

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE DESIDRATAÇÃO E REIDRATAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS CULTIVADOS EM DIFERENTES MEIOS

Mariana Côrtes Boité¹; Luiz Altamiro Garcia Nogueira¹; Michele Munck Pereira²; Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista²; Sabine Wohlfres Viana³; Juliana Polisseni³; Gustavo Bruno Mota⁴ Raquel Varela Serapião⁴; Bruno Campos de Carvalho⁴; Lillian Tami Iguma⁴; Wanderlei Ferreira de Sá⁴; João Henrique Moreira Viana⁴; Luiz Sérgio de Almeida Camargo⁴

1-Estudante do curso de mestrado em medicina veterinária da Universidade Federal Fluminense - UFF, Niterói-RJ, E-mail: maricboite@hotmail.com; 2-Estudante do curso de biologia do Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora – CESJF, Juiz de Fora- MG; 3-Estudante do curso de mestrado da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF, Juiz de Fora - MG; 4- Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora, MG

Palavras-chave: criopreservação, embriões bovinos, cultivo, osmolaridade

INTRODUÇÃO

Através das técnicas *in vitro* atuais, grande número de embriões bovinos são produzidos com custo relativamente baixo e podem ser utilizados em pesquisa científica básica (desenvolvimento embrionário, transgênese, clonagem) ou com objetivos comerciais. Para a produção *in vitro* de embriões (PIV) ser amplamente difundida, o uso da técnica de criopreservação é indispensável. Entretanto, embriões produzidos *in vitro* apresentam alta sensibilidade ao congelamento, quando comparados com embriões produzidos *in vivo* (LEIBO E LOSKUTOFF, 1993), o que faz da criopreservação um desafio para os pesquisadores.

Os fatores que determinam a baixa capacidade de embriões PIV sobreviverem ao processo de criopreservação ainda não são plenamente conhecidos. Fatores como período de cultivo embrionário e o tipo de meio utilizado são críticos para a qualidade embrionária em termos de criotolerância (MUCCI *et al.*, 2006; LONERGAN *et al.*, 2006; HASLER *et al.*, 1996). Assim, a otimização dos meios de cultivo utilizados na produção *in vitro* é uma das formas de aumentar a qualidade embrionária e, por consequência, a resistência dos embriões ao processo.

Na criopreservação, o movimento de água e crioprotetores através da membrana plasmática representa ponto importante na sobrevivência celular. KAIDI *et al.* (2000) observaram que embriões, submetidos a teste osmótico, que seguiram padrão comum de desidratação e reexpansão, comportando-se como perfeitos osmômetros, apresentaram maior sobrevivência à vitrificação.

Outros estudos mostram, ainda, que a taxa de sobrevivência é influenciada também pela idade do embrião, fase de desenvolvimento e qualidade. (DONNAY *et al.*, 1998; LAZAR *et al.*, 2000).

Objetivou-se, no presente estudo, avaliar a capacidade de desidratação e reidratação de embriões de diferentes estádios de desenvolvimento, cultivados *in vitro* em meio SOFaa ou CR2aa, quando submetidos a desafio osmótico.

MATERIAL E MÉTODOS

Complexos *cumulus*-oócitos (COCs), obtidos a partir de aspiração de ovários coletados em matadouro, foram maturados e fecundados *in vitro*. Os possíveis zigotos foram distribuídos aleatoriamente nos meios CR2aa ou SOFaa e cultivados em estufa a 38,5°C, 95% de umidade e 5% de CO₂ em ar atmosférico. Nos dias sete (D7) e oito (D8) após a fecundação, foram selecionados 94 embriões, de acordo com seu estágio de desenvolvimento para teste de desafio osmótico, divididos homogeneamente entre grupos controle e desafio osmótico. Para o desafio osmótico foram utilizados blastocistos (Bl, n=38) e blastocistos expandidos (Bx, n=27) de graus de qualidade I e II, dos meios CR2aa (n=38) e SOFaa (n=27). O desafio osmótico consistiu em observar e fotografar individualmente embriões em quatro momentos distintos (T0, T5, T10 e T2h), em temperatura ambiente, utilizando câmera Sony DX-950 acoplada a microscópio invertido. As imagens foram armazenadas diretamente em computador, utilizando-se o software Pinnacle Studio, versão 7.11, para posterior avaliação.

