma camada simples de células de origem da ectoderme denominada de trofoblasto. A maior parte do trofoblasto irá eventualmente contribuir na formação da placenta. Em adição, uma população de células do trofoblasto, de um dos pólos, se projeta para dentro da blastocele, formando uma massa celular interna, o embrioblasto ou botão embrionário, que é o precursor do embrião. Com a formação da blastocele, o embrião aumenta dramaticamente de tamanho sendo referido como blastocisto expandido (VANDERWALL, 1996).

Logo após a entrada do embrião no útero, também ocorre a formação de uma cápsula acelular entre a zona pelúcida e as células do trofoblasto (Figura 1). Durante alguns dias a cápsula permanece recoberta pela zona pelúcida, que não eclode durante a expansão do blastocisto, como no caso de outras espécies; mas, que vai tornando-se progressivamente mais fina até a ocorrência da eclosão do embrião. Como o blastocisto expande, a cápsula engrossa pelo menos até o 11º dia. O embrião fica ainda recoberto pela cápsula acelular até aproximadamente o 26º dia de gestação quando, então, aparentemente se fragmenta (LANDIM E ALVARENGA, 1995).

A cápsula é constituída por dois componentes principais: uma matriz com estrutura semelhante ao colágeno, pois o tratamento com colagenase do tipo II, embora não a destrua totalmente, a torna mais flexível; e por uma série de glicoproteínas que se coram com PAS e com ácido fosfotungstico (BETTERIDGE, 1989 apud LANDIM E ALVARENGA, 1995).

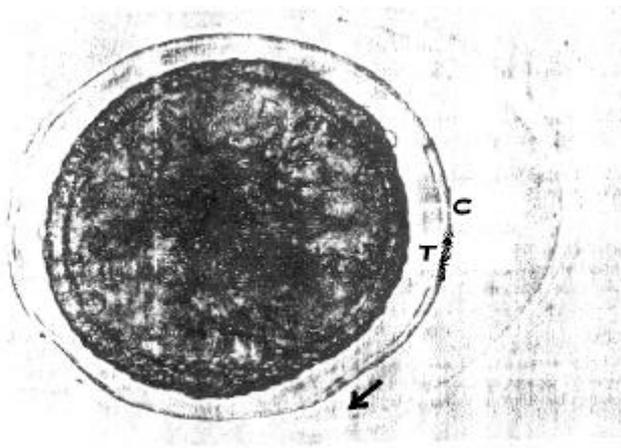
A cápsula parece ser impermeável a vírus e bactérias, como sugere sua estrutura, mas, assim como a zona pelúcida, provavelmente é permeável a macromoléculas. Flood (1993) relata que ela é permeável a proteínas com um peso molecular de 200.000, mas que dificulta a difusão da ferritina (PM = 450.000). Mesmo quando sua espessura é fina, a cápsula é bastante resistente e representa uma estrutura importante para o desenvolvimento do embrião de equino. Caracteriza-se por ser um envoltório sujeito a pressões consideráveis durante a fase de migração do embrião através do útero, fenômeno fundamental para que ocorra o reconhecimento materno da gestação. Durante a migração, a forma esférica da vesícula sofre

distorções, contudo a elasticidade e resistência da cápsula protegem o embrião das contrações uterinas. A mobilidade do embrião termina ao redor do 15º ao 17º dia de gestação, antes do desaparecimento da cápsula (GINTHER, 1992).

Alguns estudos mostram que a cápsula pode interferir com a criopreservação de embriões. Legrand et al. (2000) avaliou a relação entre a espessura da cápsula e o dano celular em embriões tratados com crioprotetores com ou sem congelamento, concluindo que embriões congelados e descongelados com uma cápsula espessa sofrem mais danos do que aqueles com uma cápsula fina ou sem a cápsula.

**Figura 1-** Blastocisto expandido de 8 dias (embrião de qualidade Grau 1)

Seta = zona pelúcida; C = cápsula embrionária; T = trofoblasto



Fonte: MEIRA & HENRY, 1991.

