

TAXA DE SOBREVIVÊNCIA *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO* SUBMETIDOS À VITRIFICAÇÃO OU CONGELAMENTO LENTO COM ETILENOGLICOL

Mariana Côrtes Boité¹; Luiz Altamiro Garcia Nogueira¹; Michele Munk Pereira²; Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista²; Sabine Wohres Viana³; Juliana Polisseni³; Gustavo Bruno Mota⁴ Raquel Varela Serapião¹; Bruno Campos de Carvalho⁴; Lílian Tami Iguma⁴; Wanderlei Ferreira de Sá⁴; João Henrique Moreira Viana¹; 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, produção *in vitro* de embriões.

INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos é uma técnica muito utilizada tanto comercialmente como para pesquisa científica. Entretanto, um dos obstáculos para sua maior difusão é a ausência de métodos adequados para preservar os embriões. A criopreservação de embriões produzidos *in vivo* é realizada pelos profissionais de campo, normalmente através do congelamento lento, e apresenta índices satisfatórios. Contudo, os embriões produzidos *in vitro* possuem características que aumentam a sensibilidade ao processo, como maior teor de lipídios, menor quantidade de junções intercelulares, zona pelúcida mais frágil e menor número de células (FAIR *et al.*, 2001). As peculiaridades desses embriões levaram os pesquisadores a buscar outras formas de criopreservar os produtos da fertilização *in vitro*, sendo uma delas a vitrificação.

A vitrificação é um processo físico pelo qual a solução alcança um estado amorfo, estável e vítreo através do resfriamento rápido, sem formação de cristais de gelo, mantendo as propriedades de um líquido em forma solidificada (RALL, 1992). Para obter essa transformação é necessário o uso de altas concentrações de crioprotetores, o que prejudica os embriões pelo nível de toxicidade. VAJTA *et al.* (1998) estabeleceu na vitrificação o uso do *open pulled straw* (OPS) que elevou ainda mais as taxas de resfriamento e reaquecimento (mais de 20.000°C/min) e menor tempo de contato com crioprotetores, o que reduziu os danos tóxicos e osmóticos. A principal vantagem da

vitrificação em relação ao congelamento lento é a ausência de formação de cristais de gelo, que lesam as membranas celulares e prejudicam a viabilidade embrionária

Objetivou-se avaliar a capacidade de sobrevivência de embriões produzidos *in vitro* através da comparação, após serem submetidos à técnica de vitrificação por OPS ou congelamento lento com etilenoglicol, das taxas de reexpansão e eclosão dos embriões de cada tratamento.

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 cultivados em meio CR2aa adicionado de 10% de soro fetal bovino (SFB) e em co-cultura com células do *cumulus* oriundas dos próprios oócitos em ambiente atmosférico com 5% de CO₂ a 38,5°C. Sete dias após a fecundação (D7), blastocistos (Bl) e blastocistos expandidos (Bx), graus de qualidade I e II, provenientes de oito baterias, foram retirados do cultivo (n=148) e divididos equitativamente quanto à qualidade e estágio de desenvolvimento entre os grupos de tratamento vitrificação (Vt=48), congelamento lento com etilenoglicol (EG=46) e controle (C=54). Todos os embriões foram acondicionados em placa contendo TALP aquecido. Aqueles separados para o congelamento lento, foram transferidos individualmente para gotas de solução de etilenoglicol e PBS 1.5M e envasados em palhetas 0,25 ml Nutricel. Cada palheta foi vedada em sua extremidade e, ao final de dez minutos de contato entre o crioprotetor e o embrião, foram transferidas para o *cryochamber* da máquina de congelamento Freeze Control®. Após seis minutos na máquina, foi feito o *seeding* e iniciou-se a curva de congelamento com redução de 0,5°C/ min até -32°C. Ao final da curva, as palhetas foram armazenadas em nitrogênio líquido a -196°C.