No primeiro momento (T0), cada embrião foi fotografado em gota de 20µl de solução TALP isosmótica. Dessa gota, foram transferidos individualmente para gotas de 20µl de solução hipertônica de Cloreto de Sódio (NaCl, 900 mOs), contendo Albumina Sérica Bovina (BSA). Os embriões permaneceram por cinco minutos e foram fotografados (T5). No terceiro momento (T10), os embriões foram transferidos para gotas de 20µl de solução TALP isosmótica, onde foram mantidos por dez minutos e fotografados ao final do período. No último momento (T2h), os embriões foram colocados em gotas de 20µl de CR2aa e mantidos em estufa incubadora por duas horas, após o que foram novamente fotografados. Cada embrião submetido ao teste foi acondicionado individualmente em criotubo com 2 µl de TALP e mergulhado em N₂, sendo em seguida armazenado em freezer a -90°C para posterior extração e quantificação de RNAm.

Os embriões do grupo controle foram mantidos em gotas de 20µl de Talp onde foram fotografados e transferidos para estufa incubadora em gotas CR2aa por duas horas e fotografados ao final do período.

As imagens obtidas foram submetidas à análise no software Image J, com o qual mensurou-se a área de cada embrião nos quatro momentos avaliados. Calculou-se a taxa de desidratação dos

embriões pela diferença entre a área mensurada nos momentos T0 e T5. As taxas de reidratação nos momentos T10 (TR10) e T2h (TR2h) foram calculadas pelas seguintes fórmulas: $TR10 = (T10/T0 - T5) \times 100$; $TR2h = (T2h/T0 - T5) \times 100$.

As variáveis taxa de desidratação, taxas de reidratação (TR10 e TR2h) e a área final, expressa como porcentagem da área em T0, foram submetidas à análise de variância, levando-se em consideração os efeitos de estágio de desenvolvimento e meio de cultivo, utilizando-se o programa *Statistical Analysis System* (SAS). Os valores estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação ao estágio de desenvolvimento, observou-se que, em T5, embriões BI apresentaram menor ($p < 0,05$) taxa de desidratação relativa ao T0 ($35,2 \pm 2,7\%$) quando comparados com os blastocistos expandidos (Bx) ($43,5 \pm 1,3\%$), demonstrando menor desidratação (figura 1). Após retornar ao meio isotônico (T10), a taxa de reidratação foi maior ($p < 0,05$) nos blastocistos (BI) ($24,6 \pm 3,1\%$) do que nos Bx ($9,7 \pm 5,5\%$), bem como no momento T2h (BI= $42,6 \pm 3,9\%$ vs Bx= $28,4 \pm 7,2\%$), sugerindo maior capacidade de reidratação dos BI (figura 2). Em T2h, embriões BI apresentaram área média superior às áreas em T0 ($107,0 \pm 2,8\%$), enquanto embriões Bx não alcançaram a medida da área inicial ($84,9 \pm 4,4\%$), indicando melhor recuperação dos BI após retorno ao cultivo embrionário (figura 3).

Ao considerar-se o meio de cultivo, observou-se que em T5 blastocistos produzidos em CR2aa apresentaram menor ($p < 0,05$) taxa de desidratação ($31,3 \pm 2,9\%$) quando comparados aos produzidos em SOFaa ($40,6 \pm 1,9\%$) (figura 4). Não houve diferença ($p > 0,05$) na taxa de desidratação dos Bx entre os meios. Contudo, em T10, não houve diferença ($p > 0,05$) no comportamento dos embriões BI e Bx produzidos em meio CR2aa ou SOFaa ($78,0 \pm 4,2\%$ vs $72,7 \pm 4,4\%$), bem como no T2h ($95,8 \pm 4,2\%$ vs $94,0 \pm 4,5\%$). Esses resultados demonstram que as diferenças observadas entre os cultivos SOFaa e CR2aa após 5 minutos em meio hipertônico são eliminadas após 10 minutos em meio isotônico e 2 horas em cultivo.