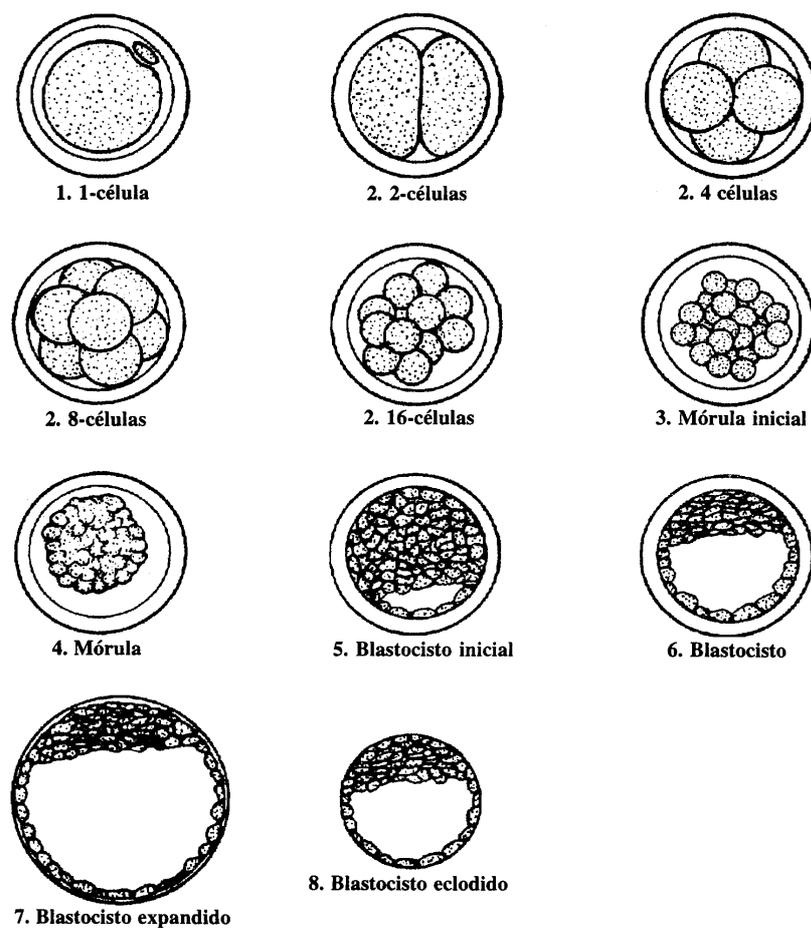
Oriol et al. (1993) estudaram a cápsula de embriões de cavalo (*Equus caballus*) e de jumento (*Equus asinus*), e observaram que a composição de carboidratos é comum para ambas as espécies, mas há uma substancial diferença na quantidade e proporção de ácido siálico, sendo menor para o jumento. O tamanho do embrião também é similar entre as espécies; entretanto, a massa seca (peso) da cápsula do embrião de jumento é apenas cerca de 50% da do cavalo, sugerindo que ela seja mais fina.

Com a intenção de facilitar o entendimento, um esquema (Figura 2) demonstrando os estágios do desenvolvimento embrionário, pode ser visto a seguir; entretanto, este esquema foi formulado para embriões de bovinos. Para adaptarmos este esquema para a espécie eqüina, devemos acrescentar a cápsula embrionária e as informações de Sugie et al. (1988).

Segundo Sugie et al. (1988), o estágio de 1 célula pode ser encontrado no dia da ovulação e um dia após; o estágio de 2 células, por sua vez, pode ser encontrado no dia da ovulação e até o 2º dia após a ovulação; o estágio de 4 células, no dia 1 ou 2 pós-ovulação; o embrião no estágio de 8 células, no 2º e 3º dia; a mórula inicial é encontrada do 2º ao 4º dia; a mórula compacta, do 4º ao 5º dia; o blastocisto inicial do 5º ao 6º dia; o blastocisto, do 6º ao 7º dia; o blastocisto expandido, do 7º ao 8º dia; e o blastocisto eclodido, do 8º ao 9º dia pós-ovulação.

Este esquema demonstra um blastocisto em eclosão; para a espécie eqüina, como já salientado, devemos considerar que no momento da eclosão ocorre a perda da membrana pelúcida, mas a cápsula permanece.

**Figura 2-** O código para estágio de desenvolvimento é numérico, o número 1 identifica um oócito não fecundado ou embrião de uma célula. O número 2 identifica embriões com 2 a 16 células (período de clivagem). O número 3 identifica uma mórula inicial e os números 4 a 9 identificam embriões nos estágios pós-compactação, conforme ilustrado.



Adaptado de STRINGFELLOW & SEIDEL, 1999.

Através da análise ultra-estrutural de embriões eqüinos congelados em meio contendo glicerol (1,35M) e utilizando curva de congelamento convencional, Barry et al. (1989) concluíram que as células do botão embrionário (massa celular interna) parecem ser mais suscetíveis aos danos causados pela criopreservação, do que as células do trofoblasto.

