

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VETERINÁRIA



Uso de etilenoglicol monometiléter como crioprotetor na vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro*

ELISÂNGELA MIRAPALHETA MADEIRA

PELOTAS, 2015

Elisângela Mirapalheta Madeira

Uso de etilenoglicol monometiléter como crioprotetor na vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro*

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial a obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Thomaz Lucia Jr

Coorientador: Arnaldo Diniz Vieira

Coorientadora: Ligia M. CantareliPegoraro

PELOTAS, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M181u Madeira, Elisângela Mirapalheta

Uso de etilenoglicol monometil éter como crioprotetor na vitrificação de embriões bovinos produzidos in vitro / Elisângela Mirapalheta Madeira ; Thomaz Lucia Jr, orientador ; Ligia Cantarelli Pegoraro, coorientadora. — Pelotas, 2015.

57 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Crioprotetores. 2. Embriões bovinos. 3. Etilenoglicol monometil éter. 4. Vitrificação. I. Lucia Jr, Thomaz, orient. II. Pegoraro, Ligia Cantarelli, coorient. III. Título.

CDD : 636.08926

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

ELISÂNGELA MIRAPALHETA MADEIRA

Uso de etilenoglicol monometiléter como crioprotetor na vitrificação de embriões
bovinos produzidos *in vitro*.

Aprovada em 2015

APROVADA POR:

Prof. Dr. Thomaz Lucia Jr
Orientador e Presidente da Banca

Prof. Dr. Marcos Henrique Barreta
Membro da Banca

Prof. Dr. João Carlos Deschamps
Membro da Banca

Prof. Dr. Alfredo Antoniazzi
Membro da Banca

Dedicatória

Dedico o trabalho a todos... pesquisadores, professores e a todos da minha família e amigos que alguma forma puderam me auxiliar durante esta etapa de minha vida.

Muito Obrigada!

Agradecimentos

A Deus, pela vida e por tudo o que Ele tem me dado.

À minha família, em especial minha avó Felipa e à minha mãe, Iara, ao meu pai, Raimundo, a minha querida irmã, Eliziane e a meu amado Márcio, que me abriram as portas para este futuro estando sempre do meu lado. A vocês que contribuíram para construir a pessoa que me tornei, me apoiaram e tornaram tudo isso possível.

Ao meu orientador Thomaz Lucia Jr, pelos ensinamentos, pela confiança e apoio dedicados ao meu trabalho. E também pela construção de um pensamento científico, profissional e pessoal o qual vim buscar.

À minha co-orientadora e amiga Ligia M. C. Pegoraro, que tornou possível a realização desse trabalho. Obrigado pelo tempo e amizade dedicados, pelo exemplo de profissional e ensinamentos passados.

Aos professores Arnaldo Diniz Vieira e Bernardo G. Gasperin, pelo exemplo de pesquisador, pelas oportunidades que me foram apresentadas, pelas boas conversas e os momentos de reflexão.

Aos colegas do Laboratório REPROPEL – Reprodução Animal UFPEL, que compartilharam comigo bons e maus momentos, Karina L. Goularte, Elisa Caroline da S. Santos, Jorgea Pradice, Fabiana Moreira, Bruna Mion, Joao A. A. Rincón. Enfim, a todos vocês do REPROPEL e Lab. Reprodução Embrapa Clima Temperado, que fizeram do tempo que passamos juntos não só um tempo de aprendizado, mas também momentos de prazer e descontração.

Ao Frigorífico Famille, por ter aberto suas portas para que fosse possível a coleta dos ovários durante a realização dos experimentos.

A Bio® - Reprodução Animal por ter nos fornecido os meios para a continuidade dos experimentos.

Ao Programa de Pós-graduação, representado pela professora Márcia Nobre e Daiane, meu muito obrigado. Ao CNPq pela bolsa de apoio e a Embrapa Clima Temperado pela estrutura de laboratório.

A todas as pessoas que, apesar de não mencionadas, contribuíram com este trabalho e com minha formação de uma forma ou de outra.

MUITO OBRIGADA!

Epígrafe

São pequenos tijolos que compõem um grande muro...

Autor desconhecido

Resumo

Madeira, Elisângela Mirapalheta. **Uso de etilenoglicol monometiléter como crioprotetor na vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro***. 2015. Número de folhas 57. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Os protocolos de vitrificação para produção *in vitro* de embriões (PIV) bovinos ainda são limitados. Portanto o objetivo desta tese foi identificar um novo protocolo para vitrificação de embriões bovinos PIV. No primeiro estudo (E1), foram determinadas as características de toxicidade do etilenoglicol monometiléter (EGMME) na solução de vitrificação, com uma pré-exposição dos embriões em soluções contendo EGMME. No primeiro experimento do E1, as taxas de eclosão observadas para embriões expostos a soluções contendo EGMME em concentrações de 5, 10 e 15% durante 5 min a 39°C (30,5, 33,9 e 26,3%, respectivamente) foram semelhantes ($P>0,05$) à taxa observada para embriões não expostos ao EGMME (46,9%). No segundo experimento do E1, as taxas de eclosão de embriões não expostos a crioprotetores (33,4%) ou expostos ao EGMME a 10 ou 15% (32,9 e 25,1%, respectivamente) foram superiores ($P<0,05$) à observada para embriões expostos ao etilenoglicol (EG) a 20%, um crioprotetor comumente usado (17,0%). A expressão dos genes *Bcl-2* (inibidor de apoptose), *Bax* (promotor de apoptose) e *CCND2* (marcador de proliferação celular) não diferiu entre os grupos ($P>0,05$). No segundo estudo (E2), o EGMME foi testado em protocolos de vitrificação, em associação com o dimetilsulfóxido (DMSO), com avaliação das taxas de eclosão, da expressão gênica e da implantação dos embriões PIV em fêmeas bovinas previamente sincronizadas. No primeiro experimento do E2, embriões não expostos ao EGMME (controle) foram comparados com cinco tratamentos com exposição a soluções contendo: EG a 20% e DMSO a 20%; EGMME a 20% e DMSO a 15%; EGMME a 15% e DMSO a 15%; EGMME a 15% e DMSO a 20%; e EGMME a 10% DMSO a 20%. As taxas de eclosão não diferiram entre os tratamentos ($P>0,05$). No segundo experimento do E2, a taxa de eclosão de embriões não vitrificados (63,8%) foi superior ($P<0,05$) às taxas observadas para embriões vitrificados em soluções contendo EG a 20% e DMSO a 20% (T2) e EGMME a 20% e DMSO 20% (T3) (37,6% e 22,0% respectivamente). As taxas observadas em T2 e T3 foram similares ($P>0,05$), porém maiores que a taxa de 10,3% observada em T4 (EGMME a 15% e DMSO a 20%). A expressão dos genes *BAX* (promotor de apoptose) e *CCND2* (marcador de proliferação celular) foram semelhantes para todos os grupos ($P>0,05$), mas a expressão do gene *Bcl-2* (inibidor de apoptose) foi inferior no T4 ($P<0,05$), em comparação com os demais tratamentos. Trinta dias após a implantação dos embriões PIV em T2 e T3, as taxas de prenhez foram de 26,6% para ambos os grupos. Não foram implantados embriões PIV no T4. Esta tese concluiu que o EGMME pode ser usado como crioprotetor em protocolos de vitrificação de embriões bovinos PIV, pois não apresentou toxicidade nas concentrações avaliadas.

Palavras chaves: crioprotetores; etilenoglicolmonometiléter; vitrificação; embriões bovinos.

Abstract

Madeira, Elisângela Mirapalheta. **Use of ethylene glycol monomethyl ether as cryoprotectant in vitrification of bovine embryos produced *in vitro***. 2015. Número de folhas 57. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Vitrification protocols for *in vitro* production (IVP) of bovine embryos are limited. The objective of this thesis was to identify a novel protocols for vitrification of IVP bovine embryos. In the first study (S1), the toxicity characteristics of the Ethylene glycol monomethyl ether (EGMME) were determined after pre-exposure of embryos to solutions containing that cryoprotectant. In the first experiment of S1, hatching rates for embryos exposed to solutions including 5%, 10% and 15% EGMME for 5 min at 39 °C (30.5%, 33.9% and 26.3% respectively) were similar ($P < 0.05$) to those for unexposed embryos (46.9%). In the second experiment of S1, hatching rates for unexposed embryos (33.4%) and for embryos exposed to 10% EGMME (32.9%) and 15% EGMME (25.1%) were greater ($P < 0.05$) than the rate for embryos exposed to 20% ethylene glycol (EG), a commonly used cryoprotectant (17.0%). The expression of the Bcl-2 (inhibitor of apoptosis), Bax (apoptosis promoter) and CCND2 (cell proliferation marker) genes did not differ among the groups ($P > 0.05$). In the second study (S2), EGMME was tested in vitrification protocols, associated with Dimethyl sulfoxide (DMSO), with evaluation of hatching rates, gene expression and implantation vitrified of embryos in previously synchronized cows. In the first experiment of S2, embryos unexposed to EGMME were compared against five treatments with exposure to solutions containing: 20%EG and 20%DMSO; 20% EGMME and 15%DMSO; 15% EGMME and 15% DMSO; 15% EGMME and 20% DMSO; and 10%EGMME and 20% DMSO. Hatching rates were similar across all those treatments ($P > 0.05$). In the second experiment of S2, the hatching rate of non-vitrified embryos (63.8%) was greater ($P < 0.05$) than the rates observed for vitrified embryos conditioned in solutions containing 20% EG and 20% DMSO (T2) and 20% EGMME and 20% DMSO (T3) (37.6% and 22.0%, respectively). The rates of T2 and T3 were similar ($P > 0.05$), but were greater than the 10.3% rate observed for T4 (15% EGMME and 20% DMSO). The expression of the BAX (apoptosis promoter) and CCND2 (cell proliferation marker) genes were similar across treatments ($P > 0.05$). but the Bcl-2 gene (inhibitor of apoptosis) had lower expression in T4 than in the other treatments ($P < 0.05$). Thirty days after implantation of embryos from T2 and T3, pregnancy rates of previously synchronized cows were equal to 26.6% for both groups (no embryos from T4 were used). This thesis concluded that EGMME can be used as cryoprotectant in vitrification protocols for IVP of cattle embryos because no toxicity was observed at the tested concentrations.

Keywords: cryoprotectants; ethylene glycol monomethylether; vitrification, cattle embryos.

Lista de Figuras

Capítulo 1

Figura 1: Transcritos dos genes (BAX/HISTONA H2A), (Bcl2/HISTONA H2A), (CCND2/HISTONA H2A) e a relação entre a expressão dos genes BAX e Bcl2 em embriões bovinos vitrificados após exposição à diferentes concentrações dos crioprotetores etilenoglicol monometiléter (EGMME) e etilenoglicol (EG).

Capítulo 2

Figura 1 e 2: Transcritos dos genes (BAX/HISTONA H2A) e (CCND2/HISTONA H2A).

Figura 3 e 4: Transcritos dos genes (Bcl2/HISTONA H2A), e a relação entre a expressão dos genes (BAX e Bcl2) em amostras provenientes dos diferentes grupos.

Lista de Tabelas

Capítulo 1

Tabela1: Eclosão de embriões bovinos vitrificados após a exposição à diferentes concentrações do crioprotetor etilenoglicol monometiléter (EGMME) - Experimento 1.

Tabela 2: Eclosão de embriões bovinos vitrificados após exposição à diferentes concentrações dos crioprotetores etilenoglicol monometiléter (EGMME) e etilenoglicol (EG) - Experimento 2.

Capítulo 2

Tabela 1: Eclosão de embriões bovinos vitrificados após a exposição às diferentes concentrações dos crioprotetores etilenoglicol monometiléter (EGMME), etilenoglicol (EG) e DMSO - Experimento 1.

Tabela 2: Eclosão de embriões bovinos vitrificados após a exposição às diferentes concentrações dos crioprotetores etilenoglicol monometiléter (EGMME), etilenoglicol (EG) e DMSO - Experimento 2.