Os resultados mostram que embriões bovinos PIV em estágio de BI possuem menor capacidade de desidratação e maior capacidade de reidratação quando comparados aos embriões em estágio de Bx,. O meio de cultivo dos embriões pode ter determinado o comportamento diferente entre os BI apenas em T5, quando as estruturas sofreram desidratação. Nos outros momentos não foram observadas diferenças no comportamento dos BI e Bx cultivados em SOFaa ou CR2aa. Assim, o estágio de desenvolvimento, e não o meio de cultivo utilizado, foi determinante do padrão de comportamento observado.

Estudos mostram maior taxa de sobrevivência *in vitro*, após congelamento e descongelamento, de embriões que alcançam estágio mais avançado de desenvolvimento durante o período de cultivo. No presente estudo, foram observadas diferenças no comportamento osmótico entre embriões de diferentes estádios. Porém, não é possível associar qual padrão de desidratação e reidratação representa maior criotolerância. O teste realizado procurou mimetizar as alterações osmóticas a que embriões são submetidos durante o congelamento. Entretanto, outros tipos de danos, além do osmótico, podem ocorrer e estão relacionados a fatores como toxicidade dos crioprotetores, tempo de exposição, temperatura e tipo de curva de congelamento, e estes não foram avaliados no experimento.

KAIDI *et al.* (2000) associou maior criotolerância àqueles embriões que funcionaram como verdadeiros osmômetros, respondendo às alterações do meio com padrão de comportamento definido. Ainda, tais características foram observadas em blastocistos expandidos, reforçando a ideia de maior criotolerância deste estágio. No presente estudo, BI desidrataram menos em relação à área inicial, quando comparados aos Bx, fato que pode estar relacionado ao menor grau de blastulação daqueles embriões. Entretanto, BI reidrataram mais no meio isotônico e apresentaram área relativa à T0 maior após duas horas de cultivo do que os Bx. Durante T5, o maior conteúdo cavitário do Bx pode ter favorecido a perda de líquido para o meio. É possível que, por possuírem maior blastocela, a membrana plasmática das células desses embriões já estejam equipadas com estruturas responsáveis por trocas mais eficientes, como canais de água, além das bombas de Na e K. Entretanto, com o decorrer do tempo, ao permanecer em meio isotônico (T10 e T2h), os BI demonstraram maior reidratação, sugerindo melhor recuperação da desidratação dos BI com o decorrer do tempo.

Novos estudos devem ser conduzidos para determinar o efeito de outros tipos de danos aos embriões durante a criopreservação. Quanto à osmolaridade, embriões em estágio de blastocisto, independente do meio onde foram cultivados, parecem responder melhor que blastocistos expandidos, recuperando-se e continuando seu desenvolvimento após duas horas de cultivo.

O conhecimento do comportamento de embriões PIV diante de cada etapa da criopreservação, e dos tipos de danos que podem ocorrer durante o processo, indicarão as adaptações necessárias para a melhoria dos índices nesta biotécnica.

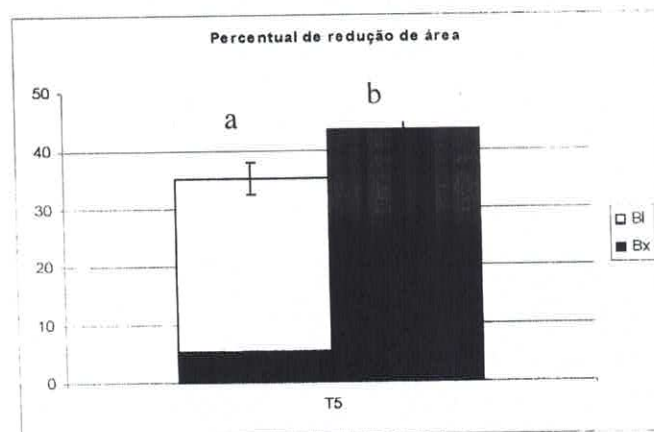


Figura 1: Taxa de desidratação após 5 minutos em solução hipertônica (T5) para blastocistos (BI) e blastocistos expandidos (Bx) expressa percentualmente pela diferença entre as áreas no momento T0 e T5.

