



UNICEPLAC
CENTRO UNIVERSITÁRIO

Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos - UNICEPLAC
Curso de Medicina Veterinária
Trabalho de Conclusão de Curso

**Criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*: uma
revisão de literatura**

Gama-DF
2022

ISABELLA RODRIGUES DOS SANTOS

**Criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*: uma
revisão de literatura**

Artigo apresentado como requisito para conclusão
do curso de Bacharelado em Medicina Veterinária
pelo Centro Universitário do Planalto Central
Apparecido dos Santos – Uniceplac.

Orientadora: Prof. Dra. Mariane Leão

Gama-DF
2022


ISABELLA RODRIGUES DOS SANTOS


Criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*: uma revisão de literatura

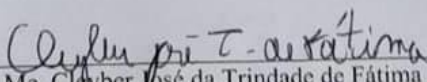
Artigo apresentado como requisito para conclusão do curso de Bacharelado em Medicina Veterinária pelo Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos – Uniceplac.

Gama-DF, 06 de junho de 2022.

Banca Examinadora


Prof. Dra. Mariane Freitas Leão
Orientador


Prof. Dra. Lorena Ferreira Silva
Examinador


Prof. Me. Cleber José da Trindade de Fátima
Examinador

Criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*: uma revisão de literatura

Isabella Rodrigues dos Santos¹

Resumo:

Este trabalho objetiva revisar as técnicas para a criopreservação e melhores métodos para que embriões produzidos *in vitro* tenham maior viabilidade após o descongelamento. Para tanto, foi realizada uma revisão bibliográfica, e foram escolhidos e analisados na íntegra 63 artigos, objetivando apresentar: Quais as técnicas para a criopreservação *in vitro* apresentam uma maior viabilidade após o descongelamento. Verificou-se que a viabilidade dos embriões produzidos *in vitro* depende de diversos fatores e um deles é o tipo da técnica de tratamento utilizada pois algumas, podem causar danos celulares aos embriões, diminuindo assim a viabilidade destes. Entretanto estratégias como a diminuição da quantidade lipídica das células, a diminuição do estresse oxidativo e a retirada do fluido da blastocelule tem obtido bons resultados no cultivo e na qualidade final dos embriões produzidos *in vitro*.

Palavras-chave: criotolerância; congelamento lento; vitrificação; produção *in vitro*.

Abstract:

This work aims to review techniques for cryopreservation and better methods for *in vitro* produced embryos to have greater viability after thawing. Therefore, a bibliographic review was carried out, and 63 articles were chosen and analyzed in full, aiming to present: Which techniques for *in vitro* cryopreservation present greater viability after thawing. It was found that the viability of embryos produced *in vitro* depends on several factors and one of them is the type of treatment technique used because some can cause cellular damage to the embryos, thus reducing their viability. However, strategies such as decreasing the amount of lipid in cells, decreasing oxidative stress and removing fluid from the blastocoel have obtained good results in the cultivation and in the final quality of *in vitro* produced embryos.

Keywords: cryotolerance; slow freezing; glazing; *in vitro* production

¹Graduanda do Curso Medicina Veterinária, do Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos – Uniceplac. E-mail: bella.zarbi@gmail.com

“O orgulho é a fonte de todas as fraquezas, porque é a fonte de todos os vícios. Não basta fazer coisas boas, é preciso fazê-las bem.”

Santo Agostinho

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma estratégia para expandir a produtividade na bovinocultura, porque possibilita a multiplicação rápida e o aumento dos animais geneticamente melhorados. Antes, a PIVE era utilizada somente para fins científicos aqui no Brasil, mas devido à alta demanda para a produção de embriões que surgiram na última década, ela começou a ser utilizada em grande escala para a produção comercial de embriões bovinos, o que resultou na necessidade de novos métodos para a criopreservação de embriões produzidos *in vitro*, cada vez mais eficientes (VIANA *et al.*, 2012).

Segundo Viana (2017), o Brasil é considerado um país de referência no uso da produção de embriões *in vitro*, e apesar de ter passado por uma relativa estagnação do mercado decorrente da crise econômica entre 2014 e 2016 (BARBOSA FILHO, 2017), a pecuária de corte se encontra em posição de destaque dentro do contexto do agronegócio. O país detém o segundo maior rebanho do mundo, respondendo por 18% do efetivo mundial e ficando atrás somente da Índia. A pecuária de corte ocupa grande área do território nacional, trazendo empregos e gerando renda para milhões de brasileiros (MALAFAIA *et al.*, 2021).

A PIVE tem tomado grande espaço na comercialização de bovinos, com o objetivo de acelerar a produção das fêmeas leiteiras e de obter animais que tenham um bom rendimento de carcaça, que produzam uma carne de qualidade, e conseqüentemente acelerando o ganho genético nesses rebanhos (MARTINS, 2007). Além disso, a PIVE é de fundamental importância para o melhoramento genético animal, uma vez que pode aumentar o critério de seleção, quando se reduz o intervalo entre gerações (VARAGO *et al.*, 2008). Também pode ser utilizada como ferramenta de reprodução assistida de fêmeas com alto valor genético que possuam patologias reprodutivas adquiridas. (DAYAN, 2001).

Um dos gargalos da PIVE está no número de receptoras disponíveis para a transferência de um grande número de embriões ao mesmo tempo, por isso a criopreservação embrionária surge como grande alternativa para estocar material genético de qualidade que permite transferi-lo somente quando há receptoras disponíveis. No entanto, há algumas barreiras a serem ultrapassadas para se obter uma eficiente criopreservação de embriões produzidos *in vitro*. Os embriões produzidos no sistema *in vitro* apresentam menor resistência ao processo de criopreservação, em

comparação com os embriões produzidos *in vivo*, devido ao maior acúmulo de lipídios em suas células (SUDANO *et al.*, 2012). Por essa razão, pesquisas vêm sendo realizadas objetivando alterações nos métodos de criopreservação de embriões e na melhoria da qualidade embrionária para que os embriões produzidos *in vitro* sejam mais criotolerantes (SARAGUSTY *et al.*, 2011).

Nesse contexto, esse trabalho visa destacar pontos importantes do processo de produção *in vitro* de embriões e apresentar as diferentes técnicas de criopreservação de embriões bovinos que têm sido empregadas para viabilizar o congelamento desses embriões.

