

UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

TEREZA JANADIELLY HENRIQUE BARBOSA

CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS

JUAZEIRO DO NORTE-CE
2022

TEREZA JANADIELLY HENRIQUE BARBOSA

CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado à Coordenação do curso de Graduação em Medicina Veterinária do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio, em cumprimento as exigências para obtenção do grau Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador(a): Dra. Vanessa Raquel Pinto de Barros.

JUAZEIRO DO NORTE-CE
2022

TEREZA JANADIELLY HENRIQUE BARBOSA

CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS

Este exemplar corresponde à redação final aprovada do Trabalho de Conclusão de Curso, apresentada a Coordenação de Curso de Graduação em Medicina Veterinária do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de Bacharel em Medicina Veterinária.

Data da aprovação: 13/12/2022

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Dra. VANESSA RAQUEL PINTO DE BARROS

Membro: Profa. Esp. CAMILA MENDONÇA BEZERRA MORENO - UNILEÃO

Membro: Prof. Me. NIRALDO MUNIZ DE SOUSA - UNILEÃO

JUAZEIRO DO NORTE-CE
2022

CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS

Tereza Janadielly Henrique Barbosa¹
Dra. Vanessa Raquel Pinto de Barros²

RESUMO

A criopreservação permite o armazenamento abaixo de zero de células, tecidos ou outras estruturas biológicas. É importante compreender como e por que tais processos ocorrem, para que haja melhoria na sobrevivência pós descongelamento. Objetivou-se, com esta revisão de literatura, relatar sobre a produção *in vivo* e *in vitro* de embriões bovinos, pontuar os principais obstáculos e dificuldades da técnica de criopreservação e também algumas soluções, além, de mostrar os diferentes métodos. Trazendo assim atualizações acerca dos métodos de congelamento lento e da vitrificação. Foi realizada uma revisão bibliográfica, e foram escolhidos e analisados artigos coletados nas bases de dados Google acadêmico e Scielo. Verificou-se, que as duas principais técnicas utilizadas atualmente podem causar danos celulares aos embriões. Mas a vitrificação seria a escolha com uma maior eficácia, pois quando comparada com o método tradicional, ela parece ser mais eficiente para a criopreservação de embriões bovinos, principalmente os produzidos *in vitro*.

Palavras-chave: Congelamento lento. Embrião. *In vitro*. *In vivo*. Vitrificação.

ABSTRACT

Cryopreservation allows the storage below zero of cells, tissues, or other biological structures. It is important to understand how and why these processes occur, in order to improve survival after thawing. The objective of this literature review was to report on the *in vivo* and *in vitro* production of bovine embryos, to point out the main obstacles and difficulties of the cryopreservation technique and also some solutions, besides showing the different methods. Thus, bringing updates about the slow freezing and vitrification methods. A literature review was carried out, and articles collected from Google academic and Scielo databases were chosen and analyzed. It was found that the two main techniques currently used can cause cellular damage to embryos. But vitrification would be the most effective choice, because when compared to the traditional method, it seems to be more efficient for the cryopreservation of bovine embryos, especially those produced *in vitro*.

Keywords: Slow freezing. Embryo. *In vitro*. *In vivo*. Vitrification.

¹Discente do curso de Graduação em Medicina Veterinária. Centro Universitário Dr. Leão Sampaio. hjanadielly@gmail.com

²Docente do curso de Graduação em Medicina Veterinária. Centro Universitário Dr. Leão Sampaio. vanessabarros@leaosampaio.edu.br

1 INTRODUÇÃO

A expansão do uso de técnicas de produção *in vitro* revolucionou o mercado de embriões bovinos, na última década, vimos o número de embriões produzidos *in vitro* ultrapassar o número de embriões derivados *in vivo* obtidos em todo o mundo (VELENTE et al., 2022). A criopreservação permite o armazenamento abaixo de zero de células, tecidos, ou outras estruturas biológicas, reduzindo drasticamente processos bioquímicos celulares por longos períodos de tempo (VINING et al, 2021). Um protocolo simples de congelamento de embriões com altas taxas de concepção é sempre um objetivo desejado (GAKUEN, 2019). Embora essas tecnologias permitam o congelamento de gametas e embriões, expor materiais biológicos a baixas temperaturas resulta em danos físicos e perturba as vias metabólicas, portanto compreender como e por que tais processos ocorrem é importante na melhoria da sobrevivência pós descongelamento (VINING et al, 2021).

