



## Avanços na criopreservação de embriões equinos

*Advances of equine embryo cryopreservation*

C.F. Moya-Araujo, G.H.M. Araujo, C. Meira

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de Botucatu, Botucatu, 18618-000, Brasil.  
Correspondência: [meira@fmvz.unesp.br](mailto:meira@fmvz.unesp.br)

### Resumo

A aplicação de técnicas de preservação pelo frio em embriões equinos se tornou indispensável na atual estrutura imposta à indústria equina. A refrigeração, a congelação ou a vitrificação são técnicas que podem ser utilizadas com sucesso na reprodução assistida desta espécie. Entretanto, os embriões equinos têm características que os diferenciam das demais espécies, exigindo que os protocolos sejam adequados aos diferentes estádios dos embriões. Em função da escassez de literatura com criopreservação de embriões equinos, esta revisão explora tanto a refrigeração de embriões visando a seu transporte durante a estação ovulatória, quanto à congelação e vitrificação visando a sua utilização futura, seja na transferência a uma receptora de melhor qualidade ou na otimização da produção quando necessita seguir uma estação reprodutiva determinada pelo ano hípico. O sucesso da criopreservação depende de vários fatores, dos quais se destacam o diâmetro dos embriões no momento da criopreservação, pois os embriões nas fases iniciais de desenvolvimento (<300 µm) são mais resistentes ao processo de congelação ou vitrificação, bem como o tipo de crioprotetor e a metodologia empregada. Este trabalho tem como objetivo descrever diferentes aspectos relacionados com as características do embrião equino, bem como levantar as metodologias e os respectivos resultados descritos na literatura.

**Palavras-chave:** avaliação embrionária, congelação, égua, refrigeração, vitrificação.

### Abstract

*The use of low temperature techniques to preserve embryos became essential at the actual level of the equine industry. The cooling, freezing, and vitrification are successful techniques applied on assisted reproduction for this specie. This review explores extensively the equine embryos cryopreservation aiming their transport during the ovulatory season. Furthermore, the utilization of freezing and vitrification aiming the storage and future use of embryos, and the production optimization in cases when a breeding season is determined by racing calendar are considered. Accomplishment of these techniques depends on the embryos diameter at the cryopreservation moment. Smaller embryos at early stages of development (<300µm) are more resistant to freezing or vitrification processes due to less amount of fluid present at the blastocoele and a not completed developed embryonary capsule, allowing a better cellular dehydration and consequently better post-transfer pregnancy rates.*

**Keywords:** cooling, embryonic evaluation, freezing, mare, vitrification.

### Introdução

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

Técnicas para refrigerar e armazenar embriões a 5°C por até 24 horas foram desenvolvidas, possibilitando a transferência de embriões em centrais de receptoras distantes dos haras onde se encontram as doadoras. A refrigeração tem como limitação o curto período de tempo que os embriões se mantêm viáveis, ao passo que a congelação ou a vitrificação permitem o armazenamento e a preservação embrionária por tempo indeterminado.

Embora a primeira prenhez e o primeiro potro nascido de embriões equinos congelados tenham sido relatados por Griffin et al. (1981) e Yamamoto et al. (1982), respectivamente, a congelação de embriões na espécie equina ainda não é um procedimento rotineiro (Seidel Jr, 1996; Squires et al., 1999; 2003).

Nos primeiros estudos de congelação de embriões equinos, empregaram-se protocolos e crioprotetores utilizados com sucesso em outras espécies, com pequenas adaptações (Bass et al., 2004). O glicerol, o dimetil sulfoxido (DMSO), o etilenoglicol e o 1,2-propanodiol foram testados, porém apenas os embriões congelados com glicerol e etilenoglicol resultaram em taxas aceitáveis de gestação (Ashwood-Smith e Lough, 1975; Slade et al., 1985; Meira et al., 1993; Hochi et al., 1996; Ulrich e Nowshari, 2002).



Mesmo com resultados satisfatórios, a congelação lenta exige equipamentos de alto custo, dificultando seu emprego a campo, o que determinou a busca de novas modalidades de criopreservação, destacando-se a vitrificação, que é um processo rápido e não requer equipamento especial.

Os embriões equinos têm características que os diferenciam das demais espécies, exigindo que os protocolos sejam adequados de acordo com os embriões. Entretanto, a escassez de literatura com criopreservação de embriões equinos dificulta sua difusão. A presente revisão tem por objetivo descrever diferentes aspectos relacionados com as características do embrião equino, bem como fazer um levantamento das metodologias e resultados existentes na literatura.

### Refrigeração de embriões

Um dos principais avanços na transferência de embriões na espécie equina nos últimos anos foi o desenvolvimento do processo de refrigeração, o qual permite armazenar embriões a 5°C por até 24 horas. A refrigeração preserva células por reduzir o metabolismo e a divisão celular, bem como possibilita o transporte de embriões entre propriedades ou para centrais de receptoras, sendo então transferidos. O envio de embriões refrigerados para centrais se faz necessário, especialmente, nas propriedades que não dispõem de receptoras aptas no momento da colheita ou que consideram oneroso manter um plantel de éguas receptoras (Seidel Jr et al., 1989; Squires et al., 2003). Além disso, o transporte de embriões é mais seguro, pois se torna desnecessário transportar éguas doadoras, minimizando custos e possíveis acidentes que possam ocorrer (Moussa et al., 2003).