2.REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO DE EMBRIÕES *IN VITRO*

O processo da formação de um novo indivíduo bovino pela produção *in vitro*, envolve as seguintes etapas: colheita e maturação *in vitro* (MIV) dos ovócitos, fecundação dos ovócitos *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) dos zigotos e estruturas embrionárias fora do trato reprodutivo animal (CHOUDHARY *et al.*, 2016).

Para a colheita dos ovócitos de forma comercial é necessário que se recupere os mesmos por meio da aspiração folicular, que pode ser feita por via transvaginal guiada por ultrassom (RODRIGUES, 2000). Os ovócitos também podem ser obtidos de ovários coletados de vacas abatidas em frigoríficos para uso em estudos laboratoriais.

Para a recuperação dos ovócitos no animal *in vivo* é necessário um equipamento de ultrassom com um transdutor ligado a um guia de aspiração, que é posicionado no fundo da vagina da vaca, chamado de fórnix. Utiliza-se a aplicação de anestesia epidural com lidocaína. Através de palpação retal, os ovários são posicionados, de forma a se aproximarem da parede da vagina, onde estará a guia de aspiração folicular. Para realizar o procedimento de aspiração folicular e obtenção do ovócito (*Ovum pick up* - OPU) é necessário que se introduza uma agulha de 18 ou 19 G (Figura 1) no interior dos folículos ovarianos (AVELINO *et al.*, 2002), atravessando a parede da vagina. E por meio de um sistema a vácuo, o líquido folicular e ovócito é conduzido para dentro de um tubo coletor (SANGILD, 2000; Figura 2). Em seguida esse líquido é filtrado em malha de 50 micrometros (Figura 3) para se rastrear e selecionar os ovócitos em placa de Petri sob lupa estéreo-microscópica (Figura 4). Os ovócitos são selecionados de acordo com o aspecto do citoplasma e

o número de camadas das células do cumulus (NAGAI, 2001). Os ovócitos selecionados seguem para laboratório, para que se dê início ao processo da PIVE (SANGILD, 2000).

Figura 1- Agulha de aspiração folicular



Fonte: Arquivo pessoal, 2022.

Figura 2 - Tubo coletor



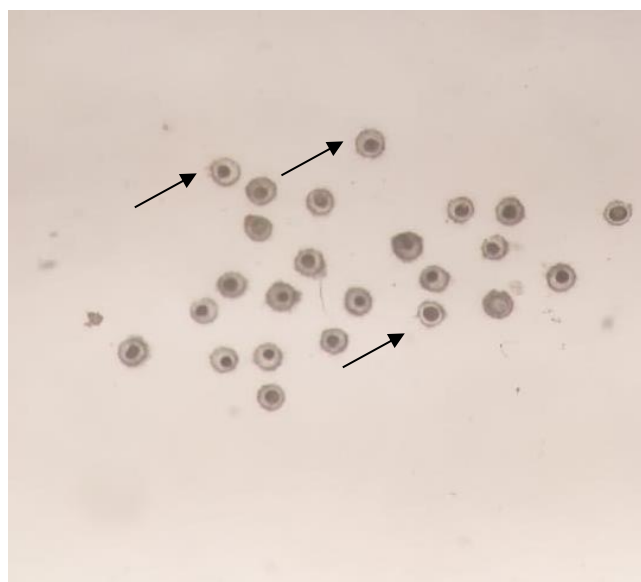
Fonte: Arquivo pessoal, 2022.

Figura 3 - Filtro para ovócitos



Fonte: Arquivo pessoal, 2022

Figura 4 Ovócitos selecionados para a fecundação de acordo com a camada de células do cumulus e citoplasma



Fonte: Arquivo pessoal, 2022

A técnica de aspiração folicular pode ser executada em fêmeas a partir dos 6 meses de idade, em vacas prenhes até o terceiro mês de gestação e após duas ou três semanas pós-parto. O intervalo entre as aspirações pode variar entre uma ou duas semanas (NAGAI, 2001). Em geral, a aspiração folicular é realizada por um técnico capacitado e causa poucos danos aos ovários das fêmeas, ainda que em alguns casos haja relatos de predominância de tecido conjuntivo no parênquima ovariano de doadoras submetidas a sessões de aspiração num intervalo de quinze dias (THOMPSON, 2000).

Após os ovócitos serem aspirados dos folículos ovarianos, eles ainda não estão prontos para serem fecundados, sendo necessário uma série de modificações do citoplasma e do núcleo que são chamadas de maturação ovocitária, que deve ocorrer em meios de cultivo e ambiente específico, tornando esse ovócito competente para ser fecundado (GALLI *et al.*, 2003). A maturação ovocitária nuclear *in vitro* ocorre entre 18 e 22 horas e somente após esse processo poderá ocorrer a fecundação (RODRIGUES-CUNHA *et al.*, 2015).

Para a fecundação destes ovócitos é necessário utilizar espermatozoides congelados que necessitam ser descongelados em água morna a 37°C. O método mais comum para a seleção de espermatozoides viáveis é pela separação por centrifugação em gradiente de Percoll 45-90%. Após essa etapa o sêmen deve ser lavado e a concentração de espermatozoides calculada em câmara de Neubauer, para determinar a quantidade final de espermatozoides a serem adicionados nos ovócitos preparados. O período de incubação da fecundação vai de 12 a 24 horas variando pelo tipo de sêmen que se utiliza (convencional ou sexado) (RODRIGUES *et al.*, 2000).