Embriões submetidos a processos de criopreservação são desafiados termicamente, mecanicamente, tóxica e osmoticamente, o que promove uma mudança no perfil de expressão gênica (VALENTE et al, 2020). O armazenamento bem-sucedido e a sobrevivência das células dependem criticamente da capacidade de induzir e reverter estados de baixa temperatura de maneira controlada que minimiza ou melhora os danos relacionados à transição (BOJIC et al, 2021). As duas principais técnicas de criopreservação utilizadas clinicamente para oócitos e embriões são o congelamento lento e a vitrificação. Na primeira, a fase líquida muda para uma fase sólida cristalina, e na segunda há solidificação para um estado semelhante ao vidro sem formação de gelo (BOJIC et al, 2021).

O congelamento lento é caracterizado por uma diminuição constante da temperatura, com risco de danos à membrana celular por cristalização de gelo, já a vitrificação, por outro lado, evita a formação de cristais de gelo. No entanto, requer uma alta concentração de solução crioprotetora que é tóxica para as células se não for removida completa e rapidamente após o descongelamento (VINING et al, 2021).

Diante do exposto acima que mostra algumas das dificuldades e problemas encontrados nessa técnica, Objetivou-se, com esta revisão de literatura, relatar sobre a produção *in vivo* e *in vitro* de embriões bovinos, pontuar os principais obstáculos e

dificuldades da técnica de criopreservação e também algumas soluções, além, de mostrar os diferentes métodos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A presente revisão teve como fonte de dados, acervo literário online de acordo com a relevância para a temática em estudo. Tais dados apresentam publicações nacionais e internacionais. Na pesquisa, foram utilizadas palavras-chaves como: Criopreservação, bovinos, embriões, produção *in vivo* e *in vitro*. O trabalho foi desenvolvido através de pesquisas bibliográficas nas bases de dados Google acadêmico e Scielo, sendo utilizadas publicações do período de 2017 a 2022 que delimitaram os objetivos do referido trabalho.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção *in vivo* x produção *in vitro* de embriões

No processo clássico de geração de embriões *in vivo*, a indução da superovulação em vacas doadoras tem como objetivo aumentar o número de folículos ovulatórios e conseqüentemente o número de embriões produzidos pelo animal. Para isso, os ovários são estimulados pela ação de hormônios que promovem o desenvolvimento e maturação de vários folículos, de forma simultânea, induzindo ovulações múltiplas (DIAS,2021).Independente de qual gonadotrofina é utilizada durante a superovulação convencional(SOV), a resposta das doadoras pode ser variável, limitando o número de coletas anuais e aumentando os custos de produção. Desta forma, a técnica passou a ser menos atraente, por possuir um alto grau de imprevisibilidade, resultando em problemas que afetam a eficiência e rentabilidade da transferência comercial de embriões. Apesar da qualidade dos embriões produzidos *in vivo* ser superior aos produzidos *in vitro*, com o surgimento da produção *in vitro* a SOV passou a ser menos utilizada (VIANA et al., 2017).

A produção *in vitro* de embriões é um método que permite a coleta de gametas imaturos de forma rápida e frequente, sendo a produção estimada em 3,5 vezes maior que a SOV. A PIV é uma importante biotécnica reprodutiva que permite a interação entre o espermatozoide e o ovócito fora do trato reprodutivo da fêmea, com a formação de um novo indivíduo. O principal objetivo da PIV consiste na obtenção de embriões viáveis a partir de animais de alto valor genético e também aqueles que não estão mais aptos a produzirem descendentes pelas técnicas convencionais. Outro ponto importante é gerar conhecimento nas áreas relacionadas à ovogênese, foliculogênese, fecundação, desenvolvimento embrionário

precoce e outras biotécnicas aplicadas à reprodução animal (DIESEL,2018). É importante ressaltar que o sucesso das técnicas de produção *in vivo* e *in vitro* de embriões depende de diversos fatores ligados ao animal, manejo e ambiente, não somente a técnica e método utilizado (MIKKOLA, et al, 2020).

3.2 Estágio e qualidade dos embriões

Embora a criopreservação de embriões em mamíferos seja um procedimento de rotina, existem diferenças consideráveis de eficiência dependendo do estágio, espécie e origem (produzido *in vivo* ou *in vitro*). O sucesso da criopreservação depende muito da qualidade dos blastocistos (DIESEL, 2018).

Os embriões são pré-avaliados, a fim de se verificar se têm os requisitos necessários para participar de um programa de criopreservação e classificados em estágio de desenvolvimento e qualidade. Embriões aptos a entrarem num programa de criopreservação são aqueles em estágio de mórula ou blastocisto inicial (MOYAARAUJO et al., 2010; JUNQUEIRA, 2019). Embriões bovinos são estruturas com apenas cerca de 90 células, envoltas pela zona pelúcida, o que torna o processo de criopreservação bastante complexo, pois a perda ou injúria destas células pode ser irreparável, principalmente se atingir algum tipo celular específico, como a massa celular interna ou trofotoderma (OLIVEIRA et al., 2014). Já ficou evidente que embriões maiores que 300µm, em estágio de blastocisto, possuem maior taxa de morte celular após criopreservação, principalmente em protocolos de vitrificação (SANCHEZ et al., 2017).