## 2. ASPECTOS DA CRIOPRESERVAÇÃO

### 2.1. Princípios da Criopreservação Celular

Os termos “criopreservação” e “congelamento” não são sinônimos. Criopreservação refere-se a preservação de células através do armazenamento a baixas temperaturas, induzindo a parada quase que total da atividade enzimática intracelular, da respiração celular, do metabolismo, do crescimento, da multiplicação, enfim, através da redução drástica da atividade fisiológica; enquanto congelamento significa a mudança do estado líquido para sólido. Da mesma forma que a água se transforma em gelo, os óleos se transformam em gordura quando a temperatura é abaixada. Um processo similar deve ocorrer com os lipídeos das membranas celulares. Desta forma, muitos outros eventos acontecem durante o processo de criopreservação celular, além da simples mudança da água para gelo (SEIDEL, 1986 e 1989).

Os princípios de criopreservação são similares para todos os tipos celulares (MUNAR, 1988). A maioria desses princípios são consequência de leis da natureza, como as leis da termodinâmica. Baseado nessas leis, Mazur (1963 e 1970) apud Landim e Alvarenga (1995) desenvolveu os conceitos teóricos que possibilitaram o sucesso da armazenagem de embriões de mamíferos.

Os embriões podem ser congelados por métodos convencionais ou por vitrificação (SEIDEL, 1996).

Na criopreservação convencional, o aspecto mais importante é a necessidade de se remover a maior parte da água das células antes que ocorra a congelamento; se isto não for realizado, formam-se grandes cristais de gelo intracelulares, resultando em vários danos e, freqüentemente, em morte celular (MUNAR, 1988).

Por outro lado, a desidratação celular extrema, que ocorre quando a congelamento é realizada de forma lenta, também é prejudicial, já que as estruturas

celulares são submetidas aos “efeitos da solução” por exposição durante períodos prolongados, antes da congelação, à elevada concentração de eletrólitos, alteração de pH e à própria desidratação (MUNAR, 1988).

O gelo é um cristal de água pura, desta forma, a formação de cristais de gelo deixa a água não congelada, entre os cristais, com uma alta concentração de substâncias dissolvidas (principalmente NaCl e o meio para embriões com crioprotetor), e este líquido hiperosmótico atrai a água para fora das células embrionárias, tornando a água não congelada cada vez mais hiperosmótica (SEIDEL, 1996). Este processo provoca um aumento da pressão osmótica na célula, uma vez que a concentração total de solutos dentro e fora deve estar sempre em equilíbrio. Em resposta a esse “stress”, a água sai da célula e o soluto entra. O processo cessa quando a concentração de soluto se torna grande o bastante para prevenir futuras transformações de água em gelo (STOREY & STOREY, 1990 apud LANDIM E ALVARENGA, 1995).

A natureza exata dos danos causados pelo congelamento e descongelamento aos tecidos não está totalmente esclarecida. Aparentemente o dano causado pelo congelamento é uma consequência da pressão diferencial de vapor entre o gelo e a água, em temperaturas abaixo de 0°C. A teoria diz que uma grande pressão de vapor de água poderia causar sua redistribuição, levando à injúria por desidratação durante o congelamento lento e a ruptura das membranas celulares, durante o congelamento rápido (PICKETT, 1986 apud LANDIM E ALVARENGA, 1995); ou seja, se o resfriamento for lento, mais água é puxada das células, aumentando os cristais de gelo extracelular, e a água não-congelada restante torna-se cada vez mais hiperosmótica; como o resfriamento é lento, as células são expostas a longos períodos a esta condição hiperosmótica, resultando em danos devido a esta importante desidratação; tal dano é denominado de *Efeitos da Solução* (SEIDEL, 1996). Por outro lado, se a célula for resfriada rapidamente, ela não perde água com rapidez suficiente para manter o equilíbrio osmótico, provocando um super resfriamento e o congelamento intracelular, que leva a lise das membranas (SEIDEL, 1996).

Assim, os danos causados aos tecidos durante os processos de congelamento e descongelamento são devido principalmente a: a) formação de cristais de gelo intracelulares, que afetam a estrutura da célula; b) concentração de soluto resultante do processo de desidratação, que ocorre durante o congelamento tanto no meio extra

como intracelular; c) interação entre estes dois fatores (LANDIM E ALVARENGA, 1995).