Lista de Abreviaturas

PIV = Produção *in vitro*

CIV = Cultivo *in vitro*

MIV = Maturação *in vitro*

FIV = Fertilização *in vitro*

EG= Etilenoglicol

EGMME = Etilenoglicol monometiléter

DMSO = Dimetilsulfóxido

PBS = Phosphate Buffered Saline

g = Grama

mm = milímetros

nm = nanômetros

ml = mililitro

µl = microlitro

mM = milimolar

M = molar

h = hora

min= minutes

°C = Graus celcius

% = Porcento

OPS = Open pulled straw

SFB = Soro fetal bovino

SM = Sucrose Medium – Meio de sacarose

TCM 199 = Tissue Culture Médium

CO₂ = Dióxido de Carbono

N₂ = Nitrogênio

O₂ = Oxigênio

RT-PCR = Reação em cadeia da polimerase (*Reverse transcription*)

DNA = Ácido desoxirribonucleico

mRNA = Ácido ribonucléico (mensageiro)

CCOs = Complexo *Cumulus*-oócitos

PVP= Polivinilpirrolidona

SOFaa = Fluido Sintético do oviduto com aminoácidos

AR = Solução de aquecimento e reidratação

SV1 = Solução de vitrificação 1 - equilíbrio

SV2 = Solução de vitrificação 2 - vitrificação

(OH) = Hidroxi

(OCH₃) = Metoxi

D0 = Dia 0 do protocolo

D2 = Dia 2 do protocolo

D7 = Dia 7 do protocolo

Sumário

1 Introdução geral.....	17
2 Revisão bibliográfica.....	19
2.1 Danos causados pela criopreservação.....	20
2.2 Princípios da vitrificação.....	21
2.3 Crioprotetores utilizados na vitrificação.....	22
2.4 Toxicidade dos crioprotetores.....	23
3 Capítulo 1.....	25
3.1 Introdução.....	26
3.2 Material e métodos.....	27
3.2.1 Produção <i>in vitro</i> dos embriões bovinos (<i>Bos taurus</i>).....	27
3.2.2 Adição, diluição e retirada dos crioprotetores de acordo com etapas experimentais.....	29
3.2.2.1 Experimento 1: <i>Teste de toxicidade do crioprotetor EGMME</i>	29
3.2.2.2 Experimento 2: <i>Teste de toxicidade do crioprotetor EGMME X EG</i>	29
3.2.2.3 Experimento 3: <i>Vitrificação dos embriões utilizando EGMME-DMSO e EG-DMSO</i>	30
3.2.3 Viabilidade embrionária após a exposição às soluções crioprotetoras ou re-aquecimento.....	30
3.2.3.1 Taxas de re-expansão e eclosão.....	30
3.2.3.2 Expressão Gênica.....	30
3.2.4 Análise estatística.....	31
3.3 Resultados.....	31
3.3.1 Experimento 1: <i>Teste de toxicidade do crioprotetor EGMME</i>	31
3.3.2 Experimento 2: <i>Teste de toxicidade do crioprotetor EGMME X EG</i>	32
3.2.2.3 Experimento 3: <i>Vitrificação dos embriões utilizando EGMME-DMSO e EG-DMSO</i>	33
3.4 Discussão.....	34
3.5 Conclusão.....	35
4 Capítulo 2.....	36
4.1 Introdução.....	37
4.2 Material e métodos.....	38
4.2.1 Produção <i>in vitro</i> dos embriões bovinos (<i>Bos taurus</i>).....	38
4.2.2 Viabilidade embrionária após a exposição às soluções crioprotetoras ou re-aquecimento.....	39
4.2.2.1 Taxas de re-expansão e eclosão.....	39
4.2.2.2 Expressão Gênica.....	40
4.2.2.3 Re-aquecimento e transferência dos embriões vitrificados com EGMME-DMSO X EG-DMSO.....	40
4.2.3 Distribuição dos embriões entre as etapas experimentais.....	41
4.2.3.1 Experimento 1: Teste de toxicidade da solução de vitrificação em diferentes concentrações de EGMME e EG associados ao DMSO.....	41
4.2.3.2 Experimento 2: Vitrificação dos embriões utilizando o crioprotetor EGMME-DMSO X EG-DMSO.....	42
4.2.4 Análise estatística.....	42
4.3 Resultados.....	42
4.3.1 Experimento 1.....	42
4.3.2 Experimento 2.....	43

4.4 Discussão.....	47
4.5 Conclusão.....	49
5 Considerações finais.....	49
6 Referências.....	50

1 Introdução geral

O desenvolvimento de estruturas privadas para prestação de serviços em reprodução assistida na bovinocultura contribuiu para o Brasil se tornar o líder na produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos, em nível internacional (Viana et al., 2012). Porém, uma parcela relevante de embriões PIV é desperdiçada pelas dificuldades no seu armazenamento, em especial devido à intolerância destes embriões ao resfriamento até temperaturas que correspondem à faixa termotrópica de transição dos lipídios, que é a fase na qual ocorre a maior fragilização e desestabilização das membranas celulares (Liu et al., 2012).

Em função disso, pesquisas vêm sendo direcionadas para identificar protocolos de criopreservação, através do processo de vitrificação. A vitrificação permite o resfriamento rápido dos embriões, que passam do estado líquido para estado vítreo (gel amorfo), sem a formação de cristais de gelo intra e extracelular (Kasai et al., 1996). Este fenômeno pode ser considerado como um aumento extremo da viscosidade combinado a uma rápida taxa de resfriamento, baseado na desidratação do embrião, através de uma breve exposição a soluções com altas concentrações de crioprotetores, seguida de imersão direta em nitrogênio líquido (Vajta, 2000). A eficiência destes protocolos está diretamente associada características termodinâmicas do crioprotetor usado na composição da solução de vitrificação. Os crioprotetores mais usados em protocolos de vitrificação seguem a seguinte ordem de utilização preferencial: propilenoglicol > dimetilsulfóxido > dimetilformamida > etilenoglicol > glicerol (Baudot et al., 2000).

No entanto, em comparação com o congelamento lento, a vitrificação pode causar danos à viabilidade embrionária pós-descongelamento. Estes danos podem ser causados a partir da simples exposição do embrião ao crioprotetor (Rajaei et al., 2005), muitas vezes comprometendo a integridades do seu DNA (Kader et al., 2009). Diferentes crioprotetores causam graus diferentes de dano ao DNA dos embriões: o propanediol seria mais lesivo para o DNA do que o glicerol (Kader et al., 2009); e o etilenoglicol (EG) associado ao DMSO produziria menos danos, quando comparado ao congelamento lento com glicerol (Li et al., 2012). Estes dados enfatizam que a escolha do crioprotetor para protocolos de vitrificação deve considerar não só as taxas de sobrevivência embrionária, mas também a integridade de DNA dos embriões após o descongelamento. Entretanto, poucos

estudos compararam o grau de dano proporcionado pelo contato com o crioprotetor, em comparação com os danos provocados pelo processo de vitrificação.

Ainda que o etilenoglicol monometiléter (EGMME) já tenha se mostrado eficiente no congelamento de embriões, na concentração de 5% (Takagi et al., 1993), ainda não existem dados conclusivos a respeito da sua potencial eficiência na composição de soluções para uso em protocolos de vitrificação. A determinação da concentração adequada de EGMME para compor uma solução de vitrificação para embriões bovinos PIV deve assegurar que não ocorra comprometimento da capacidade de desenvolvimento destes embriões, os quais devem manter a integridade do seu DNA e sua capacidade de expressão de genes associados à viabilidade embrionária.

Para avaliar a adaptação dos embriões às diferentes condições de cultivo, é necessário quantificar a expressão de genes relacionados ao metabolismo, ao estresse e à morte celular, pelos embriões submetidos aos processos de vitrificação e reaquecimento. Em geral, estes embriões apresentam maior expressão de genes relacionados a apoptose, tais como: *FAS ligand*; *caspase3*; e *heat shock protein 70* (Park et al., 2006). Por outro lado, estes embriões apresentariam menor expressão de mRNA dos genes *HSPA1A*, *SLC2A1* e *TJP1*, envolvidos no reparo de proteínas danificadas durante a criopreservação, no metabolismo da glicose e na diferenciação dos blastômeros, respectivamente (Stinshoff et al., 2011).

Com base nestas informações, o presente estudo está baseado na hipótese de que o uso do EGMME como crioprotetor em soluções usadas na vitrificação permitirá crioproteção mais eficiente para embriões bovinos PIV.

Portanto o objetivo principal deste trabalho foi determinar a capacidade crioprotetora da solução de vitrificação composta por EGMME e DMSO. E ainda os objetivos específicos são:

- Determinar os níveis de toxicidade do EGMME como componente da solução crioprotetora;
- Determinar a taxa de sobrevivência dos embriões criopreservados em solução de vitrificação composta pelo EGMME e DMSO;
- Determinar os níveis de expressão dos genes relacionados a sobrevivência dos embriões bovinos PIV vitrificados.

2 Revisão bibliográfica

Um dos princípios mais importantes da criopreservação é a remoção do máximo possível de água das células, ainda que a remoção demasiada de água das células também pode ser deletéria (Vajta, 2006). A água é o principal solvente biológico responsável pelo transporte de nutrientes e substâncias químicas, apresentando ponto de congelamento a 0°C. Se a desidratação da célula a ser congelada não ocorrer, cristais de gelo serão formados, os quais poderão lesar severamente as estruturas celulares (Vajta, 2006). Ainda, íons ou outras substâncias em dissolução também serão congelados, dependendo da sua concentração (Fahy, 1986). A formação dos cristais de gelo é diretamente proporcional ao volume e inversamente proporcional à viscosidade da solução e à taxa de resfriamento (Liebermann et al., 2002).

Normalmente, os embriões são expostos a crioprotetores permeáveis, por isso encolhem, ou retraem, perdendo água até atingirem um ponto de equilíbrio. Quando exposto a um crioprotetor de baixo peso molecular, permeável à sua membrana, um embrião geralmente se retrai, em função da saída da água do seu interior (Baudot et al., 2000). Como a concentração total de solutos dentro e fora da célula deve estar sempre em equilíbrio, o processo de desidratação celular também provoca um aumento da pressão osmótica na célula, pois com a saída da água da célula, o meio extracelular se torna hiperosmótico e a concentração interna de soluto aumenta (Baudot et al., 2000). Como o embrião é mais permeável à água do que ao crioprotetor, a retração celular continua, até que o efluxo da água seja equilibrado com o influxo da solução crioprotetora (Fahy, 1986). Conforme os aditivos penetram as membranas do embrião, este gradualmente re-expande porque ocorre entrada de água para manter o equilíbrio osmótico (Fahning; Garcia, 1992). Este cessa quando a concentração de soluto torna-se grande o bastante para prevenir futuras transformações de água em gelo (Storey & Storey, 1990). Desta forma, para que uma substância seja um crioprotetor eficiente, deve atuar na elevação da osmolaridade intracelular, para controlar a desidratação, contribuindo para estabilizar as membranas celulares (Meryman, 1974).

O resfriamento pode causar injúria celular pela exposição prolongada numa solução extremamente concentrada, causando o dano denominado “efeito da

solução”, e ainda pode causar injúria celular pela formação de gelo intracelular. Embriões resfriados apropriadamente devem também ser aquecidos numa taxa ótima, para evitar danos causados pelo choque osmótico ou recristalização do gelo durante o processo de aquecimento (Hochi et al., 2001).

O intervalo de tempo em que ocorre o retorno ao volume inicial atingindo o equilíbrio osmótico está relacionado a espécie animal do embrião, estágio de desenvolvimento, relação superfície/volume do embrião, características intrínsecas do crioprotetor, temperatura em que o embrião é exposto. De acordo com Leibo (1996), Rall (1987), esses aspectos relativos à permeabilidade de membrana explicariam em parte, as diferenças observadas entre os vários crioprotetores, quanto à eficiência.

2.1 Danos causados pela criopreservação

Os danos celulares decorrentes da formação de cristais de gelo intracelulares e da concentração alterada de soluto seriam consequência da pressão diferencial de vapor entre o gelo e a água, em temperaturas abaixo de 0°C, que poderia levar à injúrias por desidratação, durante o congelamento lento, ou à ruptura das membranas celulares, durante o congelamento rápido (Pickett, 1986). Como resultado, independentemente do grau de desidratação, os embriões não sobrevivem a resfriamentos abaixo de -20°C, a menos que se utilize um crioprotetor (Szell & Shelton, 1986). Se a redução do volume celular atingir um mínimo crítico, a bicamada de fosfolípidos da membrana celular fica muito comprimida e sua estrutura se rompe. Estas rupturas abrem portas de entrada para a passagem do gelo extracelular para o interior da célula (Storey & Storey, 1990), prejudicando também as funções de transporte e proteção da membrana.

Os crioprotetores podem também diminuir os efeitos das altas concentrações osmóticas durante a desidratação celular. Muitas moléculas se dissolvem na mistura de crioprotetor e água, tornando-se menos lesivas do que quando estão dissolvidas em altas concentrações em um líquido na ausência do crioprotetor (Fahy, 1986). Pesquisas têm mostrado que um dos fatores que afetam a competência do desenvolvimento de ovócitos bovinos congelados é o tipo de crioprotetor utilizado. Devido à sua alta permeabilidade e baixa toxicidade, o EG tem se mostrado o mais conveniente para a vitrificação de ovócitos humanos, bovinos e ratos (Li et al.,

2012). O DMSO causa separação dos fusos dos microtúbulos e movimentação do material pericentriolar para o centro do ovócito (Cetin & Bastan, 2006). Apesar dos efeitos benéficos dos crioprotetores, não existe uma técnica de criopreservação celular que permita 100% de sobrevivência após o congelamento e o descongelamento, mesmo com o uso de curvas de resfriamento e de aquecimento consideradas ótimas.