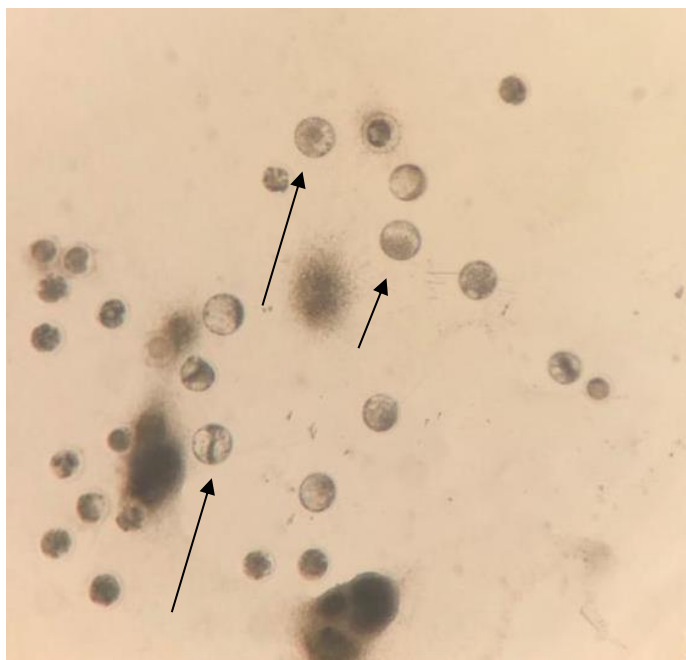
O cultivo *in vitro* é a última etapa, onde o zigoto (embrião recém-formado) se desenvolve até o estágio de blastocisto. Durante este período ocorre a ativação do genoma embrionário, a divisão celular e início da diferenciação embrionária com a formação da blastocela (SANGILD *et al.*, 2000). É de extrema importância as condições. Estufas com 5% de CO₂, temperatura a 37,5°C, meios de cultivos já prontos para o uso (do cultivo *in vitro*) para que se obtenha bons índices da produção de embriões, visto que pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de avaliar diferentes fatores intrínsecos e extrínsecos, que possam afetar o metabolismo e a capacidade de desenvolvimento dos embriões produzidos *in vitro*. Dentre esses fatores, pode-se citar componentes dos meios de cultivo, condições dos gases utilizados e temperatura (NAGAI, 2001).

O desenvolvimento dos embriões produzidos *in vitro* é avaliado no dia 2 (clivagem), no dia 6 e 7 do cultivo, verificando se existe a compactação dos blastômeros e início de formação da

blastocele, sendo que no último dia é realizada a seleção e avaliação final dos embriões para a criopreservação (THOMPSON, 2000; Figura 5).

Os dois métodos mais utilizados na criopreservação de embriões bovinos são a vitrificação e o congelamento lento ou clássico (DODE *et al.*2013).

Figura 5 - Seleção final dos embriões expandidos para o congelamento



Fonte Arquivo pessoal, 2022.

2.2 CARACTERÍSTICAS DOS EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO*.

Embriões produzidos *in vitro* têm um menor número de células, zona pelúcida mais frágil (CROSIER *et al.*, 2001) e ultra estrutura diferente dos embriões produzidos *in vivo* por apresentarem maior concentração de lipídeos, menos microvilosidades e grande quantidade de debris celulares (ABE *et al.*, 2002). Essas diferenças acarretam em uma menor taxa de prenhez e de criotolerância do embrião PIVE devido ao estágio de desenvolvimento, sistema de cultivo, método de criopreservação e qualidade do embrião (MORATO *et al.*,2010, SUDANO *et al.*, 2012).

2.3 CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES

O princípio fundamental do processo de criopreservação se baseia em manter o metabolismo celular em baixa atividade para que seja possível armazenar tecidos e células por tempo indeterminado (RODRIGUES et al., 2000).

Um dos princípios básicos da criopreservação é a necessidade de retirar o máximo possível de água intracelular antes do processo para que não ocorra a formação de cristais de gelo e danos celulares, e para que o metabolismo celular realize seu processo mesmo após o armazenamento em baixas temperaturas (VAJTA e KUWAYAMA, 2006). Com isso, a interação da formação dos cristais de gelo intracelulares e a concentração do soluto resultante do processo de desidratação (que ocorre no meio extra e intracelular) são os principais danos causados às células durante o processo da criopreservação (PICKETT, 1986). Há um aumento da pressão osmótica na célula pela congelação, e por isso é necessário equilíbrio a concentração total de solutos dentro e fora das células. Enquanto água sai da célula, o soluto penetra, e esse processo se interrompe quando há concentração de soluto suficiente para que não ocorra a formação de cristais de gelo (VISITIN *et al.*, 2002).

Independente do grau de desidratação, abaixo dos -20°C de congelamento as células não sobrevivem em soluções salinas sem que tenha um crioprotetor (MAZUR, 1984). A adição de um crioprotetor se faz fundamental para a sobrevivência das células embrionárias.

2.4 CRIOPROTETORES

Os crioprotetores têm a função de declinar o ponto de congelação do meio, concedendo um período maior para a remoção da água intracelular do resfriamento prévio ao congelamento da água. Os crioprotetores possuem capacidade de auxiliar estas células a sobreviverem ao estresse provocado pelas mudanças físicas e de interagir com as membranas celulares (SEIDEL JR. 1986). Eles também possuem a função de reduzir o ponto de solidificação do congelamento para promover um tempo maior de desidratação da célula e diminuir a formação de cristais de gelos intracelulares e impedir que ocorra danos tóxicos (KASAI, 2002).

Seidel *et al.* (1989), afirma que a concentração utilizada dos crioprotetores pode causar queda de 2°C a 3°C do ponto de congelamento, porém essa baixa de temperatura pode triplicar quando se tem uma solução mais concentrada entre os cristais de gelo e o fluido intracelular, o que

se torna vantajoso para o congelamento intracelular que ocorrerá em temperaturas mais baixas quando se há crioprotetores.

O congelamento intracelular ocorre em temperaturas mais baixas quando houver crioprotetores. Por isso, a interação de crioprotetores com a membrana plasmática possui grande importância para desempenhar uma estabilização nos processos de mudança do estado líquido para o sólido fazendo com que o mesmo ocorra no descongelamento. Diminuir os efeitos de altas concentrações osmóticas durante a desidratação também é de extrema importância (MAZUR, 1984). Existem duas categorias de crioprotetores: a) permeáveis ou intracelulares (etanol, metanol, glicerol, DMSO (dimetil sulfóxido), etilenoglicol, etc.); b) impermeáveis ou extracelulares (glicose, sacarose, lactose, etc.). Estas duas categorias são usadas associadas ou separadamente para diferentes protocolos de criopreservação (YOUNG *et al.*, 1998).

Os crioprotetores permeáveis fazem com que devido a concentração utilizada, a água das células saia rapidamente por osmolaridade para diluir o crioprotetor, causando assim uma retração temporária pela concentração utilizada de crioprotetores. Porém, em poucos minutos, os crioprotetores permeiam as membranas celulares e as concentrações externas celulares se igualam, fazendo com que a água entre nas células. Esta retração celular que ocorre quando há o contato com o crioprotetor, pode ser minimizada quando se adiciona gradualmente o crioprotetor, contudo, este processo não danifica aparentemente as células embrionárias fazendo com que em alguns protocolos, estes crioprotetores sejam adicionados de uma vez só (SEIDEL, 1996).