GAO et al. (1993), ao estudarem a tolerância de espermatozóides humanos a soluções hiperosmóticas observaram que, quando uma suspensão celular é resfriada, os solutos extracelulares, inclusive os agentes crioprotetores, se tornam progressivamente mais concentrados, enquanto a água é precipitada sob a forma de gelo. Tal fato cria um ambiente hiperosmótico para as células, o qual pode causar mudanças de pH, pois os tampões salinos deixam de ser solúveis; aumento da desidratação celular, resultando em ligações cruzadas das estruturas intracelulares e ainda enfraquecimento dos complexos lipoproteicos nas membranas celulares, com aumento da perda de fosfolipídeos.

Se a redução do volume celular atingir um patamar crítico, a bicamada de fosfolipídeos da membrana celular fica muito comprimida e sua estrutura se quebra. Com isso, as funções de transporte e proteção da membrana não podem ser mantidas ao mesmo tempo que rupturas na membrana promovem uma ponte para a entrada do gelo extracelular para o interior da célula (STOREY & STOREY, 1990 apud LANDIM E ALVARENGA, 1995).

Existe um gradiente ótimo de resfriamento para a sobrevivência das células criopreservadas que é suficientemente lento para prevenir a cristalização da água intracelular e suficientemente rápido para prevenir a exposição das células a elevadas concentrações de eletrólitos antes da congelação (MUNAR, 1988; SEIDEL, 1996).

O ponto de congelamento de um meio de cultura típico contendo quantidades padrões de crioprotetor é de aproximadamente  $-3^{\circ}\text{C}$ . Como tais soluções estão resfriadas, o super-resfriamento normalmente ocorre (SEIDEL, 1989). Isto pode ser prevenido pela “indução” ou “seeding”, isto é, a formação forçada de gelo (pré-congelamento), a aproximadamente  $-6^{\circ}\text{C}$ , que pode ser induzida pela adição de um pequeno cristal de gelo na amostra, ou provocando um contato entre a parte de fora do recipiente com um metal resfriado com nitrogênio líquido, ou pelo uso de ar frio sobre a superfície da amostra, ou ainda pelo uso de aparelhos que induzem a cristalização do gelo automaticamente. Se o “seeding” não é realizado, a solução contendo os embriões pode ser super-resfriada a temperaturas abaixo de  $-20^{\circ}\text{C}$  sem a formação de gelo. Nestas condições a desidratação celular não ocorre, e quando finalmente ocorre o congelamento, grandes cristais de gelo se formam dentro e fora das células (SEIDEL, 1989 e 1996).

## 2.2. Crioprotetores

Para otimizar a sobrevivência das células com a criopreservação convencional, são adicionados crioprotetores ao meio. Existem duas classes de crioprotetores: (1) não-permeáveis ou extracelulares, como a sacarose, rafinose, proteínas, lipoproteínas e soro albumina; e (2) permeáveis ou intracelulares, como o dimetilsulfóxido (DMSO), o glicerol, o propanodiol, o propilenoglicol e o etilenoglicol (SEIDEL, 1989; KASAI, 1996). Em muitos casos são utilizados os crioprotetores permeáveis e não-permeáveis em conjunto (ROWE, 1966).

### 2.2.1. Mecanismos de ação dos crioprotetores

O mecanismo de ação dos crioprotetores não é bem conhecido, mas, a diminuição do ponto de congelação (elevando a osmolaridade intracelular), a diminuição dos efeitos das altas concentrações de moléculas (estabilizando a membrana celular) e alteração na estrutura física do gelo são mecanismos relatados (SEIDEL, 1989 e 1996).

A primeira função do crioprotetor é de baixar o ponto de solidificação; isto é benéfico por várias razões, mas, principalmente, porque fornece um maior tempo para a ocorrência da desidratação da célula, diminuindo a formação de cristais de gelo intracelulares. A concentração de crioprotetores, normalmente utilizada, pode causar uma queda do ponto de congelamento em 2 a 3° C. Contudo, o efeito do abaixamento pode ser multiplicado várias vezes na solução mais concentrada, que está entre os cristais de gelo e o fluido intracelular. Então, o congelamento, especialmente o congelamento intracelular, ocorre a temperaturas mais baixas na presença de crioprotetores, o que pode ser benéfico (SEIDEL, 1989).

O segundo mecanismo de crioproteção é diminuir os efeitos das altas concentrações de moléculas, como a desidratação celular. As moléculas tornam-se dissolvidas nesta mistura de crioprotetor e água, e isto pode ser menos danoso para estas células, em contraposição àquelas que estão, numa maior concentração, ou seja, em pouco líquido e sem crioprotetor. Este conceito é chamado de “tampão” (SEIDEL, 1986 e 1989).