2.2 Princípios da vitrificação

A vitrificação tem como objetivo manter o metabolismo celular em estado de quiescência, tornando possível a conservação de células e tecidos por tempo indeterminado. Diversas metodologias foram utilizadas na criopreservação de embriões ovinos (Naitana et al., 1997; Martinez et al., 2002) e bovinos (Vajta et al., 1998), sendo hoje, uma alternativa em potencial para a técnica de congelamento tradicional. A vitrificação é um processo rápido, prático e menos oneroso que a congelamento tradicional (Baril et al., 2001). A principal vantagem da vitrificação é a redução no tempo de exposição dos embriões a temperaturas críticas, pois este processo ocorre em uma velocidade muito rápida, de -10^7 °C/s (Vajta, 2006).

Na vitrificação, a exposição dos embriões à altas concentrações de crioprotetores aumenta a viscosidade dos meios intra e extracelulares. Neste processo, a diminuição da temperatura é tão rápida, que não permite o re-arranjo atômico, havendo uma diminuição contínua do volume do material, que passa do estado líquido para um estado com grande viscosidade, conhecido como líquido super-resfriado ou líquido-metaestável. Esta viscosidade aumenta até que o material adquira o comportamento de um sólido, porém mantendo as características estruturais do líquido. Esse ponto é conhecido como temperatura de transição vítrea (Baudot et al., 2000).

Diversas técnicas de vitrificação vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de evitar crioinjúrias, a partir do aumento das taxas de resfriamento e aquecimento, permitindo o uso de uma menor concentração de crioprotetores e diminuindo o tempo de exposição da célula ao crioprotetor (Rall, 1987). A utilização de menores volumes de solução de vitrificação permite um resfriamento mais rápido e a redução de fraturas celulares (Arav et al., 2002). Entretanto, quase todas as técnicas são baseadas no contato direto das células em meio crioprotetor com o nitrogênio

líquido, podem apresentar um risco de contaminação por agentes bacterianos e virais (Foutain et al.,1997, Rios et al 2010). Estes riscos podem ser eliminados utilizando nitrogênio líquido esterilizado (UV), além do armazenamento em containers hermeticamente fechados (Vajta et al.,1998, Rios et al., 2010). Segundo Dattena et al., (2004) nenhum problema de contaminação de embriões vitrificados foi observado, através da técnica de palhetas abertas estendidas (OPS - *open pulled straws*) em nitrogênio líquido não esterilizado. O aquecimento das OPS é realizado pela colocação da ponta mais fina diretamente na placa contendo meio a 37°C. O meio vitrificado volta ao estado líquido dentro de 1 a 2 segundos, sendo que imediatamente após, o embrião flutua no meio de diluição (Vajta et al.,1998). Os meios de aquecimento contêm sacarose em diferentes concentrações, sendo a diluição realizada em um, dois ou três passos. No entanto, Datenna et al.(2004) testaram diluições sem sacarose e obtiveram os mesmos resultados obtidos com a diluição em meio com sacarose.

2.3 Crioprotetores utilizados na vitrificação

Os crioprotetores têm como função proteger as células e tecidos durante a criopreservação e o reaquecimento. Os crioprotetores podem ser classificados como internos, intracelulares ou penetrantes (McGann, 1978), quando se permeabilizam para o interior da célula, o que inclui substâncias como: DMSO; propanodiol; glicerol; e EG, entre outros. Substâncias crioprotetoras também são classificadas como externas, extracelulares ou não penetrantes, incluindo macromoléculas e açúcares que tem como funções reduzir a formação de gelo, facilitar a desidratação das células e proteger a membrana celular. Como crioprotetores externos podem ser citados: polímeros (PVC); sacarose polivinilpirrolidona (PVP); manitol; trealose. O mecanismo de ação dessas substâncias baseia-se na diminuição do ponto de solidificação da solução de congelação, prolongando o tempo necessário para que ocorra desidratação da célula e diminuindo a formação de cristais de gelo intracelulares (Meryman et al.,1977; McGann, 1978; Niemann, 1991).

Crioprotetores ainda interagem com a membrana celular, exercendo ação estabilizadora durante as mudanças do estado relativamente líquido, para o estado sólido (Fahy. 1986). Este mecanismo também ocorre quando a célula retorna ao estado líquido durante o descongelamento ou re-aquecimento.

Agentes crioprotetores eficientes são caracterizados por possuírem baixo peso molecular, o que favorece sua permeabilidade através das membranas celulares, e baixa toxicidade (Kasai et al., 1996). Em geral, agentes com rápida capacidade de penetração são desejáveis, porque o tempo de exposição ao crioprotetor antes do resfriamento rápido é curto, o que reduz a possibilidade de injúrias osmóticas (Kasai et al., 1996). O uso de crioprotetores extracelulares permite a redução na concentração dos crioprotetores intracelulares, diminuindo o potencial de toxicidade.

O EG é o crioprotetor mais utilizado em protocolos de criopreservação nas espécies domésticas, devido ao seu baixo peso molecular e sua baixa toxicidade (Ali & Shelton, 1993; Martinez & Matkovic, 1998). Porém, o EG promove vitrificação somente quando usado em alta concentração (8,0 M), tornando-se tóxico para o embrião. Dessa forma, melhorias em protocolos de vitrificação passam pelo estudo de associação entre diferentes crioprotetores (Rall & Fahy, 1985; Kasai et al., 1996; Palasz & Mapletoft, 1996; Vajta, 2000; Dobrinsky, 2002), ou pela investigação da eficiência de novos crioprotetores. Dentre as possibilidades de crioprotetores alternativos, pode ser considerado o EGMME, testado anteriormente no congelamento lento de embriões (Tagashi et al., 1993).

2.4 Toxicidade dos crioprotetores

Um dos motivos associados a falhas na ação dos crioprotetores seria a sua potencial toxicidade, que limita a concentração em que este pode ser utilizado, reduzindo a sua eficácia (Fahy, 1986). Alguns agentes crioprotetores podem ter ação direta na produção de crioinjúrias, como por exemplo, alterando a polaridade do meio extracelular lesando as membranas (Arnold et al., 1983). Quanto maior o volume do ovócito ou do embrião, maior deve ser o tempo necessário para que ocorra equilíbrio osmótico na presença dos crioprotetores.

As altas concentrações de crioprotetores podem causar danos às células devido a sua toxicidade química. Porém, os efeitos da toxicidade podem ser minimizados através da exposição rápida aos crioprotetores ou através de rápidas taxas de resfriamento (Vajta et al., 1998). As rápidas taxas de resfriamento podem diminuir as injúrias celulares através da passagem direta pela zona crítica de resfriamento entre +15°C e -5°C (Martino et al., 1996).

O procedimento de retirada do crioprotetor é necessário para que ocorra a re-hidratação dos embriões e diminua danos causados pela sua toxicidade. Este fenômeno pode ser assegurado pela adição de altas concentrações de compostos extracelulares, como a sacarose e a trealose ao meio de diluição ou re-hidratação (Schneider & Mazur, 1984). A sacarose atua como um tampão osmótico, mantendo constante a concentração do meio extracelular, regulando a velocidade de entrada e saída do crioprotetor no embrião, evitando o choque osmótico (Leibo, 1984).

A criopreservação normalmente causa aumento significativo nas taxas de degeneração de ovócitos e de embriões bovinos. As células se degeneram pelos mecanismos de apoptose ou de necrose (Men et al., 2003). O processo apoptótico também pode ser ativado em resposta à uma grande variedade de estímulos não fisiológicos, como temperatura, agentes tóxicos, estresse oxidativo e radiação. As características morfológicas das células apoptóticas são a marginalização da cromatina e a formação de corpos apoptóticos. É muito importante que se elucide o mecanismo envolvido na degeneração dos embriões após a exposição aos crioprotetores e a criopreservação.

3 CAPÍTULO 1

Avaliação da toxicidade do etilenoglicol monometiléter em soluções de vitrificação para embriões bovinos produzidos *in vitro*

3.1 Introdução

Um dos maiores obstáculos enfrentados para a disseminação da tecnologia de produção *in vitro* de embriões (PIV) é a baixa tolerância dos embriões produzidos por esta técnica à criopreservação (Crosier et al., 2001; Seidel, 2006). Esta sensibilidade é atribuída a diferenças morfológicas existentes nos embriões PIV (Pivko, 2004) principalmente quanto à quantidade de lipídios intracelulares, mais presentes nestes embriões devido às condições de cultivo *in vitro* (Abe et al., 2002).

As principais alternativas identificadas foram: exposição sob temperaturas reduzidas, associação de crioprotetores permeáveis, modificação dos suportes de acondicionamento dos embriões, visando aumentar a velocidade de resfriamento; e o uso de proteínas anti-congelantes e inibidores da nucleação do gelo (Wowk et al., 1999).

Entretanto, pouca atenção foi dada às características termodinâmicas e químicas dos crioprotetores. Já foi identificado que os crioprotetores com maior capacidade de indução do estado vítreo possuem pontes de hidrogênio características, que influenciam na sua ligação com a água, o que permite identificar outros compostos químicos que também apresentem essa capacidade (Rall & Fahy, 1985). A substituição de um grupo hidroxil (OH) por um metoxi (OCH₃) na molécula

do EG, composto muito usados na criopreservação de embriões em função de sua toxicidade relativamente baixa, originou o etilenoglicol monometiléter (EGMME) (Takagiet al., 1993; Wowk et al., 1999).

O EGMME possui peso molecular um pouco maior que o etilenoglicol, o que limitaria sua velocidade de permeação. O incremento na capacidade de vitrificação do EGMME é equivalente a um acréscimo de 5% na inclusão de crioprotetor na solução de vitrificação (Wowk et al., 1999), possivelmente devido a capacidade de interação molecular com a água e compostos polares e apolares (Dhondge et al., 2009).

Estudos avaliando potenciais crioprotetores devem iniciar pela avaliação da toxicidade, o que pode ser feito através da exposição dos embriões a diferentes concentrações e posterior avaliação da viabilidade. Além da taxa de desenvolvimento e eclosão, a avaliação da expressão de genes marcadores de viabilidade ou morte celular pode ser utilizada para detectar alterações em nível molecular que não necessariamente causem a perda da viabilidade (Park et al., 2006). Dentre os genes marcadores de viabilidade celular podemos citar o *Bcl-2*, inibidor de apoptose e a ciclina D2 (*CCND2*) envolvida na proliferação celular. Por outro lado, os genes *Bax* e *caspase3* estão relacionados à morte celular. Portanto o objetivo do presente estudo foi avaliar a toxicidade do EGMME na composição de um meio para vitrificação de embriões PIV, mediante as taxas de desenvolvimento embrionário *in vitro* posterior à exposição e vitrificação e avaliação da expressão gênica.

3.2 Material e Métodos

As placas de 4 poços utilizadas em todos os experimentos foram da marca Nunc® (Roskild, Denmark). Os produtos químicos quando utilizados foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, E.U.A). Os meios e o soro fetal foram adquiridos através da Bio® – Biotecnologia Animal (Brasília-DF, Brasil).