Diferentes estudos demonstram a viabilidade de se empregar a refrigeração para embriões equinos. Clark et al. (1985) mantiveram embriões equinos em meio Ham's F-10 com 10% de soro fetal bovino a 5, 24 ou 37°C por 12 horas e observaram que eles foram capazes de continuar o desenvolvimento durante cultivo *in vitro* a 37°C pós-refrigeração. Carnevale et al. (1987) relataram que o meio Ham's F-10 mantinha o embrião viável por até 24 horas, e Carney et al. (1991), utilizando o mesmo meio, concluíram que as taxas de gestações provenientes de embriões refrigerados a 5°C e mantidos a essa temperatura por até 24 horas foram similares às taxas dos embriões transferidos imediatamente após a colheita. Ao comparar os meios Ham's F-10 e EmCare™ na refrigeração de embriões a 5°C por 24 horas, McCue et al. (2000) relataram não haver diferença nas taxas de gestação para os meios estudados. Contudo, o Ham's F-10 contém tampão bicarbonato que requer uma atmosfera específica em CO<sub>2</sub> (5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub>) para manter o pH adequado, o que, segundo Moussa et al. (2004b), dificulta a utilização desse meio para o transporte de embriões.

Fleury et al. (2002) realizaram estudos aplicados de refrigeração de embriões a uma temperatura de 15 a 18°C utilizando Ham's F-10 com Hepar e 0,4% de Albumina Sérica Bovina (BSA), sem atmosfera específica de CO<sub>2</sub>, em diferentes períodos de tempo antes da transferência. Os embriões foram divididos em grupos de acordo com o tempo de estocagem em: <1 h, 1 a 4 h, 4 a 8 h e 12 a 18 h. Em cada grupo, os embriões foram subdivididos em <1000 µm ou >1000 µm, não sendo observada diferença significativa nas taxas de gestação entre os grupos ou em relação ao diâmetro dos embriões.

Moussa et al. (2002), utilizando a coloração DAPI, compararam a viabilidade de embriões equinos frescos ou refrigerados a 5°C por 6 ou 24 horas em meio Ham's F-10 ou EmCare™, observando-se número de células mortas significativamente menor para os embriões frescos ou refrigerados por 6 h em comparação aos refrigerados por 24 horas, sem que fosse detectada diferença no número de células mortas entre os meios utilizados. Estudo complementar dos mesmos autores (Moussa et al., 2003) verificou a viabilidade *in vitro* de embriões de sete dias (D7) mantidos por 6 ou 24 horas a 5°C em Ham's F-10, EmCare ou em meio Vigro. Os resultados indicaram viabilidade embrionária similar nos três meios avaliados, porém detectou-se aumento no número de células mortas (coloração DAPI) com o maior tempo de refrigeração. No mesmo experimento, avaliou-se a taxa de gestação após a transferência de outros embriões D7 refrigerados a 5°C por 24 horas em meio Ham's F-10 ou EmCare, obtendo-se 53% e 47% de gestação para os embriões refrigerados em Ham's F-10 ou EmCare, respectivamente (P > 0,05), indicando que a maior porcentagem de células mortas observadas *in vitro* possivelmente não influenciou nas taxas de prenhez.

Resultados *in vitro* similares aos descritos acima foram observados por McCue et al. (2000), no entanto os embriões maiores foram mais resistentes à refrigeração do que os menores. Linder et al. (1983) demonstraram, em bovinos, que os blastocistos expandidos (Bx) D7 e D8 são mais tolerantes à refrigeração do que os embriões menores. Clark et al. (1987) relataram que embriões equinos pequenos (<175 µm) foram mais susceptíveis aos danos causados pela refrigeração do que os embriões maiores, e Carnevale et al. (2000) observaram que o diâmetro e o estágio de desenvolvimento embrionário são fatores que afetam a taxa de gestação em receptoras que receberam embriões refrigerados.

A qualidade de blastocistos D7 a fresco ou após a refrigeração a 5°C por 6 ou 24 horas em meio Ham's F-10, EmCare ou Vigro foi avaliada por Moussa et al. (2004b), que utilizaram a coloração DAPI para indicar células vivas (não coradas; DAPI-) ou mortas (coradas; DAPI+) e o TUNEL para detectar apoptose celular, sendo que as células coradas apresentam apoptose (TUNEL+) e as não coradas, ausência de apoptose (TUNEL-). Os autores levaram em consideração as quatro situações, DAPI+ e TUNEL+ células mortas com apoptose avançada; DAPI- TUNEL+ células vivas com início de apoptose, DAPI- e TUNEL- células vivas e sem indício

de apoptose e DAPI+ e TUNEL- células mortas e sem apoptose. A média de células mortas indicadas pela DAPI foi significativamente maior nos embriões refrigerados por 24 horas, em comparação aos embriões frescos ou refrigerados por 6 horas para os três meios avaliados, porém não foi observada diferença entre os meios no período de 24 horas, corroborando com resultados de trabalhos anteriores. A porcentagem média de células coradas pela técnica do TUNEL, mortas ou vivas pelo DAPI, foi semelhante entre os embriões frescos ou refrigerados por 6 horas, porém significativamente maior naqueles refrigerados por 24 horas. Contudo, não se observou diferença na porcentagem de células coradas apenas pelo TUNEL entre os embriões frescos, refrigerados por 6 ou 24 horas, indicando que a morte celular observada durante a refrigeração a 5°C não é decorrente da indução de apoptose.

### Congelação de embriões

A congelação de embriões equinos é uma biotecnologia que proporciona um maior aproveitamento do potencial reprodutivo de animais cuja estação de monta é definida pelo ano hípico, assim como permite armazenar embriões em um banco de germoplasma para a espécie. Entretanto, o emprego em escala comercial ainda é limitado, pois a baixa taxa de recuperação embrionária limita o número de embriões obtidos por doadora em uma estação reprodutiva, além de haver resistência pela maioria das associações das raças em relação ao uso de embriões congelados. Assim, em poucas ocasiões há disponibilidade de embriões comerciais para a congelação (Bass et al., 2004; Squires, 2005). Mudanças nas restrições pelas associações e o desenvolvimento de um protocolo adequado de superovulação levarão ao aumento na disponibilidade de embriões para criopreservação (Squires et al., 2003), contribuindo para a utilização de embriões congelados.

As vantagens do processo de congelação incluem importação e exportação de embriões congelados; redução considerável dos custos para introdução de nova genética no país; possibilidade de preservação de material genético e redução do número de receptoras necessárias em um programa de transferência (Squires, 2005).