Uma terceira função pode ser a formação de uma espécie de vidro, ao invés do cristal, que é formado pela mistura intracelular de água e crioprotetor (SEIDEL, 1989).

Uma quarta função do crioprotetor parece ser sua interação com a membrana celular exercendo uma ação estabilizadora durante as mudanças de um estado relativamente líquido, para um estado sólido e, talvez até mais importante, na volta para o estado líquido no descongelamento. Por exemplo, o crioprotetor parece diminuir a fragilidade das membranas impedindo que estas se quebrem (SEIDEL, 1986).

A adição de crioprotetores permeáveis causa nas células uma retração temporária devido à concentração utilizada, que faz com que a água das células saia rapidamente por osmolaridade para diluir os crioprotetores. Contudo, dentro de poucos minutos, os crioprotetores permeiam as membranas da célula e então as concentrações de dentro e de fora da célula igualam-se, levando a água a entrar dentro das células, que retornam ao seu tamanho normal. A retração inicial das células que ocorre no momento do contato com os crioprotetores pode ser minimizada pela adição gradual do crioprotetor. Entretanto, esta retração aparentemente não causa grandes danos aos embriões, por isso, em alguns protocolos os crioprotetores são adicionados em uma única etapa (SEIDEL, 1996).

O crioprotetor não-permeável mais comum é a sacarose, que pode exercer um efeito osmótico significativo, e então é freqüentemente empregado na diluição ou reidratação de oócitos e embriões após o descongelamento (HURTT, 1999).

Apesar dos efeitos benéficos do crioprotetor, não existe uma técnica de criopreservação celular que permita 100 % de sobrevivência após o congelamento e descongelamento, mesmo utilizando curvas de resfriamento e aquecimento consideradas ótimas. Existem duas razões para justificar as falhas na ação dos crioprotetores; primeiro, a toxicidade do crioprotetor limita a concentração em que este pode ser utilizado antes do resfriamento e, portanto, limita a eficácia da ação crioprotetora; segundo, os agentes crioprotetores podem ter uma ação direta na produção de crio injúrias, como por exemplo, alterando a polaridade do meio extracelular lesando as membranas (LANDIM E ALVARENGA, 1995).

Existem vários protocolos de congelação que utilizam diferentes crioprotetores com diferentes etapas e temperaturas de adição e de remoção e várias velocidades de congelação e de descongelação.

No método convencional, normalmente, o resfriamento após a adição do(s) crioprotetor(es) é realizado até uma temperatura de  $-6$  ou  $-7^{\circ}\text{C}$ , numa taxa de  $0,3^{\circ}$  a  $0,5^{\circ}\text{C} / \text{min}$ , quando então é induzida a cristalização. Após o “seeding” e o tempo de equilíbrio, os embriões são resfriados para uma temperatura de  $-25$  ou de até  $-80^{\circ}\text{C}$ , numa taxa descrita de  $-0,1$  a  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , e então são mergulhados em nitrogênio líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), onde ficarão armazenados. O descongelamento dos embriões pode ser realizado no ar, em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$ , ou numa combinação destes.

O glicerol é o crioprotetor mais comumente utilizado para se criopreservar embriões de estágios mais precoces, Landim e Alvarenga et al. (1993) obtiveram 40% de prenhez congelando embriões coletados no 6<sup>o</sup> dia após a ovulação, sendo utilizada uma solução com 11% de glicerol. Poitras et al. (1994) conseguiram que 67,5 % dos embriões, coletados no dia 6,5 pós- ovulação e congelados com 10 % de glicerol, mantivessem ou aumentassem sua qualidade após 24 horas de cultivo.

A criopreservação com etileno glicol é um método promissor para blastocistos eqüinos expandidos, devido a sua alta permeabilidade (O'DONOVAN et al., 2000). Rosas et al. (1997) obtiveram 83,3% de desenvolvimento embrionário *in vitro*, congelando embriões de 6 e 7 dias com etileno glicol na concentração de 1,5M.; e Hochi, et al. (1996) alcançaram taxas de 25% de prenhez utilizando o etileno glicol, mas o uso combinado com 0,1M de sacarose elevou essa taxa para 63,6%.

Já os estudos com 1,2 propanodiol demonstraram que ele tem uma toxicidade mínima para embriões eqüinos, todavia, oferece uma crioproteção baixa. Uma taxa de prenhez de 0% foi obtida por Meira et al. (1993) na tentativa de se criopreservar mórulas e blastocistos iniciais com propanodiol.