Os crioprotetores não permeáveis ou extracelulares possuem os açúcares: glicose, manitol, galactose, trealose, sorbitol e sacarose. Apresentam um efeito estabilizador sobre as membranas, mas não possuem um efeito crioprotetor eficaz quando isolados.

Associa-se aos crioprotetores intracelulares por possuírem alto peso molecular, permanecendo assim no meio extracelular para promover um período inicial de saída da água para que logo depois se adicione crioprotetores intracelulares (ALLER *et al.*, 1995; SAITO *et al.*, 1994). Os crioprotetores extracelulares também possuem a função de interação com a membrana extracelular, realizando uma ação de estabilização durante as mudanças do estado líquido para o sólido e até mais importante, na volta do estado líquido quando ocorre o descongelamento, parecendo diminuir a fragilidade das membranas para impedir que elas se rompam (KASAI, 2002).

Os crioprotetores pelas suas características químicas diferem a capacidade de indução e manutenção do estado vítreo das células congeladas. Sendo assim, crioprotetores com soluções químicas consideradas fracas indutores da vitrificação como o etilenoglicol têm a necessidade de serem utilizados em altas concentrações, o que eleva o risco de toxicidade. Entretanto, pode-se minimizar este problema associando crioprotetores considerados fortes indutores da vitrificação, como o dimetilsulfóxido (DMSO). Esta associação permitirá que se tenha uma boa solução com capacidade alta de vitrificação, reduzindo também a toxicidade do crioprotetor (BAUDOT *et al.*, 2000). Outro fator que poderá influenciar a capacidade da vitrificação é a adição de macromoléculas ou açúcares que tem a função de aumentar a molaridade da solução para favorecer o estado vítreo (WOWK *et al.*, 2000).

Os efeitos provocados pela alta concentração dos crioprotetores na vitrificação minimizam-se quando se tem a exposição dos embriões às soluções de menor concentração, sendo assim, se reduz os danos estruturais causados por choque osmótico nestas células. A exposição prolongada a uma solução de 2 a 4% de etileno glicol antes da exposição às soluções com alta concentração aumentará a viabilidade das estruturas celulares vitrificadas pela adaptação osmótica e saturação homogênea do crioprotetor no interior das células (ABE *et al.*, 2002).

2.5 TIPOS DE CRIOPRESERVAÇÃO

Diversas técnicas para a criopreservação foram desenvolvidas durante os últimos anos e os crioprotetores também vêm sendo utilizados de diversas formas, concentrações e associações. Estas soluções são adicionadas de uma única vez ou em etapas dependendo de cada protocolo e os embriões são criopreservados em diferentes curvas de resfriamento podendo ser mergulhados diretamente ao nitrogênio líquido partindo da temperatura ambiente (GONÇALVES *et al.*, 2008).

Entretanto, ao longo dos últimos 30 anos de pesquisa, do conhecimento obtido e as metodologias desenvolvidas, a criopreservação ainda continua tendo um grande desafio para garantir a sobrevivência dos embriões cultivados *in vitro* após a criopreservação com taxas de sobrevivência semelhantes aos embriões produzidos *in vivo*. Ao longo dos anos, apesar dos avanços obtidos na criobiologia, poucos protocolos de congelamento de embriões têm sido executados com êxito. A seguir, serão relatados as principais técnicas utilizadas na criopreservação dos embriões produzidos *in vitro*.

2.5.1 CONGELAMENTO LENTO

A técnica tem como objetivo facilitar a logística do descongelamento e da transferência de embriões, não se fazendo necessário o uso do laboratório. É uma técnica de congelamento mais lento, tendo como objetivo produzir um embrião para a transferência direta (GOMES e SANTOS, 2020). No congelamento lento que dura de 3 a 4 horas, se faz necessário uma máquina de congelar embriões eletronicamente programável (Figura 6) para monitorar a temperatura da curva de resfriamento, seguido do mergulhamento das palhetas no nitrogênio líquido para serem armazenadas em botijões de nitrogênio a -196°C (VISITIN *et al.*, 2002). Segundo Saragusty *et al.* (2011), a técnica do congelamento lento consiste no método de criopreservação no qual as células são postas em baixas concentrações de crioprotetores e com taxa de resfriamento entre 0,3 e $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Figura 6- Máquina de congelamento programável



Fonte: Santos, 2022.

A principal injúria ocorrida é a formação de cristais de gelo pela menor taxa de resfriamento (BOITÉ, 2008). Segundo Visintin *et al.* (2002), a quantidade de água intracelular das células refrigeradas quando são imersas em nitrogênio líquido não é suficiente para causar danos nas células desde que se cumpram todos os protocolos adequados na hora do aquecimento.

Vajta e Nagy (2006) afirmam que é necessário que a temperatura atinja a fase do pré-congelamento a -7°C , onde ocorre a liberação do calor absorvido durante o processo de fusão e o aumento da temperatura que é prejudicial. Para que o aumento de temperatura não aconteça, pode-se aplicar uma técnica chamada de *seeding*, através do contato da palheta com um objeto metálico refrigerado em nitrogênio líquido (VAITA, NAGY; 2006). A realização do *seeding* é de grande importância para a indução da cristalização do meio extracelular antes da congelação do meio que estão os embriões, para que as condições necessárias sejam proporcionadas para a retirada lenta da água do meio intracelular através da formação de gelo no espaço extracelular (MAZUR, 1984).

Existem algumas observações necessárias a serem consideradas nesse processo: o instrumento a ser usado para efetuar a indução da cristalização precisa estar em temperatura menor que a temperatura da amostra, visto que instrumentos maiores não são desejáveis para induzir a cristalização de amostras menores. Isso ocorre pois os tamanhos são desproporcionais, pois, a massa relativa de um instrumento muito maior, resfriará amostras menores por temperaturas muito baixas e então os embriões são lesados caso haja neste momento o congelamento intracelular. Além disso, os instrumentos muito pequenos também não são desejáveis, visto que após serem retirados do nitrogênio líquido se aquecem rapidamente. Preferencialmente, a indução da cristalização deve ser feita onde não estejam os embriões, como no menisco superior da coluna central da palheta (MORATO *et al.*, 2010).