Na congelação convencional, o aspecto mais importante é a necessidade de se remover a água das células antes e durante o resfriamento, minimizando, assim, a formação de cristais de gelo intracelulares, os quais causam danos irreversíveis ao citoesqueleto celular (Munar, 1988). Para isso, faz-se necessária a adição de crioprotetores ao meio, visando preservar a capacidade de sobrevivência das células durante o processo de congelação. Duas classes de crioprotetores são utilizadas: os não permeáveis ou extracelulares, como a glicose, a sacarose, a rafinose, as proteínas e as lipoproteínas, e os permeáveis ou intracelulares, como o DMSO, o glicerol, o propanodiol, o propilenoglicol e o etilenoglicol (Seidel Jr et al., 1989; Kasai, 1996).

Na congelação convencional, utilizam-se baixa concentração de crioprotetor e velocidade controlada de resfriamento (Slade et al., 1985; Squires et al., 1989). Normalmente o meio contendo crioprotetor é adicionado em temperatura ambiente, e a palheta é resfriada a uma taxa de 4°C/minuto até a temperatura de -6°C, quando então se induz à cristalização (seeding), permanecendo nessa temperatura por 5 a 15 minutos (fase de estabilização). A seguir, procede-se ao resfriamento em taxa de 0,3 a 0,5°C/minuto até -30 ou -35°C. Alguns protocolos preconizam uma queda mais lenta de temperatura (0,1°C/minuto) entre -33 até -38°C, quando as palhetas são mergulhadas em nitrogênio líquido onde são armazenadas (Slade et al., 1985; Meira et al., 1993).

O primeiro potro nascido a partir de embriões D6 congelados foi relatado por pesquisadores japoneses (Yamamoto et al., 1982). Posteriormente, Takeda et al. (1984) congelaram embriões equinos D6 em ampolas de 1mL utilizando o glicerol como crioprotetor, e observaram resultados similares (50% de taxa de gestação) aos encontrados por Yamamoto et al. (1982), indicando que os embriões de seis dias de idade resistem bem à congelação.

Slade et al. (1985) compararam a viabilidade de blastocistos iniciais (Bi) e blastocistos (Bl) congelados em palheta 0,5mL ou em ampola de 1mL com glicerol como crioprotetor. O resfriamento foi de 4°C/minuto até temperatura de -6°C, com 15 minutos de estabilização após a indução da cristalização e curva de resfriamento de 0,3°C/minuto até -30°C, e de 0,1°C/minuto até -33°C. Após a descongelação, 26,08% (6/23) dos embriões foram considerados inadequados para transferência, sendo os demais transferidos para receptoras previamente selecionadas. Nos embriões no estágio de Bi, a taxa de gestação foi de 80% (8/10), contudo dos sete embriões no estágio de Bl, obteve-se apenas uma gestação (14,28%).

No Brasil, Meira e Alvarenga (1993) relataram o nascimento de dois potros no ano de 1991 a partir de embriões congelados em meio à base de glicerol. Os embriões foram colocados em solução com 0,75M de glicerol por dez minutos e, em seguida, transferidos para solução com 1,5M do mesmo crioprotetor, permanecendo por vinte minutos, sendo, então, congelados. De seis embriões descongelados e transferidos, obtiveram-se três gestações e dois nascimentos.

As melhores taxas de gestação são obtidas com embriões congelados em estágio de mórula (Mo) ou Bi D6 a D6,5 (Bruyas et al., 2000; Maclellan et al., 2003). Nesta fase, a cápsula embrionária não está desenvolvida completamente, o que deve contribuir para os resultados, pois a cápsula embrionária, estrutura acelular que se forma entre os dias D6,5 a 7 entre a zona pelúcida e o trofoblasto, pode interferir no processo de desidratação e congelação (Landim-Alvarenga, 1995; Dobrinsky, 2002; Allen, 2005; Stout et al., 2005). Entretanto, alguns



pesquisadores relatam baixa taxa de recuperação embrionária (menor 45%) em colheitas realizadas no dia 6 após a ovulação (Boyle et al., 1989; Hochi et al., 1996; Stout et al., 2005; Scherzer et al., 2008), enquanto outros descrevem taxas entre 70 e 80% (Carnevale et al., 2004a, b). Esta discrepância pode estar relacionada ao atraso no desenvolvimento embrionário que ocorre em determinadas éguas velhas ou em inseminações pós-ovulação, que levam a atraso no processo de fecundação em relação ao momento da detecção da ovulação, retardando a migração do embrião para o útero (Carnevale, 2006).

Lascombes e Pashen (2000) obtiveram 56% de taxa de gestação com embriões  $\leq 200$   $\mu\text{m}$  congelados em glicerol. Skidmore et al. (1991) testaram dois métodos de congelamento de embriões pequenos ( $< 300$   $\mu\text{m}$ ): no primeiro adicionaram-se 10% de glicerol em duas etapas (5 e 10%), e no segundo em quatro etapas (2,5, 5, 7,5 e 10%), seguindo a curva de resfriamento descrita por Slade et al. (1985). A taxa de gestação não diferiu entre os dois métodos, sendo de 40% (4/10) e 55% (6/11), respectivamente.

As taxas de gestação oriundas de embriões maiores congelados são extremamente baixas (Squires et al., 1989; Legrand et al., 2000; Maclellan et al., 2003; Squires et al., 2003) e possivelmente estejam relacionadas à espessura da cápsula embrionária e a congelabilidade embrionária, sugerindo que a cápsula deve dificultar a penetração do crioprotetor e a desidratação celular durante o processo de congelamento (Wright e Diamond, 1969; Seidel Jr et al., 1989; Young et al., 1997; Bruyas et al., 2000; Squires et al., 2003). Ao avaliarem a relação da espessura da cápsula embrionária e o dano celular de embriões pós-congelamento e descongelamento, Legrand et al. (2000) concluíram que embriões com cápsula espessa sofreram mais danos celulares do que aqueles sem ou com cápsula fina.