### 2.2.2. Remoção do Crioprotetor

A remoção de crioprotetores permeáveis após o descongelamento é um problema sério porque as células são facilmente danificadas neste processo. Quando as células com alta concentração intracelular de crioprotetor são colocadas em um meio sem crioprotetor, a água desloca-se para dentro das células para diluir osmoticamente o crioprotetor, de forma mais rápida que o crioprotetor leva para difundir-se para fora da célula, visto que as células são muito mais permeáveis a água do que aos crioprotetores. A solução mais comum para este problema é remover o

crioprotetor lentamente em séries de três a dez etapas, a uma taxa de 3 a 10 minutos por etapa; deste modo as células incham ligeiramente, a cada passo, retornando ao tamanho normal quando as concentrações intra e extracelular do crioprotetor tornam-se iguais. Um segundo método para a remoção do crioprotetor das células é o de colocar os embriões em um meio contendo uma alta concentração de uma molécula (crioprotetor) não-penetrante como a sacarose. Nesta situação, a tendência da água entrar na célula para diluir o crioprotetor é balanceada pela tendência da água sair da célula devido a alta concentração extracelular de sacarose. Então as células não incham, mas, encolhem após a difusão do crioprotetor para fora das células embrionárias. Isto causa um pequeno dano, entretanto, as células retornam ao tamanho original após a remoção do crioprotetor do meio com o soluto não-penetrante (SEIDEL, 1996).

### 2.3. Vitriificação

Uma outra forma de se criopreservar embriões é através da vitriificação. Neste caso, o componente essencial de uma solução de vitriificação é o crioprotetor permeável, que são utilizados em altas concentrações. Como resultado, os fluidos intra e extracelular tornam-se mais viscosos com a ocorrência do resfriamento, antes da formação de cristais de gelo. A falta dos danos causados pelos cristais de gelo é a maior vantagem deste método (KASAI, 1996; SEIDEL, 1996).

A vitriificação também tem desvantagens. A alta concentração do crioprotetor pode ser tóxico para o embrião; que pode ser minimizada pela diminuição do tempo de exposição ao crioprotetor antes do congelamento, e pela adição do crioprotetor a baixas temperaturas (KASAI, 1996; SEIDEL, 1996).

O processo de vitriificação tem chamado a atenção porque é simples, é realizado em pouco tempo e não requer equipamentos caros (OBERSTEIN et al., 2001)

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Enquanto um enorme número de embriões bovinos e murinos tem sido criopreservados, um resultado insatisfatório é obtido com embriões eqüinos. Algumas particularidades morfo-fisiológicas do embrião, somadas ao conhecimento dos mecanismos fundamentais de congelamento, podem ajudar a elucidar as injúrias sofridas pelo embrião.

Até o momento, algumas explicações foram referidas:

Embriões eqüinos menores e nos estágios iniciais sobrevivem melhor a criopreservação do que os embriões grandes ou em estágio avançado; existem várias hipóteses para a insatisfatória sobrevivência de blastocistos expandidos, incluindo a desidratação insuficiente da blastocele, uma menor permeabilidade ao crioprotetor devido uma pequena relação superfície / volume e a presença da cápsula, e a toxicidade dos crioprotetores.

Outra característica dos embriões eqüinos que é correlacionada com a mudança na tolerância a criopreservação é o desenvolvimento da cápsula. Postula-se que a espessura da cápsula dificulta o movimento do crioprotetor; de tal forma, que ele não consiga entrar e sair facilmente das células.

Uma outra possibilidade para o fracasso, é que a massa celular interna pode ter um parâmetro para a criopreservação que difere daquele das células do trofoblasto.

Devido a todas estas particularidades, os protocolos de criopreservação não podem ser extrapolados de outras espécies; há a necessidade de pesquisas que tenham o intuito de promover a sobrevivência de embriões eqüinos, principalmente em estágios mais desenvolvidos (D7 e D8).

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

BARRY, B.E.; THOMPSON JR., D.L.; WHITE, K.L.; et al. Viability of inner cell mass versus trophectodermal cells of frozen-thawed horse embryos. **Equine Veterinary Journal**. Suppl. 8, p. 82-83, aug. 1989.

BETTERIDGE, K.J.; EAGLESOME, M.D.; MITCHELL, D.; et al. Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: Observations on fresh specimens. **Journal Anatomy**. v. 135, p. 191-209, 1982.