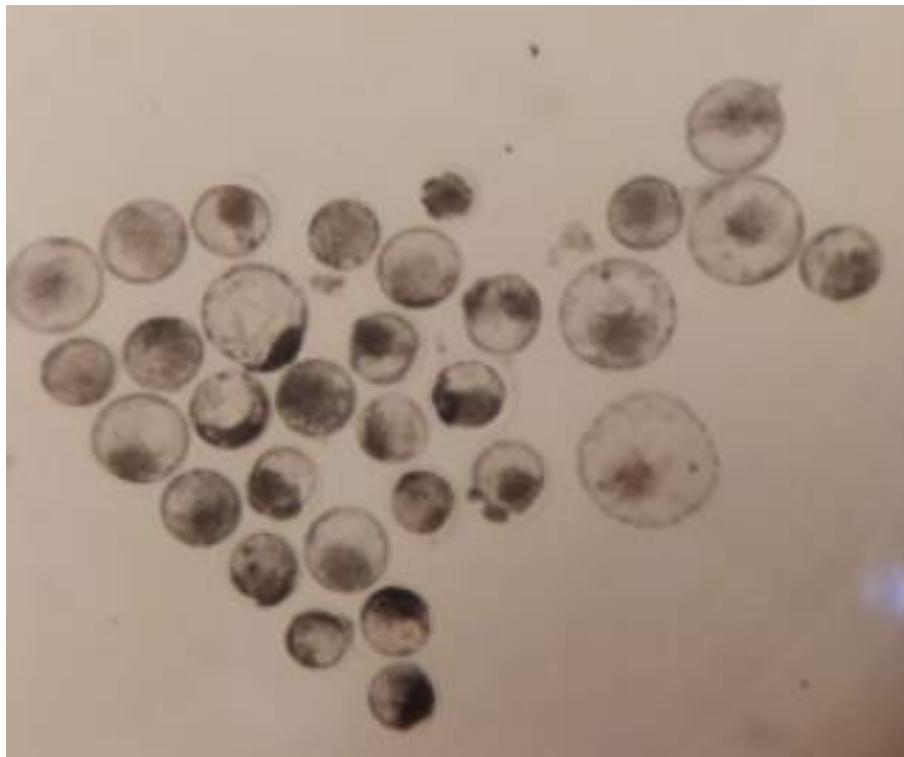
Logo após a etapa do *seeding*, dentro dos próximos 10 a 15 minutos, ocorre a manutenção de equilíbrio, onde os embriões são congelados em um processo lento, reduzindo a temperatura entre 0,3 e $1^{\circ}/\text{min}$ até atingir -30 a -35°C . Com isso ocorre a formação de gelo extracelular e o aumento da concentração do soluto também. Quando está suficientemente desidratada, a célula com concentração elevada de solutos impede a cristalização do gelo.

O congelamento lento para Vajta e Nagy (2006) é um processo longo (de 3 a 4 horas) e que requer diversos equipamentos de congelação e um grande volume de nitrogênio líquido, o que o torna dispendioso. Embora existam limitações quanto à formação de cristais de gelo intracelular, o congelamento lento tornou-se referência com considerável aplicação comercial e industrial além de oferecer meios comerciais já prontos para o congelamento e descongelamento fazendo assim com que após um curto treinamento seja possível sua realização.

2.5.2 VITRIFICAÇÃO EMBRIONÁRIA

A técnica de vitrificação consiste em um congelamento ultra rápido com uma grande quantidade de crioprotetores que durante o resfriamento impeça a formação de cristais de gelo, fazendo com que a água da célula se solidifique tomando assim o estado vítreo (KASAI *et al.*, 2016). Este método proporciona uma rápida saída de grande parte da água presente no interior das células embrionárias, tornando-as desidratadas suficientemente permeáveis para o crioprotetor (VAJTA e NAGY, 2006). Segundo Morató *et al.* (2010) embriões vitrificados em estágio de desenvolvimento mais avançado de blastocistos expandidos (Figura 7) apresentaram maiores taxas de sobrevivência a criopreservação.

Figura 7 - Blastocistos expandidos



Fonte: Santos, 2022.

A vitrificação segundo Gonçalves *et al.* (2008), pode ser realizada em botijões de nitrogênio líquido o que exige menor tempo para o resfriamento. Para esta técnica, a necessidade de equipamento é menor que no congelamento lento, visto que não se faz necessário um equipamento

específico para a realização desta técnica, tornando assim um procedimento menos oneroso (GREEN, 2005).

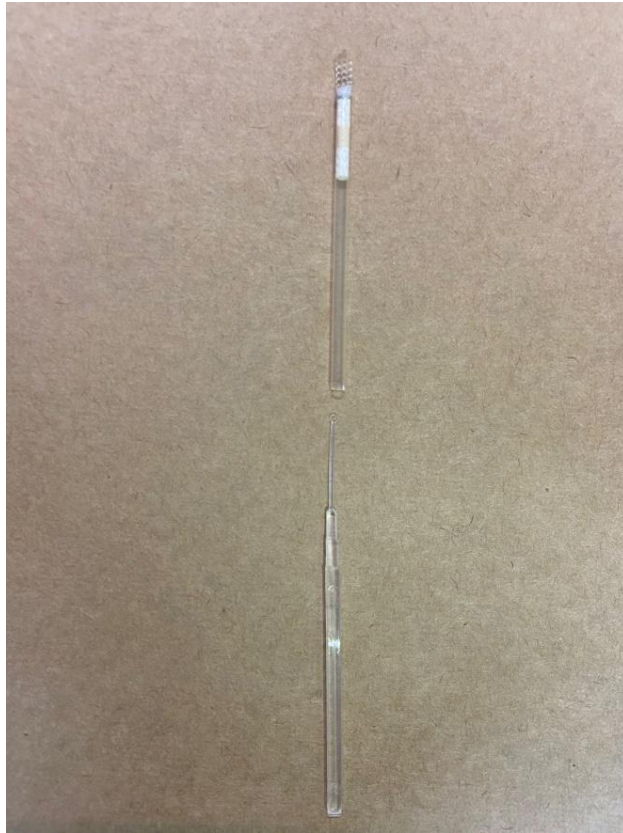
Muitas metodologias de vitrificação têm sido desenvolvidas, trazendo diferentes crioprotetores, velocidade de resfriamento e tipos de suporte para acondicionamento de embriões (WERLICH *et al.*, 2006). Segundo Dattena *et al.* (2004), muitas técnicas de vitrificação estão sendo desenvolvidas visando o objetivo de evitar crioinjúrias juntamente com inúmeros crioprotetores que são utilizados em diferentes combinações e concentrações.

