

# CONGELAMENTO ULTRA – RÁPIDO DE EMBRIÕES BOVINOS

## ULTRA-RAPID FREEZING OF BOVINE EMBRYOS

Alceu Mezzalira<sup>1</sup>; Arnaldo Diniz Vieira<sup>2</sup>; Luiz Fernando Assis da Silva<sup>3</sup>; Valter Yoshiharu Kajiyama<sup>3</sup>

### RESUMO

Com o objetivo de avaliar o método ultra-rápido no congelamento de embriões bovinos produzidos *in vivo*, oito vacas *Bos taurus* foram submetidas a coleta de embriões, sete dias após o estro subsequente ao tratamento superovulatório. Foram utilizados embriões no estágio de mórula compacta e blastocisto jovem, com qualidade um ou dois, de acordo com os critérios da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS). Após selecionados, vinte e sete embriões foram expostos a uma solução com 3,0M de glicerol e 0,25M de sacarose em meio de Dulbeccos (DPBSm) e envasados individualmente em palhetas de 0,25ml. Após 10 minutos, as palhetas foram acondicionadas sobre uma plataforma de isopor com 1,5cm de altura, mantida flutuando sobre o nitrogênio, com exposição ao vapor gelado por um minuto, antes de serem mergulhadas no líquido. Para o descongelamento, as palhetas foram expostas ao ar por cinco segundos, seguido da imersão em banho-maria a 35°C, por 20 segundos. A remoção do glicerol intracelular foi efetuada com um gradiente osmótico de 0,25M de sacarose em DPBSm durante 10 minutos, passando a seguir para o DPBSm onde completaram a rehidratação. Dos vinte e sete embriões congelados, vinte e seis foram transferidos, resultando em cinco receptoras prenhes (19,2%) e no nascimento de cinco animais normais e saudáveis. Conclui-se que o método de congelamento ultra-rápido permite a criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vivo*, entretanto com índices de prenhez inferiores aos obtidos com o método de congelamento convencional, indicando a necessidade de novas investigações para adequação do método para a espécie bovina.

**PALAVRAS-CHAVE:** criopreservação, ultra-rápido, transferência de embrião, *in vivo*, prenhez

### SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the ultra-rapid freezing of bovine embryos *in vivo* produced. Eight *Bos taurus* cows were submitted to embryo collection on

day seven after multiple ovulation estrous induction. Only embryos at the late morulae and early blastocyst stage, and classified as grade one or two, according International Embryo Transfer Society (IETS), were used. After selected, twenty-seven embryos were exposed to a solution with 3.0M of glycerol and 0.25M of sucrose in Dulbecco's medium (DPBSm), and individually loaded in 0.25ml straw. After 10 minutes, the straw was placed on a 1.5cm height styrofoam platform maintained floating in the liquid nitrogen. The straw was maintained in the cold vapor during one minute and then plunged in the liquid nitrogen. The warming was performed by five seconds air exposure, followed by the submersion in a 35°C water-bath during 20 seconds. The intracellular cryoprotectant removal was performed by the use of an osmotic 0.25M sucrose gradient, during 10 minutes, followed by DPBSm to complete the rehydration. The embryos were then loaded in 0.25ml straws and in ovulated in synchronous recipients, by transcervical method. Twenty-six of twenty-seven frozen embryos were transferred, resulting in five pregnant (19.2%) recipients, and born of five healthy and normal calves. We conclude that the ultra-rapid freezing method permits the cryopreservation of *in vivo* bovine embryos, however the pregnancy rates are still lower than that obtained with the conventional freezing method, indicating the need of new investigations to adequate the method for bovine embryos.

**KEY WORDS:** cryopreservation, ultra-rapid, embryo transfer, *in vivo*, pregnancy

### INTRODUÇÃO

Desde a descoberta do efeito crioprotetor do glicerol no congelamento de células (POLGE et al., 1949), muitos conhecimentos foram acumulados a respeito da criobiologia e principalmente da criopreservação de gametas e embriões. Na década de 70, WHITTINGHAM et al. (1972) relataram o nascimento do primeiro produto de embrião congelado, um camundongo. Já no ano seguinte, obteve-se o nascimento do primeiro bezerro oriundo de embrião congelado (WILMUT & ROWSON, 1973). Desde então, muitos dos mecanismos determinantes de danos

<sup>1</sup> Méd. Veterinário, Professor, Doutor em Reprodução Animal – Centro de Ciências Agroveterinárias. Autor para correspondência [mezzalira@cav.udesc.br](mailto:mezzalira@cav.udesc.br)

<sup>2</sup> Méd. Veterinário, Professor, Mestre em Reprodução Animal – Centro de Ciências Agroveterinárias

<sup>3</sup> Méd. Veterinários – autônomos

durante o congelamento, foram identificados e contornados.