Os embriões do grupo Vt foram transferidos para uma placa de Nunc sobre placa aquecedora a 39°C contendo 1 ml de *holding medium* (HM), solução de PBS acrescido de 5% de soro fetal bovino. Em seguida foram individualmente transferidos para outro poço da mesma placa de Nunc contendo 10% de DMSO e 10% Etilenoglicol em HM, onde permaneceram por um minuto. Ao final desse período foram transferidos para gotas de 20µl de solução HM contendo 20% de DMSO e 20% de etilenoglicol onde permaneciam por período não superior a 25 segundos. Neste intervalo foram acondicionados em OPS pelo efeito de capilaridade e submersos em nitrogênio líquido.

O descongelamento das palhetas do grupo EG foi realizado por 10 segundos em temperatura ambiente e 20 segundos em banho-maria a 37°C. O conteúdo de cada palheta era depositado sobre uma placa de Petri para localização do embrião, que em seguida era "lavado" em CR2 e transferido para a placa de cultivo. A desvitrificação foi realizada pela permanência de cada OPS em

temperatura ambiente por 5 segundos e imersão da extremidade contendo o embrião em solução 1,5 M de sacarose em HM aquecida por 5 minutos. Em seguida, os embriões eram transferidos para outro poço contendo solução de 1,2M de sacarose em HM onde permaneciam por mais cinco minutos e então eram transferidos para a placa de cultivo. O cultivo dos embriões descongelados e desvitrificados foi feito em gotas de 50µl de CR2aa previamente preparadas, contendo monocamada de células da camada granulosa oriundas de folículos com mais de 8 mm. As observações para determinar a taxa de sobrevivência foram realizadas 24, 48 e 72 horas após o processo de criopreservação. Levou-se em consideração as taxas de reexpansão com 24 horas, eclosão com 72 horas e degeneração nos três momentos para, através de análise pelo teste qui-quadrado, compararmos as duas técnicas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tratamentos Vt e EG não apresentaram diferença ($p>0,05$) entre si na taxa de reexpansão com 24 horas ou na taxa de eclosão com 72 horas de cultivo. Os dois grupos diferiram do controle ($p<0,01$) na taxa de eclosão com 72 horas, como mostra a Tabela 1. Entretanto, houve diferença entre o grupo Vt e EG ($p>0,01$) nas taxas de degeneração com 48 horas e 72 horas, sem diferença ($p>0,05$) na taxa de degeneração com 24 horas de cultivo (Tabela 2). O grupo controle apresentou a maior taxa de eclosão com 72 horas (42,6%) e as menores taxas de degeneração nos três momentos de observação (7,4%, 24,1%, 27,8%), diferindo estatisticamente ($p<0,01$) dos grupos Vt e EG em todas as análises.

Os parâmetros usados para avaliar a taxa de sobrevivência *in vitro*, neste experimento, foram a taxa de reexpansão com 24 horas e taxa de eclosão com 72 horas de cultivo após o tratamento. Não foram encontradas diferenças entre os grupos Vt e EG, indicando que, tanto o congelamento lento com etilenoglicol quanto a vitrificação possuem efeitos similares sobre os embriões. Entretanto, a análise da taxa de degeneração mostrou que, a partir de 48 horas após o tratamento, maior número de embriões submetidos ao congelamento lento degeneraram. Este dado indica que, o tratamento com etilenoglicol causou danos aos blastocistos que induziram a degeneração. A formação de cristais de gelo, com conseqüente rompimento de membranas celulares e do citoesqueleto (DOBRINSKY, 1996) podem ter causado tais danos. A vitrificação não envolve formação de cristais, porém, a concentração utilizada de crioprotetores também prejudica a sobrevivência dos embriões, principalmente pelo efeito tóxico sobre o citoesqueleto (DOBRINSKY, 1996).