3.2.1 Produção *in vitro* dos embriões bovinos (*Bos taurus*)

Como fonte de complexos cumulus ovócitos (CCOs) foram utilizados ovários bovinos coletados no abatedouro (*Famille*®). Os ovários foram transportados até o laboratório em garrafa térmica a temperatura de 24-35°C, por no máximo 3 horas contendo solução salina adicionada de antibiótico *gentamicina*. No laboratório

os ovários foram lavados com solução salina. Os folículos (3 a 8mm de diâmetro) foram puncionados com *scalp* 19G conectado a um tubo cônico de 15 ml ligado a um sistema de vácuo com pressão de aspiração de 10 ml/min. O material recuperado permaneceu em repouso por cinco minutos até a coleta do sedimento que foi depositado em placa de *Petri* para busca dos CCOs sob estereomicroscópio equipado com mesa térmica. Os CCOs selecionados com grau 1 e 2 (De Loos et al., 1989) e foram lavados em TCM-hepes [TCM 199 + 10% de SFB] antes de serem transferidos para placa de maturação. A maturação *in vitro* (MIV) foi realizada em placas Nunc 4 poços, em 400µl de meio comercial (Bio[®]) acrescido de 10% de SFB. As placas contendo os CCOs foram acondicionadas em estufa a 39°C com atmosfera de 5% de CO₂ em ar sob máxima umidade durante 22-24 horas de incubação. Ao final do período de MIV os CCOs foram transferidos para placa de fecundação *in vitro* (FIV) contendo 400µl de meio (Parrish et al., 1988). Para FIV foi utilizado sêmen congelado de um touro reconhecidamente eficiente na produção *in vitro* de embriões. A cada rotina foi descongelada uma palheta de sêmen para seleção dos espermatozoides pelo sistema mini-Percoll (800µl volume final, por 5 min. á 800 G), (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden), sistema de gradiente descontínuo descrito por Parrish et al., (1986) com modificações. Após a seleção, foi realizada a inseminação (dia zero, D0) utilizando uma dose inseminante de $1,0 \times 10^6$ espermatozoides/mL por 18 a 22 h sob as mesmas condições da MIV. Ao final do período de FIV os prováveis zigotos foram mecanicamente liberados das células do *cumulus oophorus* mediante repetidas pipetagens e transferidos para os poços da placa cultivo contendo 200µl de SOFaa (Holm et al., 1994) suplementado com 5% de SFB e mantido sob óleo mineral. A clivagem foi avaliada após 24 horas dia 2, D2 de incubação sob as mesmas condições das etapas anteriores. Em seguida, foram colocados 1,0mL de água no espaço entre os poços das placas, que foram acondicionadas em sacos plásticos impermeáveis a gases que foram selados e insuflados com 5% de CO₂, 5% de O₂, 90% de N₂ (Vajta et al., 1997). As embalagens com as placas foram então mantidas na estufa a 39°C por mais 144 horas de incubação dia sete, D7, quando foram coletados os embriões para uso nos tratamentos experimentais. Para a exposição à soluções crioprotetoras foram selecionados blastocistos de grau 1 e 2 (excelente e bons, respectivamente) de acordo com a avaliação morfológica (Asgari et al., 2012).

3.2.2 Adição, diluição e retirada dos crioprotetores de acordo com etapas experimentais

3.2.2.1 Experimento 1: *Teste de toxicidade do crioprotetor EGMME*

O objetivo do presente estudo foi avaliar a toxicidade do EGMME independente, para isso os embriões obtidos em D7, após a seleção morfológica (Lindner & Wright, 1983), foram distribuídos entre os seguintes tratamentos: Controle sem crioprotetor (T1); 5% EGMME (T2); 10% EGMME (T3) e 15% EGMME (T4). O teste foi realizado segundo Sommerfeld & Niemann (1999), mantendo os embriões expostos aos tratamentos durante 5 min a 39°C. Após, foi realizada a remoção dos crioprotetores mediante banhos sequenciais de 5 min em solução de aquecimento e reidratação (AR) compostas por gradientes decrescentes de sacarose (0,4 - 0,26 e 0,16 M em TCM-hepes). Após a passagem na última gota de 200 µl de TCM-hepes estes foram transferidos para as placas de CIV para cultivo suplementar de 24 horas, e então era observada a taxa de sobrevivência, avaliada através da capacidade do embrião evoluir de estágio.

3.2.2.2 Experimento 2: *Teste de toxicidade do crioprotetor EGMME X EG*

Para esta etapa experimental, o objetivo foi comparar a toxicidade do EGMME em relação ao EG. A partir do coorte de embriões obtidos em D7 foi realizada a seleção morfológica (Lindner & Wright, 1983) e distribuição homogênea dos embriões nos estágios de blastocisto e blastocisto expandido classificados como graus 1 e 2 entre os tratamentos de exposição ou não às diferentes concentrações de crioprotetores. O teste foi composto de quatro grupos: Controle sem crioprotetor (T1); 10% EGMME (T2); 15% EGMME (T3) e 20% EG (T4). O teste foi realizado de acordo com Sommerfeld & Niemann (1999), mantendo os embriões expostos aos tratamentos durante 5 min a 39°C. Para a remoção dos crioprotetores foram realizados banhos sequenciais de 5 min em solução de aquecimento e reidratação (AR) compostas por gradientes decrescentes de sacarose (0,4 - 0,26 e 0,16 M em TCM-hepes). Após estarem acondicionados em TCM-hepes os embriões foram transferidos para as placas de CIV para cultivo suplementar de 24 h para determinação da taxa de sobrevivência que foi avaliada através da capacidade do embrião evoluir de estágio.

3.2.2.3 Experimento 3: *Vitrificação dos embriões utilizando EGMME-DMSO e EG-DMSO*

Esta etapa experimental foi para verificar a capacidade vitrificante do EGMME. Os embriões foram homogeneamente distribuídos para constituição de três grupos: controle sem crioprotetor (T1); exposição à solução de vitrificação (SV1 e SV2) composta por 20%EG+20%DMSO (T2) preconizada por Vajta et al. (1997) e 15%EGMME + 20%DMSO. A metodologia de vitrificação prevê uma fase de estabilização (SV1) em uma solução de equilíbrio (SE = 50% da concentração SV2) com tempo de exposição durante 1,0 min antes da exposição à (SV2) por 25 segundos, sendo armazenados no máximo 5 embriões por GMP, que foram artesanalmente confeccionadas a partir de tubos capilares de vidro, utilizados para determinação do hematócrito (Perfecta®, BRASIL), segundo Vieira et al. (2007) e então eram submersos em N₂ (Vajta et al., 1997). Após o período de exposição, os embriões foram banhados em solução AR sacarose, antes de passarem para a placa de CIV, para cultivo suplementar e posterior avaliação da taxa de desenvolvimento em 24h.

3.2.3 Viabilidade embrionária após a exposição às soluções crioprotetoras ou re-aquecimento:

3.2.3.1 Taxas de re-expansão e eclosão

Após a exposição ou re-aquecimento os embriões foram alocados em placas de CIV para cultivo subsequente por 24 e 48h. Decorridas 24h, metade dos embriões de cada grupo foi coletada para análise de expressão gênica, enquanto que os demais permaneceram em CIV para monitoramento da re-expansão e eclosão. Esta avaliação se deu em iguais condições do CIV inicial, sendo nesta etapa observadas as taxas de evolução dos embriões submetidos aos tratamentos.

3.2.3.2 Expressão Gênica

Extração RNA e Análise qRT-PCR:

Os embriões utilizados para expressão gênica foram provenientes de 4 replicações de cada experimento analisado. Estes embriões foram armazenados em 20µl de água milliQ autoclavada e acondicionados em N₂ para posterior análise. A extração do mRNA se deu através do mini trizol (200 µl) de acordo com as

instruções do fabricante e foi quantificado através da absorbância de 260 nm. Previamente à transcrição reversa, 200ng de RNA total de cada amostra foi tratado com 0,2 U de DNase (Invitrogen®) a 37 °C por 5 min para digestão de DNA contaminante, sendo a enzima inativada após aquecimento a 65°C por 3 min. Posteriormente, foi realizada a reação de transcrição reversa (RT) utilizando o kit comercial iScript (BioRad), conforme as instruções do fabricante. A reação de PCR em tempo real foi realizada no equipamento (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando o Platinum SYBR Greenq PCR Master Mix (Applied Biosystems), utilizando iniciadores específicos. As etapas da reação foram 3 min. A 93°C, 40 ciclos de 15 seg. a 95°C, 30 seg. a 60°C e 30 seg. a 72°C. As curvas de *melting* foram avaliadas para assegurar a amplificação de apenas um *amplicon*. Todas as amostras foram rodadas em duplicata e foi utilizada como *housekeeping* o gene da Histona H2A. A quantificação dos genes expressos foi utilizando o método ddCT (Livak et al., 2001). As sequencias de iniciadores utilizados foram: H2A F- GAGGAGCTGAACAAGCTGTTG e R-TTGTGGTGGCTCTCAGTCTTC; CCND2 F- TGCCCCAGTGCTCCTACTTC e R-CGGGTACATGGCAAACCTTGA; Bax F- TTCTGACGGCAACTTCAACT e R- CGAAGGAAGTCCAATGTCCA e Bcl2 F- CATCGTGGCCTTCTTTGAGT e R- CATGCTAGGGCCATACAGC.

3.2.4 Análise estatística

As amostras do Experimento 1 do Estudo 1 foram analisadas pelo método de qui-quadrado. As amostras dos demais experimentos foram analisadas no software Statistix® através análise de variância e do teste de Tukey, sendo que todos os dados foram analisados através do teste Shapiro Wilk para verificar a normalidade.

3.3 Resultados

3.3.1 Experimento 1: *Teste de toxicidade do crioprotetor EGMME*

Foram utilizados 1395 ovócitos, com uma taxa de clivagem de 76,6% e 22,5% em D7. Sendo utilizados 240 embriões coletados em D7 (Blastocistos/blastocistos expandidos; de 5 repetições expostos ao EGMME nas concentrações de 0 (controle), 5, 10 ou 15% (v/v) durante 5 min. As taxas de eclosão não diferiram entre embriões expostos a diferentes concentrações de EGMME e embriões controle ($P > 0,05$; Tabela 1).

Tabela 1: Eclosão de embriões bovinos após exposição à diferentes concentrações do crioprotetor etilenoglicol monometiléter (EGMME) - Experimento 1*.

Tratamento	Nº Embriões	Eclosão (%)
Controle	125	46.8
T1 (5%EGMME)	131	30.5
T2 (10% EGMME)	135	33.9
T3 (15% EGMME)	129	26.2

*n = 1.395 ovócitos: taxa de clivagem = 76,6%; taxa de desenvolvimento até blastocisto (D7) = 22,5%; 48 embriões, 5 repetições; média de 12 embriões por tratamento/repetição (P > 0.05).

3.3.2 Experimento 2: *Teste de toxicidade do crioprotetor EGMME X EG*

Foram utilizadas doze repetições de PIV, totalizando 704 embriões (média de 176 por tratamento), sendo estes oriundos de 4141 ovócitos, com 70,05% de clivagem e 20,65% de desenvolvimento em D7. Como pode ser observada na Tabela 2, a taxa de eclosão de embriões não expostos aos crioprotetores (controle; 33,4%) ou expostos a 10 ou 15% de EGMME (32,9 e 25,1%, respectivamente) foram superiores em comparação a embriões expostos à concentração de 20% de Etilenoglicol (EG) comumente utilizada na vitrificação (17%; P<0,05).

Tabela 2: Média de eclosão dos embriões após a exposição às diferentes concentrações dos crioprotetores.

Tratamento	Nº Embriões	Eclosão (%)
Controle	176	33,4 ^a
T1 (10%EGMME)	173	32,9 ^a
T2 (15% EGMME)	179	25,0 ^{ab}
T3 (20% EG)	176	17,0 ^b

P < 0.05.

Apesar da diferença observada na taxa de eclosão, a expressão dos genes BAX, Bcl2 não diferiu entre os diferentes grupos ($p>0,05$; Figuras 1 e 2 respectivamente), porém na expressão do gene CCND2 verificou-se uma diferença no tratamento T1 (10% de EGMME). Também não foi observada diferença estatística na relação BAX/Bcl2 entre os diferentes grupos ($p>0,05$; Figura 1).