Sendo a água o principal constituinte celular e a principal responsável pela manutenção dos sistemas vivos, as perturbações determinadas pelo congelamento vão ter um reflexo direto na sobrevivência destas células. A adequada desidratação celular é fundamental para evitar a formação de grandes cristais de gelo, que rompem as estruturas citoesqueléticas, bem como para prevenir a excessiva concentração de solutos intracelulares (MAZUR et al, 1972). Durante o processo de congelamento convencional, os embriões são expostos a soluções com concentração de 1,6 a 1,8M de glicerol, que mesmo antes do congelamento penetra na célula, substituindo parte da água intracelular, por efeito osmótico. Entretanto, ainda existe necessidade de aumentar a desidratação da célula, o que é obtido com o abaixamento controlado da temperatura da solução que contém o embrião, após a indução da cristalização. Inicialmente apenas a água extracelular é congelada, determinando o aumento do gradiente osmótico da solução, provocando a saída de água intracelular para o ambiente extracelular. A medida que a temperatura decresce, mais água é cristalizada e maior desidratação celular ocorre. Este processo é obtido mediante a utilização de aparelhos que permitam o controle da curva de resfriamento a uma velocidade de 0,3 a 0,5°C por minuto, até atingir uma temperatura de -30 a -35°C, no caso do congelamento rápido (convencional). Os índices de prenhez obtidos com essa metodologia são bastante satisfatórios, girando em torno de 50 a 60%. Entretanto, o custo de alguns equipamentos, bem como o próprio tempo consumido na realização da curva de resfriamento, tem limitado a expansão da criopreservação e da própria prática de transferência de embriões bovinos. Como forma de contornar estes fatores, métodos alternativos de congelamento tem sido propostos. A observação de que o uso de gradientes osmóticos podem acelerar a desidratação celular, ainda em temperatura ambiente, sugere a possibilidade de dispensar a curva controlada de resfriamento. TAKEDA et al. (1984) e TAKAHASHI & KANAGAWA (1985) desenvolveram uma metodologia que possibilita o congelamento direto de embriões murídeos, sem a necessidade do emprego de equipamentos sofisticados de congelação, o chamado método ultra-rápido. Com esta tecnologia, MEZZALIRA (1991) obteve entre 83,6 e 92,9% de blastocistos eclodidos após o congelamento de mórulas e blastocistos, e até 32% de fetos, após transferência cirúrgica para camundongas receptoras. Com embriões bovinos, os relatos de literatura são escassos, existindo a necessidade de estudos que avaliem esta tecnologia para a espécie. A crescente necessidade de facilitar o acesso a novas tecnologias, aliada ao grande poder de disseminação do material genético pela transferência de embriões, determinaram o interesse na adequação do método ultra-rápido para embriões bovinos, tanto por sua praticidade como por seu baixo custo de

execução. Estes fatos justificam a execução deste experimento, que tem por objetivo avaliar a taxa de prenhez após transferência de embriões bovinos congelados com o método ultra-rápido.