A sobrevivência dos embriões submetidos aos tratamentos de criopreservação, avaliada a partir das taxas de reexpansão e eclosão, não foi diferente entre os grupos. Porém, as taxas de

degeneração diferentes após 48 horas de cultivo mostram que, o congelamento lento com etilenoglicol causou danos irreversíveis aos embriões, levando mais estruturas à degeneração quando comparado à vitrificação. Pelo fato de embriões FIV apresentarem peculiaridades que conferem a alta sensibilidade à criopreservação, o congelamento lento destes embriões não apresenta a mesma eficiência observada com embriões produzidos *in vivo*. A vitrificação pode representar uma nova opção. Entretanto, adaptações na técnica, específicas para embriões FIV, devem ser testadas para melhores índices serem alcançados.

GRUPOS	REEXPANSÃO	24	ECLOSÃO	72
	HORAS		HORAS	
CONTROLE	-		42,6% (23/54) ^a	
VT	48,0% (23/48) ^a		16,7% (8/48) ^b	
EG	34,8% (16/46) ^a		15,3% (7/46) ^b	

Tabela 1: taxas de reexpansão com 24 horas de cultivo após o tratamento e eclosão com 72 horas de cultivo após o tratamento. Valores representados com letras distintas diferem entre si.

TAXA DE DEGENERAÇÃO			
GRUPOS	24 horas	48 horas	72 horas
CONTROLE	7,4% (4/54) ^a	24,1% (13/54) ^a	27,8% (15/54) ^a
VT	27,1% (13/48) ^b	45,8% (22/48) ^b	50% (24/48) ^b
EG	45,6% (21/46) ^b	73,9% (34/46) ^c	78,3% (36/46) ^c

Tabela 2: Taxa de degeneração observada com 24, 48 e 72 horas de cultivo após o tratamento nos três grupos. Valores representados com letras distintas diferem entre si.

AGRADECIMENTOS

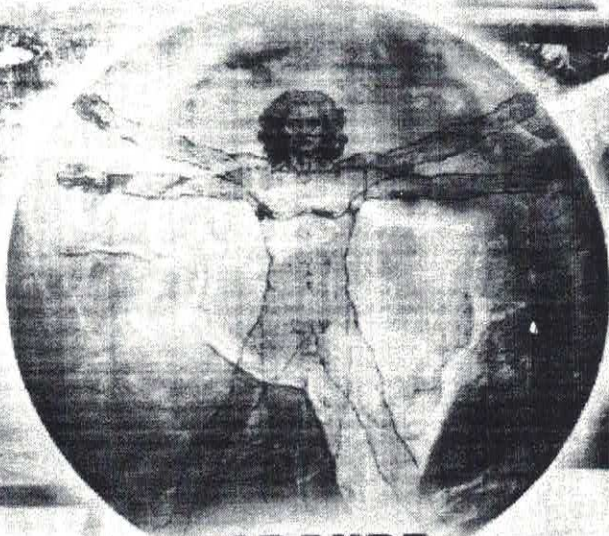
Fapemig, CNPQ e Embrapa Gado de Leite

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DOBRINSKY, J. R. Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology*, v. 45, p. 17-26, 1996.
- FAIR, T.; LONERGAN, P.; DINNYES, A.; COTTEL, D. C.; HYTTEL, P.; WARD, F. A.; BOLAND, M. P. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. *Molecular Reproduction and Development*, v. 58, p. 186-195, 2001.

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:

- BIOCOMPOSTÍVEL
- DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL
- FRAGMENTAÇÃO FLORESTAL
- CORREDORES ECOLÓGICOS
- ACORDO DE MADRID
- MODELO DE DESENVOLVIMENTO
- PROTOCOLO DE KYOTO

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

INFORMAÇÕES: sebio07@gmail.com
Tel.: 34297442/ 34246555/ 34364600/ 34462852

UFJF



ICB



bio



Associação de Ciências Biológicas
Compartilhando o Patrimônio Biológico

REALIZAÇÃO:

cbio

71