Segundo DIESEL, 2018, embriões cultivados *in vitro* apresentam maior quantidade de lipídeos intracelulares, quando comparados com os produzidos *in vivo*. Esse acúmulo lipídico nos embriões e a localização destas gotículas são fatores que comprometem o desenvolvimento e a qualidade de embriões produzidos *in vitro*, sendo um dos fatores que causam as lesões durante a criopreservação. Durante o cultivo de ovócitos e embriões, as condições *in vitro* são inevitavelmente diferentes daquelas *in vivo*. Além disso, a qualidade do ovócito e do embrião são influenciadas por vários fatores incluindo: tempo, temperatura, composição dos meios de cultura e o oxigênio (DIESEL,2018).

Os fatores da criopreservação propriamente ditos, como tipo de crioprotetor, velocidade da curva de congelamento, tipo de suporte físico para o embrião, formam outro grande leque de alternativas que influenciam na manutenção da viabilidade de embriões submetidos ao processo de criopreservação (SANTIN, 2015).No sentido de aumentar a

viabilidade embrionária após a criopreservação, diferentes autores têm demonstrado que isto pode ser realizado através da adição de alguns agentes lipídicos aos meios, como é caso do ácido linoleico conjugado (CLA) e do Forskolin, onde nota-se uma redução lipídica quando da sua presença nos meios de cultura. Isto se dá através da estimulação da lipólise pelos mesmos (FURNAS, 2017).

3.3 Métodos de criopreservação

Na primeira tentativa para uso da criopreservação em material biológico, foi feito congelamento de sêmen por Spallanzani, em 1776 (RAJAN & MATSUMURA, 2018; OLIVEIRA, 2013). Com essa tentativa ficou claro que a técnica ainda precisava de estudos pois causava danos às células. Em 1942, Polge descobriu que substâncias podiam atuar como protetoras das células, os chamados crioprotetores (RAJAN & MATSUMURA, 2018). 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). A criopreservação de embriões significa uma alternativa para os embriões produzidos que não teriam receptoras disponíveis, além de manter embriões de animais mais velhos ou que já morreram. Os entraves dessa técnica tem sido estabelecer um protocolo com taxas aceitáveis de sucesso (JUNQUEIRA,2019). Sabe-se que os embriões criopreservados sofrem injúrias durante o processo devido a formação de cristais de gelo intracelulares, resultantes da concentração de solutos oriundos do processo de desidratação que levam ao choque osmótico e também por choque térmico. Essas injúrias levam a redução da taxa de sobrevivência e desenvolvimento pós-criopreservação, as quais podem variar de acordo com a espécie, tipo do embrião, método de congelamento, idade, estágio de desenvolvimento embrionário, ambiente de cultivo e até mesmo o sexo (QUEIROZ,2020). Segundo, DIESEL (2018), Os fatores que são suspeitos de causar a maior parte das lesões são as quantidades de gotículas lipídicas intracelulares e as alterações na estrutura microtubular, bem como a relação volume/superfície que influencia a penetração de crioprotetores. As duas principais técnicas de criopreservação utilizadas clinicamente para oócitos e embriões são o congelamento lento e a vitrificação (VINING, 2021).

3.3.1 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). O que segundo DIESEL, 2018, seria um complemento valioso aos procedimentos comerciais de transferência de embriões, e apresentaria vantagens sobre os procedimentos de congelamento atuais, que exigem a remoção passo a passo do crioprotetor após o descongelamento. Eliminaría também a necessidade de embriologistas treinados estarem presentes durante a transferência de embriões.

O congelamento clássico tem a vantagem de usar baixas concentrações de crioprotetores, entretanto permite a formação de cristais de gelo (efeito solução), que, em maior ou menor escala, resultarão em lesões às membranas e organelas. A queda da temperatura é controlada mantendo-se uma curva constante até a atingir a temperatura de -32°C, quando as palhetas contendo os embriões são mergulhadas no nitrogênio líquido (DODEI, 2013).

Durante o processo, forma-se o gelo extracelular, levando a um gradiente de água e soluto diferente entre o meio intra e o extracelular, resultando na saída de água de dentro da célula (RAJAN & MATSUMURA, 2018). Dessa forma, evita-se a formação de cristais de gelo intracelular. Essa técnica foi usada inicialmente para criopreservação de material genético, porém, resulta em baixas taxas de sucesso (JUNQUEIRA,2019). Uma das vantagens do congelamento lento é porque ele é realizado em palhetas de 0,25mL lacradas, ou seja, não existe contato direto do embrião com o nitrogênio, conseqüentemente seu uso não traz risco de contaminação mediada por nitrogênio líquido ou ambiental (DIESEL, 2018).