A digestão parcial da cápsula de blastocisto expandido (Bx) utilizando-se uma solução de tripsina 0,2% por 15 minutos antes da congelamento resultou em taxa de gestação de 75% (6/8; Legrand et al., 2000), porém os mesmos autores, em 2002, relataram taxas de 27,27% (3/11) para embriões com as mesmas características. Resultados de 0% (0/7) para embriões tratados com tripsina 0,2% foram descritos por Maclellan et al. (2002). A discrepância observada nos resultados foi atribuída à destruição de organelas e do citoesqueleto durante a criopreservação que possivelmente tenha ocorrido tanto pelo tempo de exposição à tripsina quanto pelo processo de congelamento e descongelamento (Dobrinsky, 1996).

A citocalasina, um estabilizador de citoesqueleto, protege estruturas microfilamentosas de embriões suínos durante a criopreservação e aumenta significativamente o desenvolvimento embrionário *in vitro* e *in vivo* após a descongelamento (Dobrinsky et al., 2000). Em equinos, Maclellan et al. (2002) reportaram que o tratamento de Bx com citocalasina antes da congelamento resultou em taxa de gestação de 42,85% (3/7) semelhante a 57,14% (4/7) de embriões pequenos (Mo e Bi) congelados usando-se protocolo convencional com glicerol. Tharasanit et al. (2005) investigaram os efeitos de pré-tratamentos com 0,2% de tripsina em PBS por 15 minutos ou com 7,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de citocalasina em DMSO por 10 minutos na viabilidade de Bx (D7 a D7,5) grau 1 e 2, que foram submetidos à desidratação em solução a 10% de glicerol e congelados. O pré-tratamento com tripsina ou citocalasina melhorou a conservação do citoesqueleto e reduziu o número de células mortas após a descongelamento. A remoção da cápsula embrionária de Bx por meio de micromanipulador antes da congelamento não resultou em formação de vesícula embrionária pós-descongelamento e transferência (Stout et al., 2005).

Empregando adaptações no método de congelamento convencional, diferentes pesquisadores avaliaram o efeito de diversos crioprotetores na congelamento de embriões equinos. Poitras et al. (1994) observaram que 67,5% dos embriões congelados com 10% de glicerol mantiveram sua qualidade após descongelamento e cultivo por 24 horas. Meira et al. (1993) compararam a eficiência de 11% de glicerol com o 11% de 1,2-propanodiol para embriões no estágio de Mo e Bi D6 ou B1 e Bx D7 grau 1, observando-se taxa de gestação de 40% (6/15) para Mo e Bi congelados com 11% de glicerol, porém nenhum Bx resultou em gestação. Adicionalmente, nenhum embrião congelado com 1,2-propanodiol desenvolveu-se após a transferência (0/15), independente do estágio de desenvolvimento. Bruyas et al. (1997) relataram que o 1,2-propanodiol parece ser pouco tóxico para embriões equinos, mas não preserva adequadamente a célula. Ferreira et al. (1997) avaliaram o efeito do glicerol ou associação 1,2-propanodiol + glicerol na congelamento de embriões D6. A taxa de gestação foi de 13,3% e 0%, para glicerol e glicerol + 1,2-propanodiol, respectivamente, não sendo observado benefício na associação desses crioprotetores na criopreservação de embriões equinos.

O etilenoglicol, amplamente utilizado em bovinos, foi testado para a congelamento de embriões equinos por Hochi et al. (1996), que obtiveram 25% de gestação para Bi, sendo que o uso combinado com 0,1 M de sacarose elevou a taxa de prenhez para 63,3%. Rosas et al. (1997), utilizando apenas o etilenoglicol 1,5 M na criopreservação de embriões D6 e D7, obtiveram 83,3% de desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Huhtinen et al. (2000) não encontraram diferenças na taxa de gestação e na porcentagem de células mortas avaliadas após coloração DAPI para embriões congelados com glicerol associado à glutamina, em comparação àqueles congelados após a desidratação utilizando-se etilenoglicol 1,5 M. Para verificarem o efeito da glutamina, Lagneau et al. (2000) utilizaram diferentes concentrações associadas ao glicerol na congelamento de embriões e observaram menor porcentagem de morte celular quando foi adicionado 100mM de glutamina ao meio. Bruyas et al. (2000) detectaram inviabilidade celular para embriões congelados utilizando-se etilenoglicol em relação àqueles submetidos ao glicerol que se apresentaram viáveis, sem que fosse detectada célula morta, observação que contradiz os resultados de Huhtinen et al. (2000).



Bass et al. (2004) compararam o efeito do metanol e do glicerol como crioprotetor de embriões grandes (300 a 1000  $\mu\text{m}$ ). Os embriões foram criopreservados utilizando-se solução contendo 48% de metanol ( $n = 22$ ) ou 10% de glicerol ( $n = 21$ ) e curva de resfriamento conforme descrita por Slade et al. (1985). Apesar de não ter sido observada diferença significativa nas taxas de gestação, 38% (glicerol) e 22% (metanol), o segundo aparenta ser menos efetivo na proteção de embriões grandes contra os efeitos deletérios da congelação em relação ao glicerol.

### Vitrificação de embriões

O processo de vitrificação é definido como a solidificação de uma solução por meio da elevação da viscosidade durante o rápido resfriamento sem a formação de cristais de gelo (Fahy et al., 1984; Vajta et al., 1998). Quando comparada à congelação convencional, a vitrificação reduz o tempo do procedimento e o custo com equipamentos para a execução da técnica (Carnevale et al., 2004b; Eldridge-Panuska et al., 2005; Carnevale, 2006). Segundo Rall e Fahy (1985), Carnevale et al. (2004b) e Moussa et al. (2005), durante esse procedimento, o embrião é exposto a altas concentrações de crioprotetores por curto período de tempo e resfriado a uma velocidade de 2500°C/minuto para que ocorra a formação de um estado vítreo em vez de cristais de gelo.