## MATERIAL E MÉTODOS

No período entre 1993 e 1994, oito vacas *Bos taurus*, com aptidão leiteira, foram submetidas a estimulação de múltiplas ovulações mediante aplicação de duas doses diárias de FSH (SUPER-OV®), durante quatro dias. O tratamento superovulatório foi iniciado entre os dias 08 e 12 após o cio base, com aplicação de FSH realizadas a cada 12 horas. Juntamente com a 6ª aplicação do FSH, foi aplicado um análogo da prostaglandina F2α (CIOSIN®) para lise do corpo lúteo, induzindo o cio em 24 a 48 horas (dia zero). As inseminações foram realizadas 12 e 24 horas após o final do cio, respectivamente. A coleta dos embriões foi realizada por via transcervical, no sétimo dia após o cio, com a utilização de sondas do tipo Foley nº18. Cada corno uterino foi lavado separadamente, com a utilização de 500ml do meio de Dulbeccos, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). O meio de lavagem recuperado foi armazenado em frascos de vidro siliconizados, nos quais foi feito o transporte até o laboratório. Após dez minutos de decantação, o sobrenadante foi removido por sifonagem, sendo o sedimento transferido para placas de Petri quadriculadas. A busca e seleção das estruturas foi realizada sob estereomicroscópio com 40 aumentos. Após serem encontrados, as estruturas foram transferidas para uma nova placa, contendo meio limpo, onde procedeu-se a seleção e classificação dos embriões, de acordo com os padrões da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), sendo utilizados apenas mórulas compactas e blastocistos iniciais, classificados como excelentes (grau I) ou bons (grau II). A seguir, os embriões foram expostos a uma solução crioprotetora composta por glicerol 3,0M e sacarose 0,25M em DPBSm, com a qual foram individualmente envasados, em palhetas de 0,25ml. Ao final de 10 minutos, as palhetas

foram acondicionadas sobre uma plataforma de isopor, vazada, com 1,5cm de altura, que foi mantida flutuando sobre o nitrogênio líquido, numa caixa de isopor medindo 35x29x23cm, permanecendo expostas ao vapor gelado por um minuto, antes de serem mergulhadas no líquido.

O armazenamento foi realizado em botijão criogênico, por período não inferior a uma semana. O descongelamento foi realizado mediante a exposição da palheta ao ar por cinco segundos, seguido da imersão em banho-maria a 35°C por 20 segundos. A seguir, procedeu-se a remoção do glicerol intracelular pela ação de um gradiente osmótico de 0,25M de sacarose em DPBSm durante 10 minutos, passando a seguir para o DPBSm, onde completaram a rehidratação. Todos os embriões, independente de sua qualidade após o descongelamento, foram utilizados, sendo envasados individualmente em palhetas de 0,25ml, para inovulação por via transcervical em receptoras síncronas. As receptoras foram previamente submetidas a exame ginecológico completo e selecionadas pela qualidade do corpo lúteo e sistema genital, sendo submetidas a anestesia epidural baixa com lidocaina a 2%, sem vasoconstrictor. O diagnóstico de gestação foi realizado por palpção retal, 60 dias após a transferência.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos vinte e sete embriões congelados, vinte e seis foram transferidos, sendo um perdido por rompimento da palheta no momento do descongelamento. Após o diagnóstico de gestação, cinco receptoras resultaram prenhes (19,2%), conforme está demonstrado na Tabela 01, parindo produtos normais e saudáveis.

**Tabela 01.** Resultados de prenhez obtidos após transferência de embriões bovinos congelados pelo método ultra-rápido

Coleta	Embriões Congelados	Embriões Transferidos	Prenhez
01	04	04	0
02	02	02	01

03	06	05	0
04	03	03	02
05	07	07	01
06	02	02	0
07	01	01	0
08	02	02	01
<b>TOTAIS</b>	<b>27</b>	<b>26</b>	<b>05</b>

Observou-se uma grande variabilidade de resultados nas diferentes coletas. Como exemplo, das doadoras de números 01 e 03, mesmo com o congelamento de um número expressivo de embriões (04 e 05, respectivamente), não se obteve gestação. O número relativamente pequeno de embriões congelados e a impossibilidade de manter um grupo controle com congelamento convencional, não permitem avaliar se a variação observada foi motivada pela metodologia proposta, ou por uma condição inerente às próprias doadoras.

Os dados encontrados na literatura internacional são escassos com embriões bovinos congelados com o método ultra-rápido, sendo constituídos apenas por avaliações *in vitro*. CHUPIN (1986), trabalhando com blastocistos iniciais produzidos *in vivo* e usando uma solução composta de 2,8M de glicerol e 0,25M de sacarose em DPBSm no congelamento, e 1,0 M de sacarose no descongelamento e remoção do glicerol, obteve 17,3% de eclosão, após congelamento ultra-rápido. Estes resultados, embora sendo de cultivo *in vitro*, são comparáveis aos 19,2% de prenhez obtidos neste experimento. No mesmo trabalho, CHUPIN (1986) obteve 56,4% de eclosão quando congelou blastocistos expandidos, com a mesma metodologia, demonstrando a influência do estágio de desenvolvimento, nas taxas de sobrevivência. Em trabalho subsequente, utilizando uma solução crioprotetora composta de 2,1M de glicerol e 0,25M de sacarose, CHUPIN (1987) observou uma grande variação na viabilidade de embriões submetidos a diferentes tempos de exposição e temperaturas da solução crioprotetora, obtendo 67,7%, 18,5% e 54,2% de eclosão após uma exposição por dois minutos e sete minutos à temperatura ambiente, ou sete