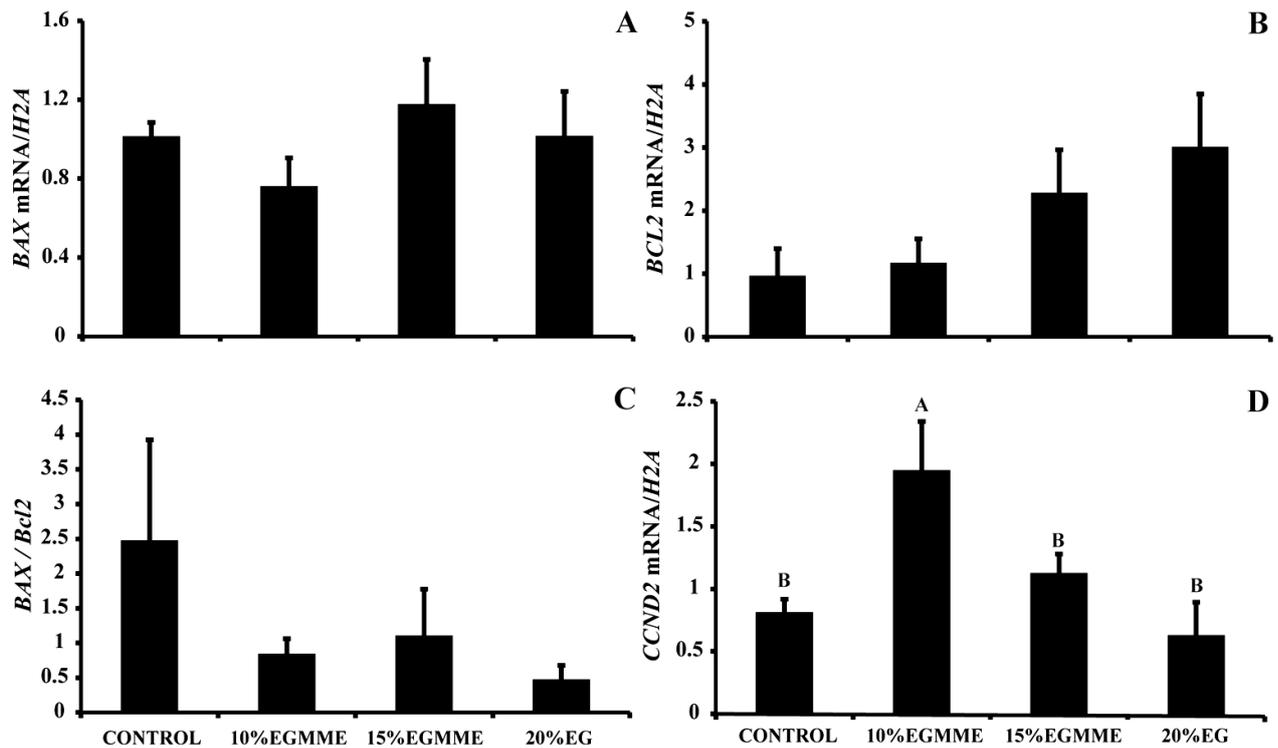


Figura 1: Transcritos dos genes (BAX/HISTONA H2A), (Bcl2/HISTONA H2A), (CCND2/HISTONA H2A) e a relação entre a expressão dos genes BAX e Bcl2 em amostras provenientes dos diferentes grupos.

3.3.3 Experimento 3: *Vitrificação dos embriões utilizando EGMME ou EG associados ao DMSO*

Foram utilizados 70 embriões provenientes de duas repetições. Sendo neste terceiro momento, vitrificados os embriões para verificar a atividade vítrea do EGMME, onde não observamos diferença entre as médias, após o aquecimento, os blastocistos foram cultivados por 24 horas, sendo que a taxa de eclosão (14/28) 50% e (6/15) 40%, sendo o controle sem exposição (23/27) 85%.

3.4 Discussão

A identificação de crioprotetores com menor toxicidade permitiria um maior aproveitamento de embriões excedentes nos sistemas de PIV. Com a utilização do EGMME em soluções para criopreservação de embriões bovinos, foi possível evidenciar que a simples exposição ao crioprotetor EG na concentração de 20%, crioprotetor muito utilizado em protocolos de criopreservação, é suficiente para diminuir a viabilidade dos embriões. Essa diminuição na viabilidade pode ser atribuída a ação tóxica dos crioprotetores, que se dá basicamente pelo estresse osmótico e químico, (Vajta et al., 1996), resultando na diminuição na taxa de eclosão. Não foram observadas diferenças significativas na taxa de eclosão após a exposição dos embriões ao EGMME em concentração de até 15% como pode ser observado na (tabela 1 e 2). Cabe ressaltar que não foi testada a concentração de 20%, já que um estudo anterior demonstrou que o EGMME poderia ser utilizado em concentrações inferiores com base em um estudo prévio no qual foi demonstrado que o EGMME poderia ser utilizado em concentrações inferiores (Wowk et al., 1999). Até o presente momento, o EGMME somente havia sido testado em concentrações baixas para o congelamento lento de embriões bovinos produzidos *in vitro* (Takagi et al., 1993), possibilitando resultados satisfatórios. É bem estabelecido que quanto mais altas forem as concentrações de crioprotetores, maior é o dano causado ao embrião (Saragusty & Arav, 2011).

Embora as taxas de eclosão observadas do presente estudo estejam de acordo com esta afirmação, não foram observadas diferenças na expressão gênica dos embriões expostos aos diferentes tratamentos como pode ser observada na figura 1. A análise da expressão gênica embrionária pela técnica de RT-PCR vem sendo muito aplicada, e permitindo identificar respostas em nível molecular e quais fatores ou vias de sinalização estariam envolvidos nos efeitos observados (Lim et al., 2007). Além disso, podem ser detectadas alterações que não necessariamente causem a morte celular, mas que podem levar à prejuízos futuros ao indivíduo. Ainda neste estudo, foram avaliados genes envolvidos na indução da apoptose (*Bax*), e na inibição da apoptose (*Bcl2*) e um marcador de proliferação celular (*CCND2*), os quais são eventos críticos durante o desenvolvimento embrionário. A relação entre a expressão de *Bax* e *Bcl2* também foi avaliada uma vez que as proteínas codificadas por estes genes interagem na regulação da morte por

apoptose sendo que a *Bcl2* liga-se a *Bax* para bloquear a cascata apoptótica (Brahmasani et al., 2012). Curiosamente, foi observado um aumento significativo na expressão do gene *CCND2* no grupo exposto ao EGMME na concentração de 10%. Embora não haja uma explicação plausível para este aumento, o que se esperava era uma diminuição da expressão de *CCND2* no grupo com menor taxa de eclosão, o que não foi observado.

Uma vez que os resultados obtidos nos dois primeiros experimentos demonstraram uma baixa toxicidade do EGMME, tornou-se necessário comparar diferentes associações de crioprotetores. As soluções de vitrificação normalmente envolvem mais de um crioprotetor e a interação entre diferentes moléculas podem levar a uma alteração na toxicidade em comparação a exposição aos crioprotetores isoladamente. Para verificar a viabilidade de utilização do EGMME como crioprotetor, um pequeno grupo de embriões foi vitrificado utilizando 20%EGMME associado a 20%DMSO e a solução de referência 20%EG e 20%DMSO. Após o aquecimento, os blastocistos foram cultivados por 24 horas, com taxas de eclosão de 50% (14/28) e 40% (6/15), sendo que a taxa do tratamento controle sem exposição foi de 85% (23/27). Estes resultados foram semelhantes aos encontrados em um estudo conduzido por (Vajta et al., 1996).

As características fundamentais para um eficiente agente crioprotetor é o baixo peso molecular, a sua alta capacidade de atravessar a membrana celular e uma baixa toxicidade (Kasai et al.,1996) o que pode ser confirmado durante a utilização do EGMME pois sua atividade crioprotetora foi satisfatória. Porém, novos estudos ainda são necessários para definir a concentração mais apropriada do EGMME, bem como suas associações com outros crioprotetores que permitam melhor viabilidade embrionária. Além disso, experimentos *in vivo* envolvendo a inovulação de embriões criopreservados possibilitarão identificar se soluções crioprotetoras contendo EGMME permitem taxas satisfatórias de sobrevivência embrionária e de prenhez. Os dados deste estudo nos permitem concluir que o EGMME não apresenta toxicidade nas concentrações avaliadas.

3.5 Conclusão

Conclui-se que o EGMME não apresenta toxicidade nas concentrações avaliadas, sugerindo novos estudos com a utilização deste produto.

4. CAPÍTULO 2

**Vitrificação de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* utilizando uma nova
combinação de crioprotetores (EGMME e DMSO)**

4.1 Introdução

O processo convencionalmente utilizado no congelamento de embriões obtidos *in vivo*, não é adequado para embriões PIV, pois estes possuem um menor número de blastômeros e acúmulo de lipídios em sua ultraestrutura (Saragusty & Arav, 2011). Em função disso, pesquisas vêm sendo direcionadas para identificar protocolos de criopreservação através do processo de vitrificação (Vajta, 1997). Entretanto, pouca atenção foi dada às características termodinâmicas e químicas dos crioprotetores. Já foi identificado que os crioprotetores com maior capacidade de indução do estado vítreo possuem pontes de hidrogênio características, que influenciam na sua ligação com a água, o que permitiu identificar outros compostos que também apresentem essa capacidade (Rall & Fahy, 1985). A substituição de um grupo hidroxil (OH) por um metoxi (OCH₃) na molécula do etilenoglicol (EG), composto muito usado na criopreservação de embriões em função de sua toxicidade relativamente baixa, originou o EGMME (Takagi et al., 1993; Wowk et al., 1999). Ainda que o EGMME possua peso molecular um pouco maior do que o do etileno glicol, o que limitaria sua velocidade de permeação, o incremento na capacidade de vitrificação do EGMME é equivalente a um acréscimo de 5% na inclusão de crioprotetor na solução de vitrificação (Wowk et al., 1999),

possivelmente devido a capacidade de interação molecular com a água e compostos polares e apolares (Dhondge et al., 2009). Considerando suas características físico-químicas, é possível que o EGMME permita melhor crioproteção aos embriões. O objetivo do presente estudo foi testar o EGMME na vitrificação de embriões PIV, através da avaliação das taxas de desenvolvimento embrionário, da expressão gênica e da obtenção de prenhez após a transferência dos embriões vitrificados.

4.2 Material e Métodos

As placas utilizadas em todos os experimentos foram da marca Nunc® (Roskild, Denmark). Os produtos químicos quando utilizados foram obtidos da SigmaChemicalCo. (St. Louis, MO, USA). Os meios e o soro fetal bovino foram adquiridos através da Bio® – Biotecnologia Animal (Brasilia-DF, Brasil).

4.2.1 Produção *in vitro* dos embriões Bovinos (*Bos taurus*)

Como fonte de complexos cumulus ovócitos (CCOs) foram utilizados ovários bovinos coletados no abatedouro. Os ovários foram transportados até o laboratório em garrafa térmica a temperatura de 24-35°C contendo solução salina adicionada de antibiótico gentamicina. No laboratório os ovários foram lavados com solução salina. Os folículos (3 a 8mm de diâmetro) foram puncionados com *scalp* 19G conectado a um tubo cônico de 15mL ligado a um sistema de vácuo com pressão de aspiração de 10mL/min. O material recuperado permaneceu em repouso por cinco minutos até a coleta do sedimento que foi depositado em placa de *Petri* para busca dos CCOs sob estereomicroscópio equipado com mesa térmica.

Os CCOs selecionados com grau 1 e 2 (De Loos et al., 1989) e foram lavados em TCM-hepes [TCM 199 + 10% de SFB] antes de serem transferidos para placa de maturação. A maturação *in vitro* (MIV) foi realizada em placas de multi-poços em 400µl de meio comercial acrescido de 10% de SFB. As placas contendo os CCOs foram acondicionadas em estufa a 39°C com atmosfera de 5% de CO₂ em ar sob máxima umidade durante 22-24 horas de incubação. Ao final do período de MIV os CCOs foram transferidos para placa de fecundação *in vitro* (FIV) contendo 400µl de meio (Parrish et al., 1988).

Para FIV foi utilizado sêmen congelado de um touro reconhecidamente eficiente na produção *in vitro* de embriões. A cada rotina foi descongelada uma palheta de sêmen para seleção dos espermatozoides pelo sistema mini-Percoll (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden), sistema de gradiente descontínuo descrito por Parrish et al., (1986) com modificações. Após a seleção, foi realizada a inseminação (dia zero, D0) utilizando uma dose inseminante de $1,0 \times 10^6$ espermatozoides/mL por 18 a 22 horas sob as mesmas condições da MIV. Ao final do período de FIV os prováveis zigotos foram mecanicamente liberados das células do *cumulus oophorus* mediante repetidas pipetagens e transferidos para os poços da placa cultivo contendo 200µl de SOFaa (Holm et al., 1994) suplementado com 5% de SFB e mantido sob óleo mineral. A clivagem foi avaliada após 24 horas (dia 2, D2) de incubação sob as mesmas condições das etapas anteriores. Em seguida, foram colocados 1,0mL de água no espaço entre os poços das placas, que foram acondicionadas em sacos plásticos impermeáveis a gases que foram selados e insuflados com 5% de CO₂, 5% de O₂, 90% de N₂ (Vajta et al., 1997).

As embalagens com as placas foram então mantidas na estufa a 39°C por mais 144 horas de incubação (dia sete, D7), quando foram coletados os embriões para uso nos tratamentos experimentais. Para a exposição às soluções crioprotetoras foram selecionados blastocistos de grau 1 e 2 (excelente e bons, respectivamente) de acordo com a avaliação morfológica (Asgari et al., 2012).

4.2.2 Viabilidade embrionária após a exposição às soluções crioprotetoras ou re-aquecimento:

4.2.2.1 Taxas de re-expansão e eclosão

Após a exposição ou re-aquecimento os embriões foram alocados em placas de CIV para cultivo subsequente por 24 e 48h. Decorridas 24h, metade dos embriões de cada grupo foi coletada para análise de expressão gênica, enquanto que os demais permaneceram em CIV para monitoramento da re-expansão e eclosão. Esta avaliação se deu em iguais condições do CIV inicial, sendo nesta etapa observadas as taxas de evolução dos embriões submetidos aos tratamentos.

