

## VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS “IN VITRO”<sup>1</sup>

### AUTORES

ISABELLA DE MOURA FOLHADELHA<sup>2,3</sup>, RENATA SARTINI DE OLIVEIRA<sup>2</sup>, JULIANA POLISSENI<sup>2</sup>,  
WANDERLEI FERREIRA DE SÁ<sup>2</sup>, LUIZ SÉRGIO DE ALMEIDA CAMARGO<sup>2</sup>, ADEMIR DE MORAES  
FERREIRA<sup>2</sup>, ALESSANDRA A. RAMOS<sup>2,3</sup>, JOÃO HENRIQUE MOREIRA VIANA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Órgão Financiador - FAPEMIG

<sup>2</sup> Embrapa Gado de Leite

Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco – Juiz de Fora - MG

CEP 36038-330

<sup>3</sup> Universidade Federal de Minas Gerais

Av. Antônio Carlos, 6627 – Bairro Pampulha - Belo Horizonte - MG

CEP 31270-901

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a sobrevivência de embriões bovinos produzidos *in vitro*, frente a dois diferentes protocolos de vitrificação. Foram utilizados 105 blastocistos de grau I e II produzidos *in vitro*. Os embriões foram distribuídos nos seguintes grupos: 1- blastocistos não vitrificados (n=35); 2- blastocistos vitrificados (n=37) em solução de dimetilsulfóxido e etilenoglicol e 3- blastocistos vitrificados (n=33) em solução de etilenoglicol e glicerol. Os embriões foram envasados, vitrificados e armazenados em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ . Para o descongelamento os embriões foram vertidos em solução com diferentes concentrações de sacarose 0,25M;0,15M para o grupo 2 e 1M;0,5M;0,25M para o grupo 3. Em seguida os embriões foram co-cultivados em monocamadas de células da granulosa em TCM 199, por 72 horas. A taxa de re-expansão e eclosão não diferiram entre os grupos 1 e 2 (95,3% X 88,5% e 83,6% X 67,4%, respectivamente), mas elas diferiram entre os grupos 2 e 3 (88,5% X 62,2% e 67,4% X 37,0%, respectivamente). Estes resultados indicam que a vitrificação com dimetilsulfóxido e etilenoglicol é mais eficiente para a criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

### PALAVRAS-CHAVE

Criopreservação, dimetilsulfóxido, etilenoglicol, glicerol, embriões bovinos

### TITLE

VITRIFICATION OF IN VITRO PRODUCED BOVINE EMBRYOS

### ABSTRACT

The aim of this study was evaluated the survival of *in vitro* produced bovine embryos, after vitrification using two different protocols. Grade I and II blastocysts produced *in vitro* (n=150) were used. The embryos were distributed into treatments: 1- fresh blastocysts (n=35); 2- blastocysts vitrified using dimethylsulphoxide and ethylene glycol solution (n=37) and 3- blastocysts vitrified using ethylene glycol and glycerol solution. Embryos were envased, vitrified and storage in liquid nitrogen at  $-196^{\circ}\text{C}$ . For thawing, embryos were expelled into sucrose solution with different concentrations of sucrose (0,25M and 0,15M to group 2 e 1M; 0,5M; 0,25M to group 3). After, embryos were co-cultivated with granulosa cells monolayers in TCM 199, for 72 hours. The re-expansion and hatching rates were not different between group 1 and group 2 (95,3% X 88,5% and 83,6% X 67,4%, respectively), but they were different between group 2 and group 3 (88,5% X 62,2% and 67, 4% X 37,0%, respectively). The results indicate that vitrification using dimethylsulphoxide and ethylene glycol solution are efficient for cryopreservation of *in vitro* produced bovine embryos.

### KEYWORDS

cryopreservation, dimethylsulfoxid, ethylene glycol, glycerol, bovine embryo

## INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos é uma ferramenta importante para a disseminação do material genético de animais de interesse comercial. Atualmente um dos grandes obstáculos à aplicação comercial da PIVE em larga escala é a falta de um eficiente método de criopreservação. Embriões produzidos *in vitro*, apresentam baixa taxa de sobrevivência após o descongelamento, pois possuem características físicas, citológicas e metabólicas diferentes dos embriões produzidos *in vivo*. Um eficiente método de criopreservação para embriões produzidos *in vitro* exige um protocolo compatível com suas características, onde os danos causados as estruturas celulares vitais do embrião (membrana, mitocôndria e citoesqueleto) sejam reduzidos, possibilitando uma maior taxa de sobrevivência do embrião. O objetivo deste trabalho foi avaliar a sobrevivência de embriões produzidos *in vitro*, frente a dois diferentes protocolos de vitrificação.

## MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se ovócitos obtidos por aspiração folicular de ovários de vacas abatidas. Os ovócitos foram selecionados e colocados em maturação por 24 horas, em meio TCM199 acrescido de FSH(10 microlitros/ml), penicilina(10 microlitros/ml) e soro de vaca em cio (10%). Posteriormente, os ovócitos foram fertilizados em gotas de 30 microlitros de meio Fert-Talp acrescido de heparina, cobertas com óleo mineral, com uma concentração de  $2 \times 10^6$  espermatozoides/ml, por 22 horas. Foi utilizado sêmen de um touro holandês previamente selecionado e a separação dos espermatozoides mais viáveis foi realizado pelo método do swim up. Após este período os prováveis zigotos foram cultivados em meio CR2aa por sete dias. A maturação, fertilização e cultivo se deu em estufa incubadora, com 5%CO<sub>2</sub> em ar atmosférico a 38.6°C. No dia 7 do cultivo, os embriões foram avaliados e aqueles classificados como excelentes (grau I) e bons (grau II) foram vitrificados. 105 blastocistos foram distribuídos nos seguintes grupos: 1- blastocistos não vitrificados (n=35); 2-blastocistos vitrificados (n=37), com etilenoglicol (EG) e dimetilsulfóxido(DMSO); 3- blastocistos vitrificados (n=33) com etilenoglicol e glicerol (G). Os embriões do grupo 2 foram vitrificados pela passagem em solução HM2 (PBS+5% soro de vaca em cio) contendo 10% v/v de DMSO e 10% v/v de EG por 1 minuto e em seguida em solução HM2 contendo 20% v/v de DMSO e 20% v/v de EG, sendo envasados em paletas apropriadas "Open Pulled Straws" e armazenados em nitrogênio líquido a -196°C. A desvitrificação se deu pela passagem dos embriões em solução de HM2 com duas diferentes concentrações de sacarose (0,25M e 0,15M) por 5 minutos em cada concentração, em temperatura ambiente. Já os embriões do grupo 3 foram vitrificados pela passagem em solução HM1(PBS+20% de soro de vaca em cio) contendo 10% v/v de G por 5 minutos, em seguida foram transferidos para solução HM1 com 10% v/v de G + 20% v/v de EG por 5 minutos e em solução HM2 com 25% v/v de G +25% v/v de EG por 30 segundos, sendo envasados e armazenados da mesma forma descrita para o grupo 1. A desvitrificação se deu pela passagem dos embriões em solução HM1 com três diferentes concentrações de sacarose (1M; 0,5M; 0,25M) por 5 minutos em cada concentração a 39°C. Após a desvitrificação os embriões dos grupos 2 e 3, assim como os embriões do grupo controle, foram transferidos para gotas de cultivo em TCM 199 com monocamada de células da granulosa por 72 horas. A sobrevivência embrionária foi avaliada pela re-expansão dos blastocistos e eclosão, as quais foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA), sendo usado o teste de Scott- Knott para comparação das médias.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de 448 ovócitos, 275 clivaram( 61,4%) e 185 desenvolveram em blastocistos(41,3%), destes 116( 63,7%) foram considerados de grau I e II, sendo que para o experimento foram utilizados 105 embriões. Os resultados das sobrevivência embrionária( taxa de re- expansão e eclosão) estão apresentados na tabela 1. A taxa de re- expansão para blastocistos vitrificados no grupo 1 foi similar ao encontrado por Lazar et al., 2000. Pugh et al., 2000 observou taxas de re- expansão e eclosão menores, do que a do presente experimento, o que pode ser devido ao não equilíbrio dos embriões em uma concentração menor de crioprotetores (10% EG+10% DMSO) antes de passa-los para a concentração maior (25% EG+ 25% DMSO), causando um choque osmótico. Segundo Kaidi et al.(1999), a concentração hiperosmótica de crioprotetores durante o equilíbrio induz alteração do volume celular ocasionando danos na membrana da célula e consequentemente, diminuindo a sobrevivência dos embriões. Em relação a solução de vitrificação com EG+G, Martínez et al. (2002) apresentou taxas de re -expansão e eclosão similares as observadas no presente trabalho. O DMSO possui baixo ponto de congelamento, permitindo um congelamento ultra- rápido quando em temperaturas muito baixas, sem promover a formação de cristais de gelo que é uma das causas

de lesão ao embrião. Outra característica importante do DMSO como crioprotetor, foi o menor tempo de exposição dos embriões à solução crioprotetoras. Assim baixo ponto de congelamento de um dos crioprotetores, associado com uma redução do tempo de exposição, possibilitou um desenvolvimento embrionário normal.

## CONCLUSÕES

A utilização da solução de dimetilsulfóxido e etilenoglicol no processo de vitrificação de embriões produzidos in vitro não prejudica a sua sobrevivência embrionária.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. PUGH, P.A.; TERVIT, H.R.; NIEMANN, H. Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine in vitro produced embryo following in straw- dilution, in vitro and in vivo following. *Animal Reproduction Science*. V.58,p. 9-22, 2000.
2. LAZAR, L.; SPAK, J.; DAVIS, V. The vitrification of in vitro fertilized cow blastocysts by the open pulled straw method. *Theriogenology*. V.54, p. 571-578, 2000.
3. MARTÍNEZ, A.G.; LAS HERAS, M.A.; MATOS, D.G.; FURNUS, C.; BROGLIATTI, G.; VALCÁRCEL, A. Vitrification of in vitro produced bovine embryos: in vitro and in vivo evaluations. *Animal Reproduction Science*. V.73, p.11-21, 2002.
4. KAIDI,S.; VANLANGENDONCKI, A.; MASSIP, S.; DESSY, F. Cellular alteration after dilution of cryoprotective solutions used for the vitrification of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology*. V.52, p. 515-525,1999.

Tabela 1 - Efeito de duas soluções de crioprotetores, sobre a re- expansão e eclosão de embriões desvitrificados e cultivados por 72 horas

Tratamentos	n	Embriões re- expandidos (%)	Embriões eclodidos (%)
Controle	35	95,3 <sup>a</sup>	83,6 <sup>a</sup>
EG + DMSO	37	88,5 <sup>a</sup>	67,4 <sup>a</sup>
EG + G	33	62,2 <sup>b</sup>	37,0 <sup>b</sup>

Valores com diferentes letras sobrescritas (a,b) dentro da mesma coluna, Diferiram significativamente (p< 0,05).

EG= etileno glicol

DMSO= dimetilsulfóxido

G= glicerol