Após a primeira gestação de embrião equino vitrificado descrito por Hochi et al. (1994), o trabalho de Oberstein et al. (2001) comparou a eficiência de dois métodos para vitrificar embriões (OPS “open pulled straw” e Cryoloop) com a curva convencional de congelação. Em todos os casos foram utilizados embriões  $\leq 300 \mu\text{m}$  e grau 1 ou 2. O meio de congelação continha 1,8 M de etilenoglicol e 0,1 M de sacarose, e o meio de vitrificação 16,5% de etilenoglicol, 16,5% de DMSO e 0,5 M de sacarose. Após a descongelação e/ou reaquecimento, os embriões foram cultivados por 20 horas e, em seguida, corados com iodeto de propídio e Hoechst 33342. Foram observados resultados semelhantes na crioproteção celular, sendo constatadas 74% de células vivas para os embriões congelados e 51% para os vitrificados.

Eldridge-Panuska et al. (2005) realizaram experimento vitrificando embriões colhidos entre D6,5 e D7,5, a fim de avaliar a eficiência da técnica em criopreservar embriões pequenos ( $\leq 300 \mu\text{m}$ ) e grandes ( $>300 \mu\text{m}$ ), bem como o método de transferência direta “one step” em comparação à remoção dos crioprotetores após a descongelação seguida de transferência. Para a remoção dos crioprotetores após a descongelação, os embriões foram colocados em gotas de 200  $\mu\text{L}$  de 0,25 M de galactose em PBS, permanecendo por 5 minutos e então transferidos para PBS. A taxa de prenhez aos 16 dias de gestação para embriões  $\leq 300 \mu\text{m}$  foi de 62% (16/26) para os vitrificados e transferidos diretamente, e de 45% (10/22) para aqueles cuja remoção do crioprotetor foi realizada. Os embriões  $>300 \mu\text{m}$  não resultaram em gestação (0/19) após a vitrificação. Corroborando com estes resultados, Carnevale et al. (2004a) relataram taxas de 75% de gestação para embriões vitrificados com diâmetro  $\leq 300 \mu\text{m}$ .

Moussa et al. (2004a, 2005) compararam a eficiência da criopreservação usando a congelação convencional e a vitrificação com OPS de embriões equinos D6,5 e D6,75 avaliando *in vitro* a viabilidade pós-descongelação pela coloração DAPI. A porcentagem média de células mortas foi semelhante para embriões congelados pelo método convencional (42%) e para os vitrificados (46%). Castanheira et al. (2004) compararam a viabilidade *in vitro* de embriões vitrificados em etilenoglicol, etilenoglicol + sacarose ou etilenoglicol + trealose e observaram que a associação de crioprotetores permeáveis e não permeáveis resultou em aumento na porcentagem de células viáveis após a descongelação, porém não foi detectada diferença no tipo do açúcar empregado.

Hudson et al. (2006) vitrificaram embriões  $<300 \mu\text{m}$  com menos de 1 hora após a colheita e embriões refrigerados a 5°C por até 19 horas, observando-se taxa de 75% (15/20) e 65% (13/20) de prenhez, respectivamente. A similaridade nos índices de gestação sugere a possibilidade de transporte de embriões refrigerados previamente à vitrificação.

Quanto ao diâmetro dos embriões previamente à vitrificação, a literatura indica índices de gestação muito baixos para embriões  $>300 \mu\text{m}$ . Campos-Chillon et al. (2006) obtiveram 35% (6/17) de prenhez aos 16 dias, para embriões de 300 a 750  $\mu\text{m}$  vitrificados em meios com concentrações variáveis de etilenoglicol, porém os autores não mencionam qual diâmetro dos embriões originou as gestações. Na tentativa de vitrificar embriões grandes, Scherzer et al. (2008) reduziram o volume de Bx pela aspiração do fluido da blastocela e injetaram solução crioprotetora a 1,4M de glicerol antes da vitrificação, obtendo-se uma gestação diagnosticada aos 15 dias pós-ovulação, porém ocorreu morte embrionária entre os dias 16 e 28.

Dentre os diferentes métodos propostos para a vitrificação de embriões equinos, o que resultou em taxa de prenhez satisfatória e tem mantido repetibilidade foi o descrito por Eldridge-Panuska et al. (2005) e Carnevale (2006), no qual três passos no processo de desidratação são utilizados para, em seguida, realizar-se a vitrificação. Primeiramente o embrião permanece por 5 minutos em meio a 1,4 M de glicerol, em seguida é transferido para o meio contendo 1,4 M de glicerol + 3,6 M de etilenoglicol permanecendo por mais 5 minutos, e novamente é transferido para a última solução crioprotetora contendo 3,4 M de glicerol + 4,6 M de etilenoglicol onde



permanece por tempo inferior a 1 minuto. Durante esta última etapa, envasa-se o embrião em palheta de 0,25 mL, sendo que a coluna contendo o embrião deve ser separada por duas colunas de ar e duas colunas de galactose a 0,5 M para, em seguida, ele ser vitrificado.

### Avaliação de embriões criopreservados

A avaliação de embriões frescos baseia-se na morfologia embrionária conforme proposto por McKinnon e Squires (1988), no entanto não é possível observar a viabilidade celular.

Sabe-se que a criopreservação causa danos na ultraestrutura e morte celular, prejudicando o metabolismo e a viabilidade de muitos embriões. Sem dúvida, a melhor forma de avaliação de embriões após congelamento é a taxa de gestação e nascimento. Entretanto, o elevado custo de manutenção de receptoras e o tempo demandado até o nascimento do produto evidenciam a necessidade de métodos de avaliação *in vitro* mais simples e rápidos. Técnicas que usam sondas fluorescentes foram utilizadas para verificar a viabilidade de embriões mamíferos criopreservados, dentre elas, o diacetato de fluoresceína (FDA), que cora células vivas, e a Rhodamina 123, específica para mitocôndrias, útil na avaliação da integridade metabólica embrionária (Majumdar, 1990).