4.2.2.2 Expressão Gênica

Extração RNA e Análise qRT-PCR:

Os embriões utilizados para expressão gênica foram provenientes de 4 replicações de cada experimento analisado. Estes embriões foram armazenados em 20µl de água milliQ autoclavada e acondicionados em N₂ para posterior análise. A extração do mRNA se deu através do mini trizol (200 µl) de acordo com as instruções do fabricante e foi quantificado através da absorbância de 260 nm. Previamente à transcrição reversa, 200ng de RNA total de cada amostra foi tratado com 0,2 U de DNase (Invitrogen®) a 37 °C por 5 min para digestão de DNA contaminante, sendo a enzima inativada após aquecimento a 65°C por 3 min. Posteriormente, foi realizada a reação de transcrição reversa (RT) utilizando o kit comercial iScript (BioRad), conforme as instruções do fabricante. A reação de PCR em tempo real foi realizada no equipamento (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando o Platinum SYBR Greenq PCR Master Mix (Applied Biosystems), utilizando iniciadores específicos. As etapas da reação foram 3 min. a 93°C, 40 ciclos de 15 seg. a 95°C, 30 seg. a 60°C e 30 seg. a 72°C. As curvas de *melting* foram avaliadas para assegurar a amplificação de apenas um *amplicon*. Todas as amostras foram rodadas em duplicata e foi utilizada como *housekeeping* o gene da Histona H2A. A quantificação dos genes expressos foi utilizando o método ddCT (Livak et al., 2001). As sequências de iniciadores utilizados foram: H2A F-GAGGAGCTGAACAAGCTGTTG e R-TTGTGGTGGCTCTCAGTCTTC; CCND2 F-TGCCCCAGTGCTCCTACTTC e R-CGGGTACATGGCAAACCTTGA; Bax F-TTCTGACGGCAACTTCAACT e R- CGAAGGAAGTCCAATGTCCA e Bcl2 F-CATCGTGGCCTTCTTTGAGT e R- CATGCTAGGGCCATACAGC.

4.2.2.3 Re-aquecimento e transferência dos embriões vitrificados com EGMME-DMSO X EG-DMSO

Re-aquecimento:

Após o procedimento de vitrificação, armazenamento e análises tanto de eclosão como de expressão gênica, apenas os embriões dos grupos T1 (CV, vitrificado 20% EG + 20% DMSO) e T2 (20% EGMME + 20%DMSO), foram re-hidratados em solução de sacarose, mediante banhos sequenciais de 5 min em solução de aquecimento e reidratação (AR) compostas por gradientes decrescentes (0,4 - 0,26 e 0,16M em TCM-hepes-sacarose). Após estarem acondicionados em

TCM-hepes os embriões foram transferidos para as placas de CIV para cultivo suplementar de 6 horas, neste momento foram escolhidos os embriões que tiveram capacidade de se retrair e reorganizar seus blastômeros.

Transferência dos embriões:

Foram utilizadas para esta etapa 50 vacas cruza Hereford em estado de condição corporal de 3 a 3,5 em escala de (1-5), que se encontravam em pastagem de trevo e azevém, e foram submetidas ao protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) que consistia em implante de progesterona, benzoato de estradiol e prostaglandina F2-alfa (todos os produtos adquiridos de Hertape Callier®), no dia 0 foi colocado o implante e aplicado 2ml de benzoato de estradiol, no dia 8 foi retirado o implante e aplicado 1 ml de benzoato e 2ml de prostaglandina em todos os animais, no dia 17 foram avaliados os ovários de cada vaca sendo aproveitadas apenas as que apresentavam corpo lúteo. O diagnóstico de gestação foi realizado após 30 dias, através de ultrassonografia.

4.2.3 Distribuição dos embriões entre as etapas experimentais:

4.2.3.1 Experimento 1: *Teste de toxicidade da solução de vitrificação em diferentes concentrações de EGMME e EG associados ao DMSO*

O objetivo deste experimento foi verificar se interação do EGMME com o DMSO é tóxica aos embriões. Os embriões foram homogeneamente distribuídos para constituição de seis grupos. Um grupo controle sem crioprotetor (T1); um grupo controle de exposição à solução de vitrificação (SV1 e SV2) composta por 20% de Etileno glicol (EG) + 20% de Dimetil Sulfóxido (DMSO) (T2) preconizada por Vajta et al. (1997) e quatro grupos com diferentes concentrações de EGMME associado a DMSO (15% ou 20%) sendo: (T3) 20% EGMME + 15% DMSO; (T4) 15% EGMME + 15% DMSO; (T5) 15% EGMME + 20% DMSO e (T6) 10% EGMME + 20% DMSO. Nesta etapa, o teste de toxicidade foi realizado de acordo com a metodologia de vitrificação que prevê uma fase de estabilização (SV1) em uma solução de equilíbrio (SE = 50% da concentração SV) durante 1,0 min antes da exposição à (SV2) por 25 s (Vajta *et al.*, 1997). Após o período de exposição às soluções, os embriões foram banhados em solução AR, antes de passarem a placa de CIV, para cultivo suplementar e posterior avaliação da taxa de desenvolvimento em 24h.

4.2.3.2 Experimento 2 -Vitrificação dos embriões utilizando o crioprotetor EGMME-DMSO X EG-DMSO

Os embriões bovinos PIV selecionados foram homogeneamente divididos em três grupos: controle não vitrificado (CN), controle vitrificado T1 (CV, vitrificado 20% EG + 20% DMSO) e vitrificados T2 20% EGMME + 20%DMSO e T3 15% EGMME + 20%DMSO. Em cada tratamento, os embriões foram inicialmente expostos a uma solução de equilíbrio (SE) durante 1 min antes do contato com a solução de vitrificação e envase em micropipetas de vidro (MPV) (Vieira *et al.*, 2007) para imersão em nitrogênio líquido após 25 s de exposição. Ao final dos procedimentos de vitrificação dos embriões de todos os grupos foram re-hidratados em solução de sacarose, mediante banhos sequenciais de 5 min em solução de aquecimento e reidratação (AR) compostas por gradientes decrescentes de sacarose (0,4 - 0,26 e 0,16M em TCM-hepes). Após estarem acondicionados em TCM-hepes os embriões foram transferidos para as placas de CIV para cultivo suplementar de 24 horas para determinação da taxa de sobrevivência avaliada pela capacidade de evoluir em estágios de desenvolvimento.

4.2.4 Análise estatística

Nos experimento 1 e 2, as taxas de eclosão foram comparadas pelo teste de qui-quadrado. Nos experimento 2, para as demais variáveis, após verificação da normalidade através do teste Shapiro-Wilk, as comparações foram feitas análise de variância e comparações entre médias pelo teste de Tukey. Todas as análises foram conduzidas com o software Statistix®.

4.3 Resultados

4.3.1 Experimento 1: Teste de toxicidade da solução de vitrificação em diferentes concentrações de EGMME e EG associados ao DMSO – Taxa de eclosão.

Foram utilizados 3027 ovócitos, em 6 repetições o que originaram um total de 678 embriões (113 por tratamento), com uma média de 18,9 por

tratamento/repetição. Não foi observada diferença estatística $p>0.05$ na taxa de eclosão dos embriões após a exposição aos crioprotetores (Tabela 1).

Tabela 1: Eclosão de embriões bovinos após a exposição de 5 minutos às diferentes concentrações de crioprotetores etilenoglicol monometiléter (EGMME), etilenoglicol (EG) e dimetilsulfóxido (DMSO) – Experimento 1*

Tratamento	Nº de embriões	Eclosão (%)
Controle sem crioprotetor	115	34,1
EG (20%) + DMSO (20%)	112	34,1
EGMME (20%) + DMSO (15%)	114	35,7
EGMME (15%) + DMSO (15%)	111	29,0
EGMME (15%) + DMSO (20%)	113	30,3
EGMME (10%) + DMSO (20%)	116	24,4

*n = 3.027 ovócitos, em 6 repetições: 678 embriões; 113 por tratamento; com média de 18.9 por tratamento/repetição ($P>0.05$)

4.3.2 Experimento 2: Vitriificação dos embriões utilizando o crioprotetor EGMME-DMSO X EG-DMSO – Taxas de eclosão, desenvolvimento, expressão gênica e implantação gestacional.

O processo de fertilização *in vitro* obteve uma taxa de 86,24% de clivagem e 23.54% de desenvolvimento embrionário em D7. Totalizando 405 embriões utilizados, sendo realizadas 6 repetições. Em média foram utilizados 22,5 embriões por tratamento/repetição. A variável utilizada foi à taxa de eclosão dos embriões nas 24 h após a vitriificação com os crioprotetores, foram obtidas as médias de eclosão apresentadas na tabela 2 por tratamento. As médias correspondem, a um grupo controle onde não ocorreu a exposição aos crioprotetores e que não foram

vitrificados, demonstrando a viabilidade dos embriões produzidos, e os demais tratamentos, sendo então: controle T1 não apresentou diferença do tratamento T2 o qual continha EGMME. A taxa de eclosão dos embriões não vitrificados (controle) T1 (63.78%) foi diferente estatisticamente ($p < 0.05$) dos vitrificados, seja, com 20% EG e 20%DMSO – T2, ou 20% EGMME e 20% DMSO – T3 com médias de (37.57% e 22.02% respectivamente), porém T2 e T3 não foram diferentes e ainda foram diferentes ($p < 0.05$) do tratamento 15% EGMME e 20% DMSO –T4 (10.30%).

Tabela 2. Média de eclosão após o processo de vitrificação nos diferentes tratamentos. Foram utilizados 2417 ovócitos oriundos de 410 ovários.

Tratamento	Nº de embriões	Eclosão (%)
Controle sem crioprotetor	120	63.7 ^a
T1 20% EG + 20%DMSO	100	37.5 ^b
T2 20% EGMME + 20%DMSO	94	22.0 ^{bc}
T3 15% EGMME + 20%DMSO	91	10.3 ^c

*n = 2.417 ovócitos: taxa de clivagem = 86,2%; taxa de desenvolvimento até o estágio de blastocisto (D7) = 23.5%; 405 embriões em 6 repetições; média de 22,5 embriões por tratamento/repetição (taxas diferem por $P < 0.05$).

A expressão dos genes *BAX* (promotor de apoptose) e *CCND2* (marcador de proliferação celular) não diferiu entre os grupos ($p > 0,05$), porém a expressão do gene *Bcl-2* (inibidor de apoptose) e sua relação com *BAX* foi diferente estatisticamente quando verificamos nas figuras 2 e 4.

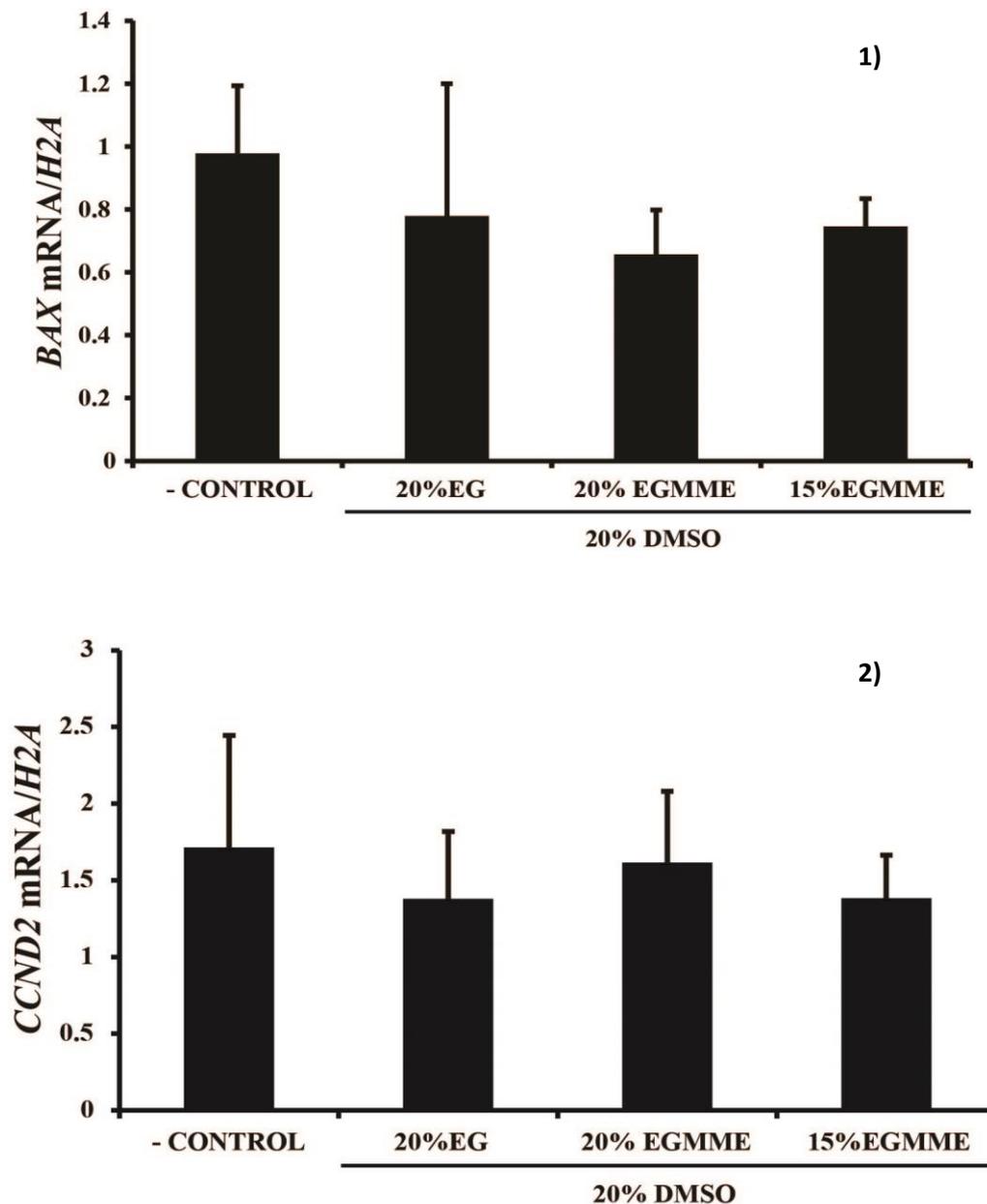


Figura 1 e 2: Transcritos dos genes (BAX/HISTONA H2A) e (CCND2/HISTONA H2A).