Segundo Ali e Shelton (1993) e Dela Peña *et al.* (2002), o método convencional utiliza palhetas francesas que são preenchidas com o crioprotetor e o material que será criopreservado. Estas palhetas são seladas e logo após são imersas em nitrogênio líquido.

Existe também uma adaptação feita para reduzir a quantidade de crioprotetores conhecida como método de hemi-palhetas que consiste em cortar ao meio a palheta francesa de 0,25 ml em forma de bisel e na superfície interna inserida uma gota de vitrificação juntamente com o material que se deseja vitrificar. Mergulha-se a hemi-palheta no nitrogênio líquido e em seguida se insere esta palheta em uma de 0,5ml para estocagem (LIEBERMANN e TUCKER, 2002). Segundo Carvalho *et al.* (2011), são empregados macrotubos de 2ml que suportam maior quantidade de crioprotetores e uma maior preservação de tecidos criopreservados.

A maioria dos crioprotetores possuem alguns efeitos negativos, um deles é a toxicidade que geralmente é proporcional à concentração da substância e ao momento da exposição (VAJTA *et al.*, 2006). A toxicidade química do crioprotetor e o estresse osmótico são os principais fatores limitantes da vitrificação causando danos às células embrionárias. Porém, se busca o equilíbrio por taxas rápidas de resfriamento que diminuam a toxicidade dos crioprotetores nas células (PAPADOPOLUOS *et al.*, 2002). Inúmeros dispositivos foram criados para reduzir o volume tóxico dos crioprotetores. O mais usado para a vitrificação de embriões bovinos é o Cryotop (palheta de vitrificação) (Figura 8). Este método demonstrou melhores taxas de eclosão dos blastocistos após o descongelamento (INABA *et al.*, 2011; DIOGENES *et al.*, 2012; Thaisa 2020).

Figura 8- Cryotop



Fonte: Arquivo pessoal, 2022

2.6 FATORES QUE AFETAM A TAXA DE PRENHEZ

Existem diversos fatores que afetam a taxa de prenhez dos embriões bovinos produzidos *in vitro*. Dentre eles estão a qualidade do manejo nutricional, o tipo de receptora que se utiliza, visto que novilhas são mais desejáveis que vacas mais velhas, o laboratório que produziu esses embriões e o protocolo utilizado para a sincronização das receptoras (DATENA *et al.*, 2004). Todos esses fatores influenciam na taxa de prenhez, sejam eles resultados positivos ou não. Para embriões vitrificados, estima-se de 40 a 50% de prenhez após a transferência, e para embriões congelados lentamente de 30 a 40% (VAITA, NAGY; 2006).

2.7 DESCONGELAMENTO

A viabilidade e a sobrevivência dos embriões descongelados dependerão do que foi empregado no resfriamento e taxas de descongelação. Os embriões congelados lentamente (com

taxas de resfriamento lento a $-0,1$ °C/min) e a imersão em nitrogênio em temperaturas de -60 °C a -110 °C, necessitam de descongelamento lento por volta de 10 °C/min. Porém, a maioria dos protocolos de congelamento são realizados com curvas de resfriamento entre $-0,1$ a $-0,5$ °C/min e entre -25 e -40 °C imersão das amostras em nitrogênio líquido (TAKEDA *et al.*, 1984).

No descongelamento o crioprotetor diluído evita a entrada muito rápida da água da célula, visto que uma redução muito severa na osmolaridade pode levar a uma lise celular, (SANGILD *et al.*, 2000).

Com a diluição de substâncias crioprotetoras com a sacarose, as técnicas de descongelamento se tornaram mais seguras e mais rápidas, porque a sacarose atua como um tampão osmótico para manter constante a concentração do meio extracelular, controlando e regulando a velocidade de entrada da água e saída do crioprotetor evitando assim que ocorra um choque osmótico (ONGARATTO, 2009).

Quando se adiciona a sacarose em associação do armazenamento de embriões em palhetas francesas, torna-se possível realizar o método *one-step* para o descongelamento. Com este método é possível a transferência direta dos embriões para as receptoras na mesma palheta que os embriões foram congelados. Significativamente, este procedimento simplificou a tecnologia da transferência de embriões, otimizando o tempo necessário para a preparação dos embriões a serem transferidos, não sendo mais necessário equipamentos especiais para estas transferências (PALASZ & MAPLETOFT, 1996).

2.7 OUTROS MÉTODOS PARA AUXILIAR NA CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS

Existem diversas estratégias para o melhoramento de cultivo da PIVE, como por exemplo, minimizar a quantidade lipídica das células e usando meios físicos desde o início do cultivo, como aumentar a pressão hidrostática tem alcançado melhores respostas na criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Como outra alternativa, pode-se retirar o soro do meio de cultivo, porém reduzirá também a produção de blastocistos. Existem alternativas como a delapidação química e a redução na concentração do soro que foram testadas positivamente, podendo assim serem utilizadas simultaneamente ou isoladamente no cultivo dos embriões produzidos *in vitro* (DODE *et al.*, 2013).

Paschoal *et al.*, (2012) afirma que existe um agente que é capaz de estimular a lipólise adicionado ao meio de cultivo: o *foskolin*. Para embriões bovinos, estudos avaliaram a presença ou não de soro em pequenas concentrações (2,5%) apresentando um resultado que os embriões que foram produzidos no soro possuíam uma maior sensibilidade à criopreservação e quando o *foskolin* foi adicionado ao meio, esse efeito foi eliminado. Porém, existem outras substâncias que possuem a função de reduzir lipídios do soro, como o etossulfato de fenazina que também diminuirá a produção de lipídios (FIMBRES e SEIDEL Jr., 2007.)

Os embriões durante a criopreservação também estão predispostos aos danos oxidativos. Existe uma estratégia que vem sendo bastante utilizada para reduzir esse estresse que é o cultivo dos embriões sobre baixa tensão de oxigênio para otimizar o metabolismo e minimizar a produção de radicais livres. Substâncias antioxidantes como tocoferol ou vitamina E, o trolox (FEUGANG *et al.*, 2004), a catalase (PAUDEL *et al.*, 2010), β - mercaptoetanol (β ME; HOSSEINI *et al.*, 2009) e a melatonina já foram inseridos aos meios de cultivo e de criopreservação na intenção de reduzir a produção de radicais livres, porém este efeito benéfico nos meios de cultivo necessita de estudos mais aprofundados (DODE *et al.*, 2013).