A coloração com 4',6'-diamino-phenylindole (DAPI), previamente usada em embriões bovino e leporino, pode ser utilizada para determinar o número de células mortas. A taxa de sobrevivência embrionária após a transferência parece estar relacionada a maior ou menor porcentagem de células mortas (Huhtinen et al., 1995). Os mesmos autores (Huhtinen et al., 1997) utilizaram a coloração com DAPI para avaliar embriões equinos congelados e concluíram que esse método não influenciou na sobrevivência embrionária, pois as taxas de gestação foram similares para os embriões corados e não corados. Adicionalmente, o mesmo método de coloração foi utilizado para avaliar possíveis diferenças na viabilidade de embriões congelados ou refrigerados, e a técnica mostrou ser útil como um critério para a análise de embriões (Lagneaux et al., 2000).

Avaliação de células embrionárias apoptóticas foi realizada utilizando o corante terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) conhecido como técnica do TUNEL, um método que permite avaliar a fragmentação do DNA nuclear *in situ* (Brison e Schultz, 1997).

### Considerações finais

Um grande avanço no conhecimento da criopreservação de embriões equinos ocorreu nos últimos anos, sendo a refrigeração, a congelamento ou a vitrificação utilizadas com sucesso na reprodução assistida desta espécie. No entanto, o sucesso depende de vários fatores; dentre eles destaca-se o diâmetro dos embriões no momento da criopreservação, pois os embriões nas fases iniciais de desenvolvimento (Mo e Bi) menores que 300µm são mais resistentes ao processo de congelamento ou vitrificação por apresentarem menor quantidade de fluido na blastocela e cápsula embrionária pouco desenvolvida, o que permite adequada desidratação celular, preservação de maior percentual de células durante o procedimento e, conseqüentemente, resulta em maiores índices de gestação pós-transferência.

Quanto à taxa de recuperação de embriões menores que 300 µm, ainda há discrepância entre os resultados descritos na literatura. Alguns pesquisadores relatam taxas de 70 a 80%, e outros descrevem taxas menores que 45%.

Dentre as três possibilidades de criopreservação, a refrigeração é a mais utilizada durante a estação ovulatória, pois permite o transporte por até 24 horas sem prejuízo no índice de prenhez em comparação aos embriões frescos, além de minimizar custos com manutenção de receptoras e transporte de doadoras.

### Referências bibliográficas

- Allen WR. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. *Reprod Domest Anim*, v.40, p.310-329, 2005.
- Ashwood-Smith MJ, Lough P. Cryoprotection of mammalian cells in tissue culture with methanol. *Cryobiology*, v.12, p.517-518, 1975.
- Bass LD, Denniston DJ, Maclellan LJ, McCue PMP, Seidel Jr GE, Squires EL. Methanol as a cryoprotectant for equine embryos. *Theriogenology*, v.62, p.1153-1159, 2004.
- Boyle MS, Sanderson MW, Skidmore JA, Allen WR. Use of serial progesterone measurements to assess cycle length, time of ovulation and timing of uterine flushes in order to recover equine morulae. *Equine Vet J Suppl*, n.8, p.10-13, 1989.
- Brison DR, Schultz RM. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha (TGF- $\alpha$ ). *Biol Reprod*, v.56, p.1088-1096, 1997.
- Bruyas JF, Martins-Ferreira C, Fieni F, Tainturier D. Effect of propanediol on the morphology of fresh and frozen equine embryos. *Equine Vet J Suppl*, n.25, p.80-84, 1997.
- Bruyas JF, Sanson JP, Battut I, Fieni F, Tainturier D. Comparison of the cryoprotectant properties of