Para o re-aquecimento e transferência foram utilizados apenas os tratamentos T2 e T3 os quais tiveram boas taxas de eclosão e que não mostraram qualquer diferença em relação ao controle na expressão gênica. Foram reaquecidos 59 embriões, sendo que os do T3 não tiveram boa retração durante o período de 6 h em estufa de CO₂, por isso não foram implantados, sendo levados a campo apenas 15 embriões de cada tratamento. As taxas de prenhez não foram diferentes aos 30 dias, sendo 26.6% para ambos os tratamentos (T2 e T3). Aos 60 dias, foram

reavaliadas as vacas gestantes com o auxílio de ultrassom, verificando-se que permaneceram prenhes apenas 20.0% no T2 e 6% no T3.

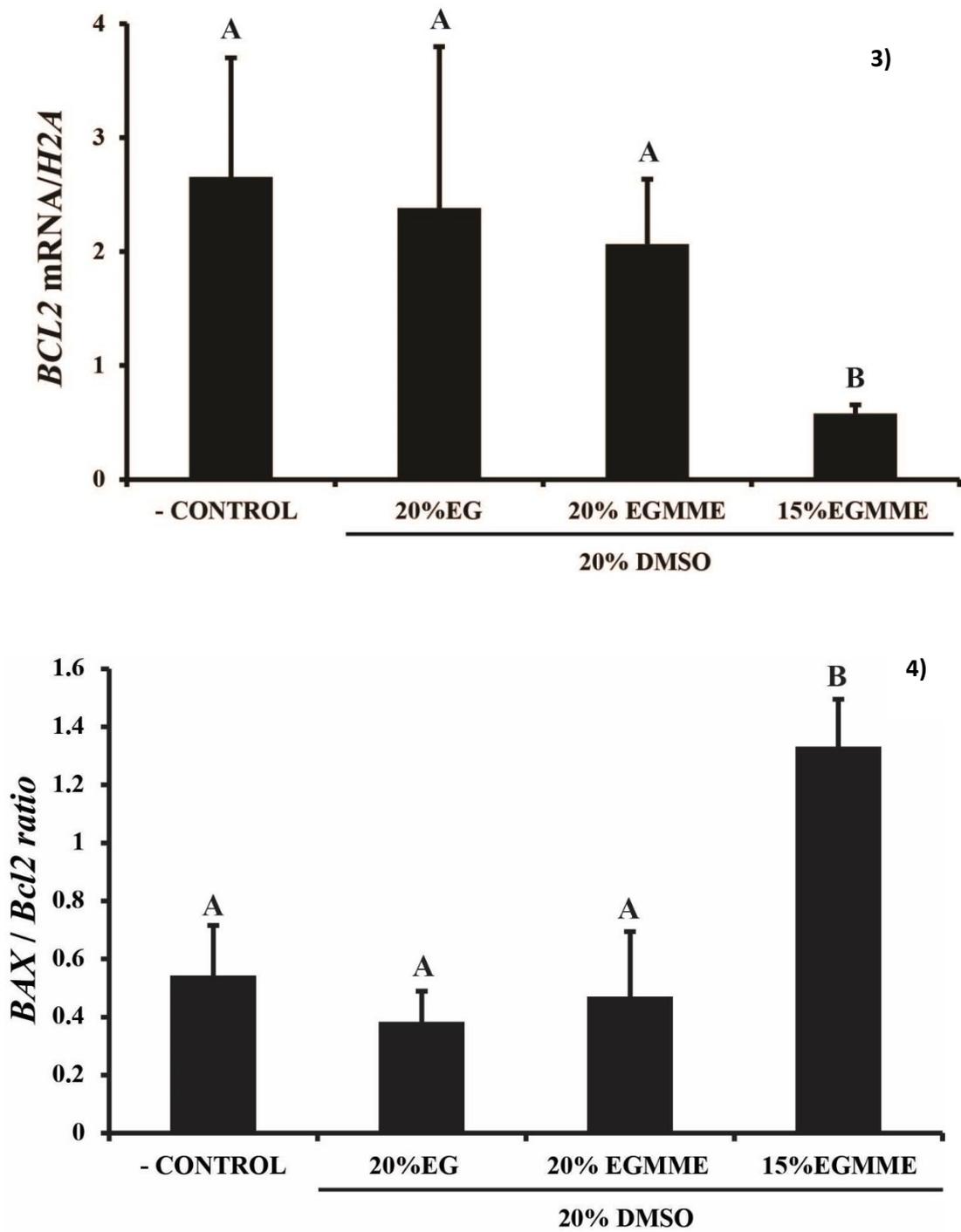


Figura 3 e 4: Transcritos dos genes (Bcl2/ HISTONA H2A), e a relação entre a expressão dos genes (Bax e Bcl2) em amostras provenientes dos diferentes grupos.

4.4 Discussão

Embora as taxas de eclosão similares entre os tratamentos do Experimento 1 possam sugerir que a associação de EGMME e DMSO na solução de vitrificação não resulta em toxicidade, em qualquer das concentrações testadas, no Experimento 2, as taxas de eclosão de embriões vitrificados foram inferiores às observadas para embriões não vitrificados.

A taxa de eclosão dos embriões nas 24h após a vitrificação utilizando os crioprotetores EG e EGMME foram apresentadas na tabela 2 por tratamento. As médias correspondem, a um grupo controle onde não ocorreu a exposição e que não foram vitrificados, demonstrando a viabilidade dos embriões produzidos. Nos demais tratamentos, os embriões não vitrificados (controle) foram diferentes dos vitrificados ($P < 0.05$), mas T1 foi diferente de T3 ($P < 0,05$). Pesquisas têm mostrado que um dos fatores que afetam a competência do desenvolvimento dos embriões bovinos vitrificados é o tipo de crioprotetor utilizado. Por esta razão, a escolha do EG devido à sua alta permeabilidade e baixa toxicidade tem se mostrado o mais conveniente para a vitrificação de ovócitos ou embriões bovinos (Li et al., 2012), tendo sido utilizado no presente trabalho como um grupo controle. Já a escolha pela associação com o DMSO também vem da sua vasta utilização em protocolos, mas o DMSO pode causar separação dos fusos dos microtúbulos e movimentação do material pericentriolar para o centro de ovócitos submetidos ao processo de preservação (Cetin & Bastan, 2006) alterações que podem ser causadas comumente durante o processo de vitrificação.

O tratamento 20% EGMME e 20% DMSO – T3, não se mostrou diferente do contendo EG, mas para que o etilenoglicol vitrifique, é necessária uma alta concentração (8,0M), tornando-se tóxico para o embrião. Dessa forma, a estratégia para o sucesso da vitrificação está na associação de outros crioprotetores intracelulares e extracelulares e não só na diminuição da concentração (Ali & Shelton, 1993). T2 e T3 não diferiram entre si, mas foram diferentes ($p < 0.05$) dos tratamentos com 15% EGMME e 20% DMSO, nos quais foi diminuída a concentração do crioprotetor o que deixa claro, o quanto maior o volume do embrião, maior o tempo necessário para que a célula atinja o equilíbrio osmótico na presença dos crioprotetores, pois pode não ter quantidade suficiente do crioprotetor nesta diluição para o embrião ser vitrificado.

A criopreservação normalmente causa aumento significativo nas taxas de degeneração de embriões bovinos. As células podem se degenerar pelos mecanismos de apoptose ou de necrose (Men et al., 2003). Quando alterada a concentração para 15% do crioprotetor EGMME durante a vitrificação, este não mostrou a mesma média de eclosão, o que nos leva a pensar que o processo pode ter sido inviabilizado pela baixa concentração do crioprotetor ou pelo tempo de 1 min de exposição. As características fundamentais para um eficiente agente crioprotetor é o baixo peso molecular, a sua alta capacidade de atravessar a membrana celular e uma baixa toxicidade (Kasai et al., 1996) e com muita rapidez este processo deve ocorrer. No entanto, já é conhecido que os embriões bovinos produzidos *in vitro* têm significativa diferença de sobrevivência após a criopreservação (Liu et al., 20012), pois são mais sensíveis aos danos decorrentes dos efeitos tóxicos e osmóticos dos crioprotetores (Vajta, 1997). Assim, a associação de distintos crioprotetores seria relevante para a otimização do processo de vitrificação (Ali & Shelton, 1993). Considerando que a menor taxa de eclosão observada no Experimento 2 ocorreu no tratamento com 15% de EGMME e 20% de DMSO, os resultados deste estudo indicam que o EGMME pode ser usado como crioprotetor para inclusão na solução de vitrificação na concentração de 20%.

A expressão dos genes *BAX* (promotor de apoptose) e *CCND2* (marcador de proliferação celular) não diferiu entre os grupos ($p > 0,05$), porém a expressão do gene *Bcl-2* (inibidor de apoptose) e sua relação com *BAX* foi diferente estatisticamente quando verificamos nas figuras 2 e 4. Para o re-aquecimento e transferência foram utilizados apenas os tratamentos T2 e T3 os quais tiveram boas taxas de eclosão e não mostraram qualquer diferença em relação ao controle na expressão gênica. Foram reaquecidos em um total de 59 embriões, sendo que os do tratamento T3 não tiveram boa retração durante o período de 6 horas em estufa de CO₂, por isso não foram implantados, sendo levados a campo apenas 15 embriões de cada tratamento. Um embrião quando exposto a um crioprotetor de baixo peso molecular, permeável à sua membrana, geralmente se retrai dada a saída de água intracelular, causada pela concentração hiperosmótica do meio extracelular. Como o embrião é mais permeável à água do que ao crioprotetor, a retração celular continua, até que o efluxo da água seja equilibrado com o influxo da solução crioprotetora. (Fahy, 1986). Sendo inevitável a formação dos cristais de gelo

e isto diretamente proporcional ao volume e inversamente proporcional à viscosidade da solução e à taxa de resfriamento. (Liebermann et al., 2002).

4.5 Conclusão

O uso do EGMME é recomendado porque não apresentou toxicidade nas concentrações avaliadas, e pode ser utilizado em protocolos de vitrificação de embriões PIV, porém sugere-se novos estudos com a utilização deste produto até mesmo com novas combinações.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção *in vitro* de embriões bovinos é um procedimento de rotina em pesquisas de transgenia, clonagem e áreas relacionadas com a biologia da reprodução. Este recurso vem sendo utilizado comercialmente em programas de reprodução em bovinos. Um dos grandes desafios para os criobiólogos têm sido desenvolver um método eficiente de criopreservação tanto de ovócitos e embriões humanos e de animais domésticos ou de animais em extinção.

O desenvolvimento de um protocolo de criopreservação aplicável às espécies mamíferas tem diversas implicações. Sendo assim, é necessário que sejam desenvolvidos protocolos específicos que resultem em boa preservação de embriões, os quais possam minimizar os danos na ultra estrutura causados às células em decorrência do processo de vitrificação e, conseqüentemente, maximizar a sua viabilidade. Melhorando os índices de sobrevivência dos blastocistos produzidos *in vitro* após a criopreservação.