3.3.1 Vitrificação

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). Com ocorrência mínima de formação de cristais, por conta da rapidez do congelamento, a água intracelular passa de líquida para um estado vítreo, sem transformar-se em gelo (RAJAN & MATSUMURA, 2018). No entanto, a ausência da formação de cristais de gelo, não exclui a possibilidade da ocorrência de danos celulares, como por exemplo, de origem tóxica ou osmótica.

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 diminuem 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. Este método demonstrou melhores taxas de eclosão dos blastocistos após o descongelamento (INABA et al., 2011; DIOGENES et al., 2012; Thaisa 2020).

O método Cryotop, onde é utilizado o volume de vitrificação de 0,1 µL as taxas chegam a ser superiores a 40.000°C/min, muito superiores à velocidade de resfriamento/reaquecimento da palheta de 0,25mL selada que é em torno de 2.500°C / min. Quando comparado com o método tradicional de congelação lenta, o método de vitrificação parece ser mais eficiente para a criopreservação de embriões bovinos PIV, que são mais sensíveis a crio-lesões do que os produzidos *in vivo* (DIESEL, 2018).

4 CONCLUSÃO

Para diminuir os erros e perdas durante o processo, deve-se escolher o método com maior eficácia, com uma qualidade maior de sobrevivência dos embriões após o descongelamento, que de acordo com a pesquisa, seria a vitrificação, que quando comparado com o método tradicional de congelação lenta, parece ser mais eficiente para a criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Entretanto, quando o objetivo for a transferência direta de embriões, o método de eleição seria o congelamento lento, utilizando embriões derivados *in vivo*.

REFERÊNCIAS

DIAS, L. R. O. **Fatores que afetam a produção de embriões pela transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI) em bovinos.** Universidade de Brasília Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Brasília/DF, Março De 2021.

DIESEL, T. O. **Delipidação química na produção *in vitro* e Criopreservação de embriões bovinos.** Universidade Federal de Goiás Escola de Veterinária e Zootecnia Programa de Pós-Graduação Em Zootecnia, Goiânia, 2018.

DODE, M.A.N. ; LEME, L.O. ;SPRÍCIGO, J.F.W. Criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.37, n.2, p.145-150, abr./jun. 2013.

FERRÉ, L. B; KJELLAND, M. E; STROBECH, L. B; HYTTEL, P.; MERMILOD, P.; ROSS, P. J. **Revisão: Avanços recentes na produção in vitro de embriões bovinos: história e métodos da biotecnologia reprodutiva.** The animal consortium, 2019

FREITAS, C. R. **Viabilidade de embriões bovinos produzidos in vitro expostos à alta pressão gasosa no estágio de mórula (d5) e submetidos à criopreservação no estágio de blastocisto (d7).** Universidade Federal do Rio Grande do Sul Faculdade de Veterinária Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Porto Alegre, 2019.

FURNAS, S. A. **Da fertilização à criopreservação dos embriões de bovino: Fatores condicionantes e a sua otimização.** Angra do Heroísmo, 2017.

Queiroz, I. F.; Amorim, A. R; Vilela, D. S.; Silva, M. V.;Dall'Acqua, P. C. **Fatores que interferem no sucesso da criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro e estratégias para aumentar a criotolerância.** UNIFIMES, 2020.

SANTIN, T. R.; BLUME, H.; MONDADORI, R. G. Criopreservação de embriões – metodologias de vitrificação. **Vet. e Zootec.**, p.561-574, v.16, n.4, dez., 2009.

SANTOS, I. R. **Criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro: uma revisão de literatura.** Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos - UNICEPLAC. Gama-DF, 2022.

SILVA, R. R.; VULCANI, V. A. S.; CAMARGOS, A. S.; COSTA, U. R.; DUTRA, M. M.; CHIARI, J. R. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte. **Colloquium Agrariae**, vol. 13, n. Especial, Jan–Jun, 2017, p. 402-415 ISSN: 1809-8215. DOI: 10.5747/ca.2017.v13.nesp.000244.

VELÁZQUEZ, M. A.; ZARAZA, J.; OROPEZA, A.; WEBB, R.; NIEMANN, H. **O papel do IGF1 na produção in vivo de embriões bovinos de doadoras superovuladas.** Sociedade para Reprodução e Fertilidade, 2009.

VINING, L. M.; ZAK, L. J.; HARVEY, S. C.; HARVEY, K. E. **O papel da apoptose em oócitos e embriões de animais criopreservados.** Teriogenologia 173 (2021) 93e101.