- glycerol and ethylene glycol for early day 6 equine embryos. *J Reprod Fertil*, v.56, p.549-560, 2000.
- Campos-Chillon LF, Cox TJ, Seidel Jr GE, Carnevale EM.** Vitrification in vivo of large equine embryos after vitrification or culture. *Reprod Fertil Dev*, v.18, p.151, 2006. Abstract.
- Castanheira PN, Amaral DCG, Vasconcelos AB, Arantes RME, Stahlberg R, Lagares MA.** Cryopreservation of equine embryo by vitrification. In: *International Symposium on Equine Embryo Transfer*, 6, 2004, Rio de Janeiro. *Proceedings...* Rio de Janeiro: ISEET, 2004. p.50-52.
- Carnevale EM.** Vitrification of equine embryos. *Vet Clin Equine*, v.22, p.831-841, 2006.
- Carnevale EM, Eldridge-Panuska WD, Caracciolo Di Brienza V.** How to collect and vitrify equine embryos for direct transfer. In: *Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, 50, 2004, Denver, CO. *Proceedings...* Lexington, KY: AAEP, 2004a. p.402-405.
- Carnevale EM, Eldridge-Panuska WD, Caracciolo Di Brienza V, Seidel Jr. GE, Squires EL.** Embryo development rates after vitrification and transfer of equine embryos. In: *International Symposium on Equine Embryo Transfer*, 6, 2004, Rio de Janeiro. *Proceedings...* Rio de Janeiro: ISEET, 2004b. p.45-46.
- Carnevale EM, Ramirez RJ, Squires EL, Alvarenga MA, Vanderwall DK, McCue PM.** Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. *Theriogenology*, v.54, p.965-974, 2000.
- Carnevale EM, Squires EL, McKinnon AO.** Comparison of Ham's F-10 with CO<sub>2</sub> or Hepes buffer for the 24h storage of equine embryos at 5°C. *J Anim Sci*, v.65, p.1775-1781, 1987.
- Carney NJ, Squires EL, Cook VM, Seidel Jr GE, Jasko DJ.** Comparison of pregnancy rates from transfer of fresh versus cooled, transported equine embryos. *Theriogenology*, v.36, p.23-32, 1991.
- Clark KE, Squires EL, McKinnon AO, Seidel Jr GE.** Viability of stored equine embryos. *J Anim Sci*, v.65, p.534-542, 1987.
- Clark KE, Squires EL, Takeda T, Seidel Jr GE.** Effect of culture media on viability of equine embryos *in vitro*. *Equine Vet J Suppl*, n.3, p.35, 1985.
- Dobrinsky JR.** Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology*, v.57, p.285-302, 2002.
- Dobrinsky JR.** Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology*, v.45, p.17-26, 1996.
- Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR, Johnson LA.** Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biol Reprod*, v.62, p.564-570, 2000.
- Eldridge-Panuska WD, Caracciolo Di Brienza V, Seidel Jr. GE, Squires EL, Carnevale EM.** Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos. *Theriogenology*, v.63, p.1308-1319, 2005.
- Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT.** Vitrification as a approach to cryopreservation. *Cryobiology*, v.21, p.407-426, 1984.
- Ferreira JCP, Meira C, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Alvarenga MA, Buratini J.** Cryopreservation of equine embryos with glycerol plus sucrose and glycerol plus 1,2-propanediol. *Equine Vet. J Suppl*, n.25, p.88-93, 1997.
- Fleury JJ, Fleury PDC, Landim-Alvarenga FC.** Effect of embryo diameter and storage period on pregnancy rates obtained with equine embryos stored in Ham's F-10 with Hepes buffer at a temperature of 15 - 18°C - preliminary results. *Theriogenology*, v.58, p.749-750, 2002.
- Griffin JL, Castleberry RS, Schneider Jr HS.** Influence of Day of collection on recovery rate in mature cycling mares. *Theriogenology*, v.15, p.106, 1981.
- Hochi S, Fujimoto T, Braun J, Oguri N.** Pregnancies following transfer of equine embryos cryopreserved by vitrification. *Theriogenology*, v.42, p.483-488, 1994.
- 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.
- Hudson J, McCue PM, Carnevale EM, Welch S, Squires EL.** The effects of cooling and vitrification of embryos from mares treated with equine follicle-stimulating hormone on pregnancy rates after nonsurgical transfer. *J Equine Vet Sci*, v.26, p.51-54, 2006.
- Huhtinen M, Bredbacka P, Kotilainen T.** Non surgical transfer of 40,60-diamidino-2-phenylindole-stained equine demi-embryos treated with cytocholasin B and Nocodazole. *Biol Reprod Monog*, p.325-328, 1995.
- Huhtinen M, Lagneaux D, Koskinen E, Palmer E.** The effect of sucrose in the thawing solution on the morphology and mobility of frozen equine embryos. *Equine Vet J Suppl*, n.25, p.94-97, 1997.
- Huhtinen M, Sjöholm A, Paranko J.** Comparison of glycerol and ethylene glycol in equine embryo freezing using confocal microscopy, DAPI-staining and nonsurgical transfer. In: *International Symposium on Equine Embryo Transfer*, 5, 2000, Saari, Finland. *Proceedings...* Saari, Finland: ISEET, 2000. v.3, p.52-54.
- Kasai M.** Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Anim Reprod Sci*, v.42, p.67-75, 1996.
- Lagneaux D, Pomarici AM Sattler M, Bruneau T, Duchamp G, Camillo F.** Effect of L-glutamine for freezing equine embryos - evaluation of DAPI staining and transfer of multiple embryos to recipient mare. *J Reprod Fertil Suppl*, n.56, p.561-568, 2000.