Colunas no mesmo gráfico com diferentes letras apresentam diferença estatística.

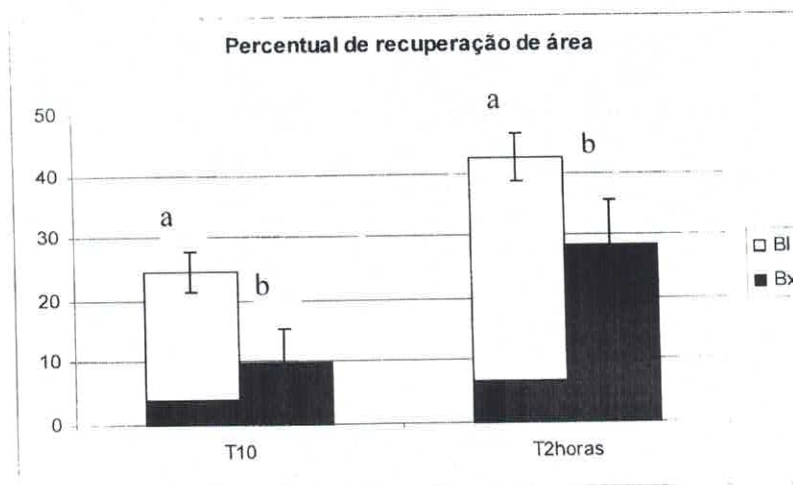


Figura 2: Taxa de rehidratação de blastocisto (BI) e blastocisto expandido (Bx), submetidos a desafio osmótico em solução hipertônica, após 10 minutos em meio isotônico (T10) e duas horas de cultivo em CR2aa (T2h).

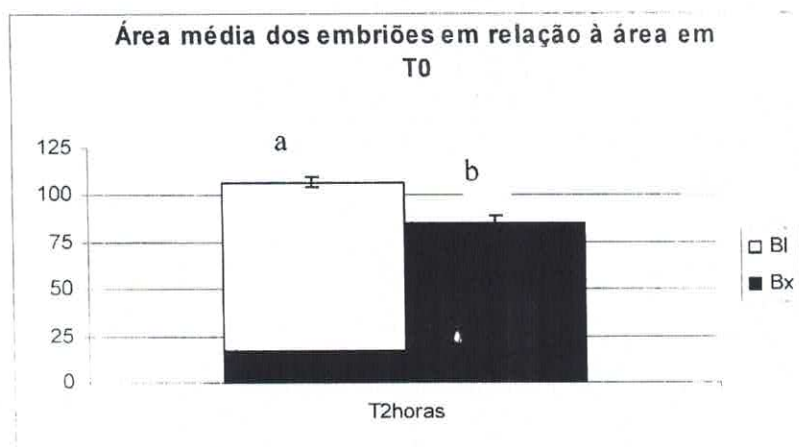


Figura 3: Comparação entre as áreas em T2h de BL e Bx, cultivados em meio SOFaa ou CR2aa, após duas horas de cultivo (T2h) ao final do desafio osmótico.

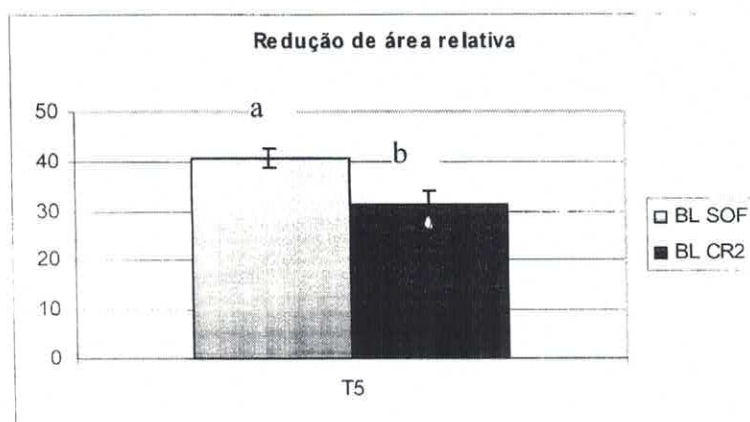


Figura 4: Taxa de desidratação de BL cultivados em CR2aa ou SOFaa após cinco minutos em solução hipertônica (T5)

AGRADECIMENTOS

Cnpq e a Fapemig pelo apoio financeiro e a Embrapa Gado de Leite pela utilização das instalações.