BEZARD, J.; MAGISTRINI, M.; DUCHAMP, G.; et al. Chronology of equine fertilization and embryonic development in vivo and in vitro. **Equine Veterinary Journal**. Suppl. 8, p. 105-110, aug. 1989.

DOBRINSKY, J.R. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 285-302, jan. 2002.

FARINASSO, A.; DE FARIA, C.; DA S. MARIANTE, A.; et al. Embryo technology applied to the conservation of equids. **Equine Veterinary Journal**, Suppl. 8, p.84-86, aug. 1989.

FERREIRA, J.C.P.; MEIRA, C.; PAPA, F.O.; et al. Criopreservação de equine embryos with glycerol plus sucrose and glycerol plus 1,2-propanediol. **Equine Veterinary Journal**, Suppl. 25, p. 88-93, dec. 1997.

FLEURY, J.J. O Dia da colheita na taxa de recuperação embrionária em eqüinos em uma central de transferência de embriões comercial. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, Porto Alegre, v. 26, n.1, p.268, 1998.

FLOOD, P.F. Fertilization, early development, and the establishment of the placenta. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. (Eds). **Equine Reproduction**. USA: Williams & Wilkins, 1993. p. 473-485.

FREEMAN, D.A.; WEBER, J.A.; GEARY, R.T.; et al. Time of embryo transport through the mare oviduct. **Theriogenology**, v.36, p.823-830, 1991.

GAO D.Y.; ASHWORTH E.; WATSON, P.F. et al. Hyper osmotic tolerance of human spermatozoa: Separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis. **Biology of Reproduction**, v. 49, p.112-23, 1993.

GINTHER O.J. Maternal Aspects of Pregnancy. In: **Reproductive Biology of the Mare**. 2 ed., Wisconsin: Equiservice, 1992. p.302.

\*ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2000. 22p.

GRIFFIN, J.L.; CASTLEBERRY, R.S.; SCHNEIDER, H.S.Jr. Influence of day of collection on recovery rate in mature cycling mares (abstract). **Theriogenology**, v. 15, p. 106, 1981.

HOCHI, S.; MARUYAMA, K.; OGURI, N. Direct transfer of equine blastocysts frozen-thawed in the presence of ethylene glycol and sucrose. **Theriogenology**, v. 46, p. 1217-1224, 1996.

HURTT, A.E. **Vitrification of equine and bovine oocytes using open pulled straws**. 1999. Dissertation (Master of Science) – Colorado State University, Colorado.

KASAI, M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p.67-75, 1996.

LANDIM E ALVARENGA, F.C.; ALVARENGA, M.A.; MEIRA, C. Transmission electron microscopy of equine embryos cryopreserved by different methods. **Equine Veterinary Journal**, Suppl. 15, p. 67-70, 1993.

LANDIM E ALVARENGA, F.C. **Avaliação dos efeitos do congelamento e descongelamento sobre a viabilidade e morfologia de embriões equinos**. 1995. 102p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

LEGRAND, E.; KRAWIECKI, J.M.; TAINTURIER, D.; et al. Does the embryonic capsule impede the freezing of equine embryos? In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE EMBRYO TRANSFER, 5, 2000, Finland. **Proceedings...** Saari: Finland, 2000. p.62-65.

LEIBO, S.P. Novel methods of embryo cryopreservation. In: INTERNACIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE EMBRYO TRANSFER, 5., 2000, Finland. **Proceedings...** Saari: Finland, 2000. p. 29.

MACLELLAN, L.J.; CARNEVALE, E.M.; COUTINHO DA SILVA, M.A.; et al. Birth of foals after transfer of vitrified equine oocytes collected from superstimulated and non-stimulated mares (abstract). **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 468, jan. 2002.

MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L.; SQUIRES, E.L.; et al. Diagnostic Ultrasonography. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. (Eds). **Equine Reproduction**. USA: Williams & Wilkins, 1993. p. 266-302.

MEIRA, C. & HENRY, M. Evaluation of two non-surgical equine embryo transfer methods. **Journal Reproduction & Fertility**, Suppl. 44, p. 712-713, 1991.

MEIRA, C.; ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; et al. Cryopreservation of equine embryos using glycerol and 1,2-propanodiol as cryoprotectants. **Equine Veterinary Journal**, Suppl. 15, p. 64-66, oct. 1993.

MUNAR, C.J. Criopreservação, tópicos atuais. **Revista do Centro de Ciências Rurais UFSM**, v.18, p. 17-19, dez. 1988.