- Landim-Alvarenga FC.** *Avaliação dos efeitos do congelamento e descongelamento sobre a viabilidade e morfologia de embriões equinos.* 1995. 102f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 1995.
- Lascombes FA, Pashen RL.** Results from embryo freezing and post-ovulation breeding in a commercial embryo transfer program. *In: International Symposium on Equine Embryo Transfer*, 5, 2000, Saari, Finland. *Proceedings...* Saari, Finland: ISEET, 2000. v.3, p.95-96.
- Legrand E, Bencharif D, Barrier-Battut I, Delajarraud H, Corniere P, Fieni F, Tainturier D, Bruyas JF.** Comparison of pregnancy rates for days 7-8 equine embryos frozen in glycerol with or without previous enzymatic treatment of their capsule. *Theriogenology*, v.58, p.721-723, 2002.
- Legrand E, Krawiecki JM, Tainturier D, Corniere P, Delajarraud H, Bruyas JF.** Does the embryonic capsule prevent the freezing of equine embryos? *In: International Symposium on Equine Embryo Transfer*, 5, 2000, Saari, Finland. *Proceedings...* Saari, Finland: ISEET, 2000. v.3, p.62-65.
- Linder GM, Anderson GB, Bon Durant RH, Cupps PT.** Survival of bovine embryos stored at 4°C. *Theriogenology*, v.20, p.311, 1983.
- MacLellan LJ, Bass LD, McCue PM, Squires EL.** Effect of cooling large and small equine embryos prior to cryopreservation on pregnancy rates after transfer. *Theriogenology*, v.59, p.306, 2003.
- MacLellan LJ, Carnevale EM, Coutinho Da Silva MA, McCue PM, Seidel Jr GE, Squires EL.** Cryopreservation of small and large equine embryos pre-treated with cytochalasin-B and/or trypsin. *Theriogenology*, v.58, p.717-720, 2002.
- McCue PM, Charles FS, Meira C, Edward LS.** Pregnancy rates for equine embryos cooled for 24h in Ham's F-10 versus EmCare™ embryo holding solution. *In: Equine Symposium and Annual Conference of Society of Theriogenology*, 2000, Denver, CO. *Proceedings...* Montgomery, AL: Soc. Theriogenol., 2000. p.147.
- McKinnon AO, Squires EL.** Morphologic assessment of the equine embryo. *J Am Vet Med Assoc*, v.192, p.401-406, 1988.
- Majumdar AC.** Embryo transfer in rabbit: assessment of viability of embryo using dye technique. *J Vet Physiol Allied Sci*, v.9, p.15-20, 1990.
- Meira C, Alvarenga MA.** Potros nascidos de embriões congelados no Brasil. *Ars Vet*, v.9, p.181-182, 1993.
- Meira C, Alvarenga MA, Papa FO, Oba E, Landom E, Landim-Alvarenga FC.** Cryopreservation of equine embryos using glycerol and 1,2-propanediol as cryoprotectants. *Equine Vet J Suppl*, n.15, p.64-66, 1993.
- Moussa M, Bersinger I, Doligez P, Guignot F, Duchamp G, Vidament M, Bruyas JF, Mermillod P.** Slow freezing vs open pulled straw (OPS) vitrification for equine embryo cryopreservation. *In: International Symposium on Equine Embryo Transfer*, 6, 2004, Rio de Janeiro. *Proceedings...* Rio de Janeiro: ISEET, 2004a. p.47-49.
- Moussa M, Bersing I, Doligez P, Guignot F, Duchamp G, Vidament M, Mermillod P, Bruyas JF.** *In vitro* comparisons of two cryopreservation techniques for equine embryos: slow-cooling and open pulled straw (OPS) vitrification. *Theriogenology*, v.64, p.1619-1632, 2005.
- Moussa M, Duchamp G, Mahla R, Bruyas JF, Daels PF.** Comparison of pregnancy rates for equine embryos cooled for 24 h in Ham's F-10 and EmCare holding solutions. *Theriogenology*, v.58, p.755-757, 2002.
- Moussa M, Duchamp G, Mahla R, Bruyas JF, Daels PF.** *In vitro* and *in vivo* comparison of Ham's F-10, EmCare holding solution and Vigro holding plus for the cooled storage of equine embryos. *Theriogenology*, v.59, p.1615-1625, 2003.
- Moussa M, Tremoleda JL, Duchamp G, Bruyas JF, Colenbrander B, Bevers MM, Daels PF.** Evaluation of viability and apoptosis in horse embryos stored under different conditions at 5°C. *Theriogenology*, v.61, p.921-932, 2004b.
- Munar CJ.** Criopreservação, tópicos atuais. *Rev Centro Ciênc Rurais UFSM*, v.18, p.17-19, 1988.
- Oberstein N, O'Donovan MK, Bruemmer JE, Seidel Jr GE, Carnevale EM, Squires EL.** Cryopreservation of equine embryos by open pulled straws, cryoloop, or conventional slow cooling methods. *Theriogenology*, v.55, p.607-613, 2001.
- Poitras P, Guay P, Vaillancourt D.** *In vitro* viability of cryopreserved equine embryos following different freezing protocols. *Can J Vet Res*, v.58, p.235-241, 1994.
- Rall WF, Fahy GM.** Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, v.313, p.573-575, 1985.
- Rosas CA, Peixer MA, Luna NM.** Uso do etilenoglicol na criopreservação de embriões equinos. *Arq Fac Vet UFRGS*, v.25, p.288, 1997. Resumo.
- Scherzer J, Fayrer-Hosken RA, Ray L, Hurley DJ, Heusner GL.** Advancements in large animal embryo transfer and related biotechnologies. *Reprod Domest Anim*, v.43, p.371-376, 2008.
- Seidel Jr GE.** Cryopreservation of equine embryos. *Vet Clin N Am Equine Pract*, v.12, p.85-101, 1996.
- Seidel Jr GE, Squires EL, McKinnon AO, Long PL.** Cryopreservation of equine embryos in 1,2-propanediol. *Equine Vet J Suppl*, n.8, p.87-88, 1989.
- Skidmore JA, Boyle MS, Allen WR.** A comparison of two different methods of freezing horse embryos. *J Reprod Fertil Suppl*, n.44, p.714-716, 1991.





- Slade NP, Takeda T, Squires EL, Elsden RP, Seidel Jr GE.** A new procedure for the cryopreservation of equine embryos. *Theriogenology*, v.24, p.45-58, 1985.
- Squires EL.** Perspectives on the use of biotechnology in equine reproduction. *Acta Sci Vet*, v.33, p.69-81, 2005.
- Squires EL, Carnevale EM, McCue PM, Bruemmer JE.** Embryo technologies in the horse. *Theriogenology*, v.59, p.151-170, 2003.
- Squires EL, McCue PM, Vanderwall DK.** The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology*, v.51, p.91-104, 1999.
- Squires EL, Seidel Jr GE, McKinnon AO.** Transfer of cryopreserved equine embryos to progestin-treated ovariectomised mares. *Equine Vet J Suppl*, n.8, p.9-19, 1989.
- Stout TA, Meadows S, Allen WR.** Stage-specific formation of the equine blastocyst capsule is instrumental to hatching to embryonic survival *in vivo*. *Anim Reprod Sci*, v.87, p.269-281, 2005.
- Takeda T, Elsden RP, Squires EL.** *In vitro* and *in vivo* development of frozen-thawed equine embryos. In: International Congress on Animal Reproduction and AI, 10, 1984, Urbana-Champaign. *Proceedings...* Urbana-Champaign: ICAR, 1984. v.2, p.246-247.
- Tharasanit T, Colenbrander B, Stout TA.** Effect of cryopreservation on the cellular integrity of equine embryos. *Reproduction*, v.129, p.789-798, 2005.
- Ulrich P, Nowshari MA.** Successful direct transfer of a frozen-thawed equine embryo. *Dtsch Tierarztl Wschr*, v.109, p.61-62, 2002.
- Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H.** Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev*, v.51, p.53-58, 1998.
- Wright FM, Diamond JM.** Patterns of nonelectrolyte permeability. *Proc R Soc Lond*, v.172, p.227-231, 1969.
- Yamamoto Y, Oguri N, Tsutsumi Y, Hachinohe Y.** Experiments in the freezing and storage of equine embryos. *J Reprod Fertil Suppl*, n.32, p.399-405, 1982.
- Young CA, Squires EL, Seidel GE.** Cryopreservation procedures for Day 7-8 equine embryos. *Equine Vet J Suppl*, n.25, p.98-102, 1997.
-