minutos à 37°C, respectivamente. MEZZALIRA (1991) e MEZZALIRA & RUBIN (1992), relatam resultados com até 92,9% de blastocistos eclodidos e 32% de fetos, após o congelamento de embriões de camundongos, demonstrando uma perfeita adequação para esta espécie. BERNARDI et al., (1991) obtiveram um bezerro nascido após transferência de embriões congelados com o método ultra-rápido, sendo este o primeiro relato de nascimento desta espécie com o método ultra-rápido. Assim, o presente estudo reveste-se de importância, demonstrando a possibilidade de obter o nascimento de animais vivos e perfeitos após o congelamento de embriões com o método ultra-rápido. Embora os resultados ainda não sejam comercialmente atrativos, demonstram que o método pode proporcionar uma eficiente crioproteção aos embriões, devendo-se buscar sua adequação aos diferentes estágios as diferentes características do embrião bovino.

Desta forma, é possível que novos estudos possibilitem um aumento da viabilidade embrionária, através da adequação da metodologia, permitindo a obtenção de índices de prenhez comercialmente atrativos e comparáveis aos obtidos com a metodologia de congelamento convencional, porém com a simplificação e redução de custos da técnica.

## CONCLUSÃO

Embriões bovinos produzidos *in vivo* podem ser criopreservados com o emprego de uma solução crioprotetora composta por 3,0M de glicerol e 0,25M de sacarose, usando o método de congelamento ultra-rápido.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERNARDI, M.L., RUBIN, M.I.B, COSTA, C.P.D., MEZZALIRA, A., SILVA, C. A.M. Congelamento ultra-rápido de embriões bovinos: Primeiro terneiro obtido no Brasil. In: REUNIÃO ANUAL DA SBTE, 6, 1991, Curitiba, **Anais...** Curitiba: Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 1991. p.51.

CHUPIN, D. Quick freezing of bovine blastocysts.

**Theriogenology**, v.25, n.1, p.147, 1986. Abstract.

CHUPIN, D. Quick freezing of day 7 bovine blastocysts: Optimum parameters of dehydration step. **Theriogenology**, v.27, n.1, p.219, 1987. Abstract.

Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. Editores David A. Stringfellow e Sarah M. Seidel, 3ed., 1999. 180p.

MAZUR, P.; LEIBO, S.P.; CHU, H.Y. A two-factor hypothesis of freezing injury. **Exp. Cell Res.**, n.71, p.345-355, 1972.

MEZZALIRA, A. **Congelamento ultra-rápido de mórulas *Mus musculus*: Efeito do pré tratamento e de diferentes concentrações de glicerol e lactose.** 1991. 74p. Dissertação(Mestrado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

MEZZALIRA, A. & RUBIN, M.I.B. Ultrarapid freezing and transfer of mouse morulae. **Theriogenology**, v.37, n.1, p.257, 1992. Abstract.

POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v.164, p.666, 1949.

TAKAHASHI, Y. & KANAGAWA, H. Quick freezing of mouse embryos by direct plunge into liquid nitrogen vapor: Effects of sugars. **Jpn. Vet. Res.**, n.33, p.141-144, 1985.

TAKEDA, T.; ELSDEN, P.; SEIKEL Jr, G. E. Cryopreservation of mouse embryos by direct plunging into liquid nitrogen. **Theriogenology**, n.21, v.1, p.266, 1984. Abstract.

WHITTINGHAM, D.G.; LEIBO, S.P.; MAZUR, P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -296°C. **Science**, n.178, p.411-414, 1972.

WILMUT, I. & ROWSON, L.E.A. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. **Vet. Rec.**, n.92, v.26, p.686-690, 1973