OBERSTEIN, N.; O'DONOVAN, M.K.; BRUEMMER, J.E.; et al. Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop, or conventional slow cooling methods. **Theriogenology**, v. 55, p. 607-613, 2001.

O'DONOVAN, M.K.; OBERSTEIN, N.; BRUEMMER, J.E.; et al. Metabolic activity of equine blastocysts cryopreserved in ethylene glycol and galactose. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE EMBRYO TRANSFER, 5, 2000, Finland. **Proceedings...** Saari: Finland, 2000. p.57-59.

ORIOLO, J.G.; BETTERIDGE, K.J.; HARDY, J.; et al. Structural and developmental relationship between capsular glycoproteins of the horse (*Equus caballus*) and the donkey (*Equus asinus*). **Equine Veterinary Journal**, Suppl. 15, p. 14-18, oct. 1993.

PERES, K.R.; TRINQUE, C.L.N.; LIMA, M.M.; et al. Non-surgical equine embryo transfer: a retrospective study (abstract). **Theriogenology**, v. 57, n.1, p. 558, jan. 2002.

POITRAS, P.; GUAY, P.; VAILLANCOURT, D.; et al. *In vitro* viability of cryopreserved equine embryos following different freezing protocols. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 58, p. 235-241, 1994.

ROSAS, C.A.; PEIXER, M.A.; LUNA, N.M.; et al. Uso do etilenoglicol na criopreservação de embriões eqüinos (abstract). **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 25, n.1, p. 288, 1997.

ROWE, A.W. Biochemical aspects of cryoprotective agents in freezing and thawing. **Cryobiology**, v.3, n.1, p.12-18, 1966.

SEIDEL, G.E. Jr. Principles of cryopreservation of mammalian embryos. Techniques for freezing mammalian embryos, 6, 1986, Colorado. **Proceedings...** Presented by Animal Reproduction Laboratory, Colorado State University, Fort Collins, 1986.

SEIDEL, G.E. Jr. Cryopreservation of equine embryos. **Veterinary Clinics Of North America: Equine Pract.**, v.12, n.1, p.85-99, april 1996.

SEIDEL, G.E. Jr.; SQUIRES, E.L.; MCKINNON, A.O.; et al. Cryopreservation of equine embryos in 1,2 propanodiol. **Equine Veterinary Journal**. Suppl. 8, p.87-88, aug. 1989.

SLADE, N.P.; TAKEDA, T.; SQUIRES, E.L.; et al. A new procedure for the cryopreservation of equine embryos. **Theriogenology**, v. 24, n.1, p. 45-58, jul. 1985.

SQUIRES, E.L. Embryo transfer. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. (Eds). **Equine Reproduction**. USA: Williams & Wilkins, 1993. p. 357-367.

SQUIRES, E.L.; SEIDEL, G.E.; MCKINNON, A.O. Transfer of cryopreserved equine embryos to progestin-treated ovariectomised mares. **Equine Veterinary Journal**, Suppl. 8, p. 89-91, aug. 1989.

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3. ed. Savoy: Illinois, 1999. 180p.

SUGIE, T.; SEIDEL, G.E.; HAFEZ, E.S.E. Transferência de Embriões. In: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 4 ed. São Paulo: Manole, 1988. p.659-688.

VANDERWALL, D.K. Early embryonic development and evaluation of equine embryo viability. **Veterinary Clinics Of North America: Equine Practice.**, v. 12, n. 1, p.61-83, april 1996.

VANDERWALL, D.K.; WOODS, G.L.; WEBER, J.A.; et al. PGE<sub>2</sub> secretion by the conceptus and binding by non-pregnant endometrium in the horse. **Equine Veterinary Journal**, Suppl. 15, p. 24-27, oct. 1993.

WEBER, J.A. WOODS, G.L. Influence of embryonic secretory chemicals on selective oviductal transport in mares. **Equine Veterinary Journal**, Suppl. 15, p. 36-38, oct. 1993.

YAMAMOTO, Y.; OGURI, N.; TSUTSUMI, Y.; et al. Experiments in the freezing and storage of equine embryos. **Journal Reproduction Fertility**, Suppl. 32, p.399-405, 1982.

YOUNG, C.A.; SQUIRES, E.L.; SEIDEL, G.E.; et al.. Cryopreservation procedures for Day 7-8 equine embryos. **Equine Veterinary Journal**, Colorado, Suppl. 25, p. 98-102, 1997.