A melatonina que também é um antioxidante, em baixas concentrações melhora a qualidade e o desenvolvimento dos embriões após a vitrificação aumentando a quantidade de células internas. Com isso, melatonina atua na redução do estresse oxidativo, visto que nos embriões vitrificados produzidos *in vitro*, pode protegê-los proporcionando um efeito benéfico no desenvolvimento do embrião depois que vitrificado (DEHGHANI *et al.*, 2014).

Existe também a retirada do fluido da blastocle antes da criopreservação para melhorar as taxas de sobrevivência dos embriões produzidos *in vitro*. Quando ocorre a expansão dos blastocistos, a blastocle está cheia de líquido, podendo favorecer a formação de cristais de gelos na criopreservação, o que pode causar danos aos embriões e diminuir a taxa do desenvolvimento embrionário (MUKAIDA *et al.*, 2006). Quando se promove a redução do fluido da blastocle, se reduz a formação de cristais de gelo, diminuindo também injúrias celulares que podem ser causadas pelo processo da criopreservação (PARK *et al.*, 2006).

3. CONCLUSÃO

A viabilidade dos embriões PIVE depende de diversos fatores, um deles é que tipo da técnica de tratamento na criopreservação. No congelamento lento se utiliza pouca quantidade de crioprotetor, porém pode ocorrer uma grande formação de cristais de gelo intracelular. Já na vitrificação, o congelamento é feito de maneira rápida, entretanto é necessário utilizar uma grande quantidade de crioprotetor, o que pode ocasionar danos tóxicos às células.

Sabe-se que ambas as técnicas podem causar danos celulares aos embriões, diminuindo assim a viabilidade destes, porém, optar pela técnica que trás uma qualidade maior de sobrevivência dos embriões após o congelamento como a vitrificação é a melhor escolha por proporcionar melhores resultados.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, H. *et al.* Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum containing media. **Mol Reprod Dev.**v.61, p.57-66, 2002.

ALI, J.; SHELTON, J. Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. **J Reprod Fertil**, v.99, p.471-477, 1993.

ALLER, J.F. *et al.* Criopreservación de embriones mamíferos 1ª Parte. Características generales de La congelación. **Rev. de Medicina Veterinária**, v.76, n°2, p.132-136, 1995.

AVELINO, K.B.; VANTINI, E.; SENEDA, M.M. In vitro production of embryos of cows with acquired infertility. **Theriogenology**.v.57, p.656, 2002.

BARBOSA FILHO, F. H. A crise econômica de 2014/2017. **Revista Estudos Avançados**. 2017.

BAUDOT, A.; ALGER, L.; BOUTRON, P. Glass-forming tendency in the system water-dimethyl sulfoxide. **Cryobiology**. York. v. 40, p. 151-158, 2000.

BELTRAME, R.T. *et al.* Simulação e análise econômica da produção in vivo e in vitro de embriões em bovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasil**.45(12):1513–20.2020.

BOITÉ, M.C. Comportamento osmótico e criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro. 2008. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Reprodução animal) - **Universidade Federal Fluminense**, Niterói, 2008.

CHOUDHARY, K.K. *et al.* Advances in reproductive biotechnologies. **Vet World**.v.9, p.388-395, 2016.

CROSIER, A.E.*et al.* Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. **Biol Reprod.**v.64, p. 1375-1378, 2001.

DATTENA, M.*et al* Comparison of different vitrification protocols on viability after transfer of ovine blastocysts in vitro produced and in vivo derived. **Theriogenology**, v.62, p.481-493, 2004.

DAYAN, A. Fatores que interferem na produção de embriões bovinos mediante aspiração folicular e fecundação in vitro. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2001.

DEHGHANI, M. M, *et al.* Melatonin modulates the expression of BCL-xl and improve the development of vitrified embryos obtained by IVF in mice. **J Assist Reprod Genet.**v.31(4).453–61.

DELA PEÑA, E.C.*et al.* Birth of pups after transfer of mouse embryos derived from vitrified preantral follicles. **Reproduction**, 123(4):593-600, 2002.

DIÓGENES, M.N.; SPRÍCIGO, J.F.W.; DODE, M.A.N. Vitricificação por cryotop vs. congelamento clássico: efeito nas taxas de re-expansão e eclosão de embriões bovinos PIV. **Anais da XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia 30 de Embriões**. Foz do Iguaçu/PR; 2012. p. 495.

FEUGANG, J.M.*et al.* Addition of beta-mercaptoethanol or Trolox at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. **Theriogenology**, v.61, p.71-90, 2004.

FIMBRES, M.B.; SEIDEL, G.E.J.; Effects of fetal calf serum, phenazine ethosulfate and either glucose or fructose during in vitro culture of bovine embryos on embryonic development after cryopreservation. **Mol Reprod Dev.**v.74, p.1395-1405, 2007b.

GALLI, C. *et al.* Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v.59, p.599-616, 2003.

GOMES, R.S.; SANTOS, K.X. Produção e Utilização de Embriões Bovinos por Vitricificação e Direct Transfer. **Anais do 19 Simpósio de TCC do Centro Universitário ICESP**. 2020(19); 886-896.

GONÇALVES, P.B.D.*et al.* Produção in vitro de Embriões. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 1st ed. São Paulo: **Livraria Varela**; 2001. p. 195–226.

GREEN, R. E. Princípios e técnicas da vitricificação de embriões dos animais domésticos. 21 f. **Dissertação (Mestrado)** - Curso de Reprodução Animal, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

HOSSEINI, S.M.*et al.* Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming; which is the most important? **J Assist Reprod Genet.**v.26, p.355-364, 2009.

INABA, Y.*et al.* In straw Cryoprotectant Dilution for Bovine Embryos Vitrified Using Cryotop. **J Reprod Dev.**p.437-43, 2011.

KASAI, M. Advances in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos. Development of ultrarapid vitrification. **Reproductive Medicine and Biology.** v.1, p. 1-9, 2002.