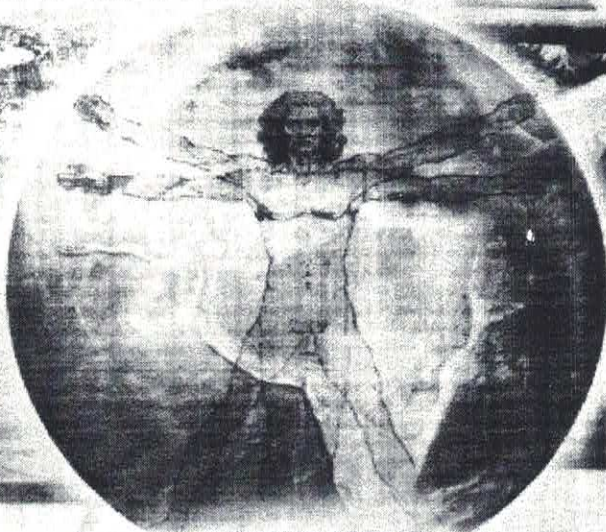
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DONNAY, P.; AUQUIER Ph.; KAIDI, S.; CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; MERMILLOD, P.; MASSIP, A. Vitrification of in vitro produced bovine blastocysts: methodological studies and developmental capacity. *Animal Reproduction Science*, v. 52, p. 93–104, 1998.
- HASLER, J. F.; HURTGEN, Z. Q.; STOKES, J. E. Survival of IVF- derived bovine embryos frozen in glycelor or ethylene glycol. *Theriogenology*, v. 48, p. 563–579, 1996.

- KAIDI, S.; DONNAY, P.; LAMBERT, P.; DESSY, F.; MASSIP, A. Osmotic behavior of in vitro produced bovine blastocysts in cryoprotectant solutions as a potencial predictive test of survival. *Cryobiology*, v.41, p.106-115, 2000.
- LAZAR, L.; SPAK, J.; DAVID, V. The vitrification of in vitro fertilized cow blastocysts by the open pulled straw method. *Theriogenology*, v.54, p. 571-578, 2000.
- LEIBO, S.P.; LOSKUTOFF, N.M. Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology*, v.39, p.81-94, 1993.
- LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D.; EVANS, A.C. O. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVP- derived embryos. *Theriogenology*, v.65, p. 137-152, 2006.
- MUCCI N.; ALLER J.; KAISER G.; HOZBOR F.; CABODEVILA J.; ALBERIO R.H. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, v. 65, p. 1551-1562, 2006.

XXX SEMANA DE BIOLOGIA

O MUNDO SE TORNOU PEQUENO PARA VOCÊ



MAS VOCÊ NÃO É GRANDE PARA O MUNDO

- > XIII MOSTRA DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA
- > V FEIRA MUNICIPAL DE CIÊNCIAS
- > II MOSTRA DE PALEOBIODIVERSIDADE
- > MINI-CURSOS

> CICLO DE PALESTRAS:

- BIOMIMÉTICA
- DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL
- FRAGMENTAÇÃO FLORESTAL
- CORREDORES ECOLÓGICOS
- AQUEDUTO MAMAL
- MODELO DE DESENVOLVIMENTO
- PROTOCOLO DE KYOTO

INSCRIÇÕES: a partir de 01 de outubro
no DA de Biologia ICB - UFJF

INFORMAÇÕES: seminario2007@gmail.com

TEL.: 84297442 / 88148886 / 88364408 / 99452812

APÓIO:



ICB

Nio

SECRETARIA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Comunidade e Parque Ambiental

REALIZAÇÃO:

cbio

71