6 REFERÊNCIAS

ABE, H.; OTOI, T.; TACHIKAW, S. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different systems using serum-free or serum-containing media. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, p.57-66, 2002.

ALI, J., SHELTON, J.N. Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, p. 471-477, 1993.

ARNOLD, K.; PRATSCH, L.; GAWRISH, K. Effect of poly (ethylene Glicol) in phospholipid hydration and polarity of the external phase. **Biochemistry Biophysycal Acta**, v.782, p.121-128, 1983.

ARAV, A., YAVIN, S., ZERON, Y., NATAN, D. New trends in gamete's cryopreservation. **Molecular Cell Endocrinology**, v. 187, p. 77-81, 2002.

ASGARI, V.; HOSSEINI, S. M.; FOROUZANFAR, M.; HAJIAN, M.; NASR-ESFANI, M. H. Vitrification of in vitro produced bovine embryos: Effect of embryonic block and developmental kinetics. **Cryobiology**. v. 65, p. 278-283. 2012.

BARIL, G., TRALDI, A-L., COGNIÉ, Y., LEBOEUF, B. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. **Theriogenology**. v.56, p.299-305, 2001.

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

BRAHMASANI, S. R.; YELISETTI, U. M.; KATARI, V. C.; KOMJETI, S.; NITHYA, S.; SINSINTHY, S. Effect of vitrification on meiotic maturation and expression of genes in immature goat cumulus oocyte complexes. **Cryobiology**. v.64, p. 176-184, 2012.

CAMPOS-CHILLON, L. F.; WALKER, D. J.; DE LA TORRE-SANCHEZ, J. F.; SEIDEL JR., G. E. In vitro assessment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos. **Theriogenology**, v. 65, p. 1200-1214, 2006.

CETIN, Y. & BASTAN, A. Cryopreservation of immature bovine oocytes by vitrification in straws. **Animal Reproduction Science**. v. 92(1-2), v. 29-36.2006.

CROSIER, A. E.; FARIN, P.W.; DYKSTRA, M.J.; ALEXANDER, J.E.; FARIN, C.E. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.64, p.1375-1385, 2001.

DATTENA, M.; ACCARDO, C.; PILICHI, S.; ISACHENKO, V.; MARAA, L.; CHESSAC, B.; CAPPAL, P. 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.

DE LOOS, F.; VAN VLIET, C.; VAN MAURIK, P.; KRUIP, T.A. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Resersh**. v.24, p.197-204, 1989.

DHONDGE, S.S.; PANDHUMEKAR, C.P.; PARWATE, D.V. Thermodynamic and optical studies of some ethylene glycol ethers in aqueous solution at T = 298.15 K. J **Chemistry Thermodynamics**, v. 41, p. 577-585. 2009.

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

DONNAY, I., AUQUIER, Ph., KAIDI, S., CAROLAN, C., et al. Vitrification of *in vitro* produced bovine blastocysts: methodological studies and developmental capacity. **Animal Reproduction Science**., v. 52, p. 93-104, 1998.

FAHY, G. M. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. **Cryobiology**, v. 23, p. 1-13, 1986.

FAHNING, M. L.; GARCIA, M. A. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. **Cryobiology**, v. 29, p. 1-18, 1992.

FOUNTAIN, D.M., RALSTON, M., HIGGINS, N., GORLIN, J.B. Liquid nitrogen freezers: a potential source of microbial contamination of hematopoietic stem cell components. **Transfusion**, v. 37, p. 585-91, 1997.

HOCHI, S.; AKIYAMA, M.; MINAGAWA, G.; KIMURA, K.; HANADA, A. Effects of cooling and warming rates during vitrification on fertilization of *in vitro* matured bovine oocytes. **Cryobiology**, v.41, p.69-73, 2001.

HOLM, P.; BOOTH, P.J.; SCHMIDT, M.H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with Sodium citrate and Myo-inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology**. v. 52, p. 863-700, 1999.

ISACHENKO, V., FOLCH, J., ISACHENKO, E., NAWROTH, F. Double vitrification of rat embryos at different developmental stages using an identical protocol. **Theriogenology**, v.60, p.445-452, 2003.

KADER, A. A.; CHOI, A.; IRIEF, Y.; AGARWAL, A. Factors affecting the outcome of human blastocyst vitrification. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 7, p. 99–111. 2009a.

KADER, A.; AGARWAL, A.; ABDELRAZIK, H.; SHARMA, R. K.; AHMADY, A.; FALCONE, T. Evaluation of post-thaw DNA integrity of mouse blastocysts after ultrarapid and slow freezing. **Fertility and Sterility**, v. 91, p. 2087–2094. 2009b.

KASAI, M.; ZHU, S. E.; PEDRO, P. B.; NAKAMURA, K, EDASHIGE, K. Fracture damage of embryos and its prevention during vitrification and warming. **Cryobiology**, v. 33, p. 459–464. 1996.

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

LEIBO, SP. A one-step method for direct non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Theriogenology**, v. 21, p. 767-790, 1984.

LEIBO, S. P.; MARTINO, A.; KOBAYASHI, S.; POLLARD, J. W. Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 45–53. 1996.

LI, L.; ZHANG, X.; ZHAO, L.; XIA, X.; WANG, W. Comparison of DNA apoptosis in mouse and human blastocysts after vitrification and slow freezing. **Molecular Reproduction and Development**, v. 79, p. 229-236. 2012.

LINDNER.; G. M.; WRIGHT.; R.W. Bovine embryo morphology and evaluation. **Theriogenology**, v. 20, p. 407-415. 1984.

LIEBERMANN, J.; NAWROTH.F.; ISACHENKO, V.; ISACHENKO, E.; RAHIMI, G.; TUCKER, M. J. Potencial importance of vitrification in reproductive medicine. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1671-1680, 2002.

LIU, J.; PHY, J.; YEOMAS, E. Theoretic considerations regarding slow cooling and vitrification during cryopreservation. **Theriogenology**, v. 78, p. 1641-1652. 2012.

LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-delta, deltaCT method. **Methods**, v.25, p. 402-408. 2001.

MARTINEZ, A.G. & MATKOVIC, M. Cryopreservation of ovine embryos: Flow freezing and vitrification. **Theriogenology**, v. 49, p. 1039-1049, 1998.

MARTINEZ, A.G.; MATOS, D. G; FUMUS.; C. C.; BROGLIATTI.; G. M. *In vitro* evaluation and pregnancy rates after vitrification of *in vitro* produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 50, p.757-767. 1998.

MARTINEZ, A.G., VALCÁRCEL, A., DE LAS HERAS, M.A., DE MATOS, D.G. Vitrification of *in vitro* produced bovine embryos: *in vitro* and *in vivo* evaluations. **Animal Reproduction Science.**, v. 73, p. 11-21, 2002.

MARTINO, A., POLLARD, J.A., LEIBO, S.P. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, p. 503-512, 1996a.

MARTINO, A., SONGSASEN, N., LEIBO, S.P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 1059-1069, 1996b.

MEN, H.; MONSON, R. L.; PARRISH, J. J.; RUTLEDGE, J. J. Degeneration of cryopreserved bovine oocytes apoptosis during subsequent culture. **Cryobiology**, v. 47, p. 73-81, 2003.

MERYMAN, H. T. Freezing injury and its prevention in living cells. **Annual Review of Biophysics and Bioengineering**, v. 3, p. 341-363, 1974.

MERYMANN, H. R.; WILLINS, R.J.; DOUGLAS, M. S. J. Freezing injury from solution effects and its prevention by natural or artificial cryoprotection. **Cryobiology**, v. 14, p. 287-302, 1977.

McGANN, L.E. Differing actions of penetrating and non penetrating cryoprotecture agents. **Cryobiology**, v.15, p.382-390, 1978.

NAITANA, S., LEDDA, S., LOI, P., LEONI, G. et al. Polyvinyl alcohol as a defined for serum in vitrification and warming solutions to cryopreserve ovine embryos at different stages of development. **Animal Reproduction Science**, v. 48, p. 247-256, 1997.

NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, v. 35, p. 109-124, 1991.

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

PARK, S.Y.; KIM, E. Y.; CUI, X. S.; TAE, J. C.; LEE, D.W.; KIM, N.H.; PARK, S.P.; LIM, J.H. Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts. **Zygote**. v.14, p. 125-131. 2006.

PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; CRITSER, E. S.; EYSTONE, W. H.; FIRST, N. F. Bovine *in vitro* fertilization with frozen thawed semen. **Theriogenology**, v.25, p.591-600. 1986.

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.; WINER, M.A.; FIRST, N.L. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction**, v. 38, p. 1171-1180. 1988.

PICKETT, B. M. Principles of cryopreservation. Techniques for freezing mammalian embryos: short course proceedings. Fort Collins: **Animal Reproduction Laboratory**, Colorado State University, 1986.

PIVKO, J.; LANDA, V.; KUBOVIEOVA, E.; SUPOVA, A.; GRAFENAU, P.; MAKAREVICH, A.V.; ZIBRÍN, M. Ultrastructural morphometry of precompacted bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro* after activation by electric pulse AC/DC. **General Physiology and Biophysics**. v. 23, p.101-112. 2004.

RAJAEI, F.; KARJA, N. W. M.; AGUNG, B.; WONGSRIKEAO, P.; TANIGUCHI, M.; MURAKAMI, M.; SAMBUU, R.; NII, M.; OTOI, T. Analysis of DNA fragmentation of porcine embryo exposed to cryoprotects. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, p. 429-432, 2005.

RALL, W.F., FAJY, G.M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. **Nature**, v.313, p.573-575, 1985.

RALL, W.F. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**, v. 24, p. 387-402, 1987.

RIOS, G.L.; MUCCI, N.C.; KAISER, G.G.; ALBIERO, R.H. Effect of container, vitrification volume and warming solution on cryosurvival of *in vitro*-produced bovine embryos. **Animal Reproduction Science**. v. 118, p. 19–24, 2010.

SARAGUSTY, J.; ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction**, v.141, p.1-19, 2011.

SCHNEIDER, V., MAZUR, P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. **Theriogenology**, v. 21, p.68-79, 1984.

SEIDEL JR., G. E. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenology**. v. 65, n., p. 228-235, 2006.

SHAW, J.M., KULESHOVA, L.L., MACFARLANE, D.R., TROUNSON, A.O. Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll or dextran. **Cryobiology**, v. 35, p. 219-229, 1997.

SOMMERFELD, V.; NEIMANN, H. Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. **Cryobiology**, v. 38, p. 95-105, 1999.

STATISTIX®.Statistix 9 analytical software. Tallahassee, FL, USA. 2008.

STINSHOFF, H.; WILKENING, S.; HANSTEDT, A.; BRUNING, K.; WRENZY, C. Criopreservation affects the quality of in vitro produced bovine embryos at the molecular level. **Theriogenology**, v. 76. 1433- 1441. 2011.

STOREY, K.; B.; STOREY, J. M. Frozen and alive. **Science Animal.**, v. 263, p. 62-67, 1990.

SZELL, A.; SHELTON, J. N. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 78, p. 699-703, 1986.

TAKAGI, M.; BOEDIONO, A.; SAHA, S.; SUZUKI, T. Survival of frozen-thawed bovine IVF embryos in relation to exposure time using various cryoprotectants. **Cryobiology**, v. 30, p. 306-312, 1993

VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Factors affecting survival rates of in vitro produced bovine embryos after vitrification and direct in-straw rehydratation. **Animal Reproduction Science**, v. 45, p. 191-200, 1996.

VAJTA, G., BOOTH, P.J., HOLM, P. GREVE, T., CALLESEN, H. Successfu ltrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. **Cryo-Letters**, v. 18, p. 191-195, 1997.

VAJTA, G., HOLM, P., KUWAYAMA, M., BOOTH, P.J., et al. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development.**, v.51, p. 53-58, 1998.

VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Sciece**, v.60-61, p.357-364, 2000.

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

VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L. G. B.; PALHAO, M. P.; CAMARGO, L. S. A. Features and perspectives of the Brazilian in vitro embryo industry. **Animal Reproduction**, v. 9, p. 12-18, 2012.

VIEIRA, A.D.; FORELL, F.; FELTRIN, C; RODRIGUES, J.L. In-straw cryoprotectant dilution of IVP bovine blastocysts vitrified in hand-pulled glass micropipettes. **Animal Reproduction Science**. v. 99, p. 377-383, 2007.

WOWK B.; DARWIN M.; HARRIS S.B.; RUSSELL S.R.; RASCH C. Effects of solute methoxylation on glass-forming ability and stability of vitrification solutions. **Cryobiology**, v. 39, p. 215-227, 1999.