KASAI, M.; MUKAIDA, T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. **Reproductive Biomedicine Online.**v. 9, n. 2, p. 164-170, 2004.

LIEBERMANN, J.*et al.* Blastocyst development after vitrification of multipronuclear zygotes using the flexipet denuding pipette. **Reprod Biomed Online.** 4(2):146-150, 2002.

DODE, M.A.N. *et al.* Criopreservação de embriões produzidos *in vitro*. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** Belo Horizonte, v.37, n.2, p.145-150, abr./jun. 2013.

MALAFAIA *et al.* A Sustentabilidade na Cadeia Produtiva da Pecuária de Corte Brasileira. **Revista Embrapa.** c. 8, p. 118-130, 2021.

MARTINS, C. M. Diferentes protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em *Bos taurus* e *Bos indicus*, Dissertação (mestrado) Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2007.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **Am J Physiol.**v.247, p.125-142, 1984.

MORATÓ, R.*et al.* Survival and apoptosis rates after vitrification in cryotop devices of *in vitro*-produced calf and cow blastocysts at different developmental stages. **Reprod Fertil Dev.**22(2):1141–7, 2010.

MUKAIDA T, OKA C, GOTO T, TAKAHASHI K. Artificial shrinkage of blastocoeles using either a micro-needle or a laser pulse prior to the cooling steps of vitrification improves survival rate and pregnancy outcome of vitrified human blastocysts. **Hum Reprod.** 2006.

NAGAI, T. The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. **Theriogenology**, v.55, p.1291-1301, 2001.

ONGARATTO, F.L. Criopreservação de embriões bovinos. Monografia (Graduação) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Comissão de Estágio, Porto Alegre, BR-RS, 2009/2.

PALASZ A.T. ; MAPLETOFT R.J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes : recent advances. **Biotechnology Advances**, v.14, p.127-149, 1996.

PAPADOPOULOS, S.*et al.* Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, *in vivo* or *in vitro* produced ovine blastocysts. **Anim Reprod Sci**, v.74, p.35-44, 2002.

PARK, S.Y.*et al.* Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts. **Zygote**.14(2):125–31, 2006.

PASCHOAL, D.M.*et al.* Forskolin effect on the cryosurvival of in vitro-produced bovine embryos in the presence or absence of fetal calf serum. **Zygote**, p.1-12, 2012.

PAUDEL, K.P.*et al.* Ascorbic acid, catalase and chlorpromazine reduce cryopreservation-induced damages to crossbred bull spermatozoa. **Reprod Domest Anim**, v.45, p.256-262, 2010.

PICKETT B.W. Principles of cryopreservation. In: Techniques for freezing mammalian embryos: short course proceedings, 4, 1986, **Fort Collins. Proceeding**: Fort Collins: USA, 1986.

PONTES, J.H.F.*et al.* Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a largescale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**. Elsevier Inc.75(9):1640–6, 2011.

RALL, W. F. Cryopreservation of mammalian embryos, gametes, and ovarian tissues. Contemporary Endocrinology: Assisted Fertilization and Nuclear Transfer in Mammals. **Humana Press, Towata, NJ**, p. 173-187, 2001.

RODRIGUES-CUNHA, M, C, V.*et al.* Effects of melatonin during in vitro maturation in defined medium on oocyte meiosis, oxidative stress and subsequent embryo development. **Theriogenology**. Brasil. Accepted Manuscript.2015.

RODRIGUES, C.F.M.; GARCIA, J.M. Fecundação in vitro em bovinos: aplicação comercial. **Arq. Fac. Vet. UFRGS Supl.**, v.28, p.186-187, 2000.

SAITO N.; IMAI K.; TOMIZAWA M. Effect of sugars addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced in vitro. **Theriogenology**, v.41, p.1053-1060, 1994.

SANGILD, P.T.*et al.* Blood chemistry, nutrient metabolism, and organ weights in fetal and newborn calves derived from in vitro produced bovine embryos. **Biol. Reprod.**, v.62, p.1495-1504, 2000.

SARAGUSTY, J.; ARAV, A. Current Progress in Oocyte and Embryo Cryopreservation by Slow Freezing and Vitrification. **Reproduction**.v.141, p.1-19, 2011.

SEIDEL, G.. Jr. Principles of cryopreservation of mammalian embryos. In : Techniques for freezing mammalian embryos: short course proceedings, 6, 1986, Fort Collins. Proceedings. Fort Collins:USA, 1986.

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.

SEIDEL, G.E. Jr. Cryopreservation of equine embryos. *Veterinary Clinics of North America. Equine Practic.* v.12, n.1, p.85-89, april 1996.

SUDANO, M.J.*et al.* Crucial surviving aspects for vitrified in vitro-produced bovine embryos. *Zygote.* v.1-8, 2012.

TAKEDA, T.; ELSDEN, R.P.; DEIDEL, Jr. G.E. Cryopreservation of mouse embryos by direct plunging into liquid nitrogen. *Theriogenology*, v.21, p.266, 1984.

THOMPSON, J.G. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60-61, p.263-275, 2000.

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology.* v.65, p.236-244, 2006.

VAJTA, G.; NAGY, Z.P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online*, v.12, p.779-796, 2006.

VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M.A. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. *Rev Bras Reprod Anim*, v.32, p.100-109, 2008.

VIANA, J.H.M. Levantamento estatístico da produção de embriões bovinos no Brasil em 2011: mudanças e tendências futuras. *O Embrião, ano XVI*, edição 51, p.6-10, 2012.

VIANA, J.H.M.; FIGUEIREDO, A.C.S.; SIQUEIRA, L.G.B. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. *Anim Reprod*, v.14, p.476-481, 2017.

VISINTIN, J.A.*et al.* Cryopreservation of *Bos taurus* vs *Bos indicus* embryos: are they really different? *Theriogenology*, v.57, p.345-359, 2002.

YOUNG, L.E., SINCLAIR, K.D., WILMUT, I. Large offspring syndrome in cale and sheep. *Rev. Reprod.*, v.3, p.155-163, 1998.

WERLICH, D.E.*et al.* Bovine ivp embryos vitrified in different cryoprotectant solutions, using or not super Cooled nitrogen. *Acta Sci Vet*, v.34, p.77-82, 2006.

WOWK, B.*et al.* Vitrification Enhancement by Synthetic Ice Blocking Agents. *Cryobiology*, v.40, P. 228-236, 2000.