

TESTE DE TOXICIDADE DE UMA SOLUÇÃO DE VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS (PIV) CONTENDO EGMME E DMSO

JANAÍNA FADRIQUE DA SILVA¹; BRUNA MION²; ELISÂNGELA MIRAPALHETA MADEIRA²; ARNALDO DINIZ VIEIRA²; THOMAZ LUCIA JUNIOR²; LIGIA MARGARETH CANTARELLI PEGORARO³

¹Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- EMBRAPA – nanafadrique@yahoo.com.br

²ReproPel, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas – brunamion@veterinaria.med.br; elisangelamadeira@yahoo.com.br; vieira_ad@yahoo.com.br; tomjr2004@yahoo.com.br ³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- EMBRAPA – ligia.pegoraro@embrapa.br

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões é uma tecnologia de reprodução assistida que visa à multiplicação de animais superiores geneticamente nos rebanhos. Consiste de três etapas: maturação *in vitro* dos oócitos obtidos (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV). A criopreservação de embriões produzidos pela PIV é fundamental para tornar esta tecnologia mais abrangente. Entretanto os embriões PIV apresentam uma menor crio-tolerância frente aos métodos de criopreservação tradicionais. O método que tem demonstrado melhores resultados é a vitrificação, que consiste em submeter os embriões a altas concentrações de crioprotetores com a finalidade de aumentar a viscosidade dos meios intra e extracelulares seguidas da imersão direta em nitrogênio líquido. Sendo assim, torna-se possível resfriar os embriões rapidamente desidratando-os, e passando-os do estado líquido ao estado vítrio (gel amorfo) sem a formação de cristais de gelo intra e extracelular (KASAI *et al.*, 1996). A solução crioprotetora mais utilizada nesta metodologia é composta de Glicerol (GLI), Etileno glicol (EG) e Dimetil Sulfóxido (DMSO).

O EG tem sido amplamente utilizado principalmente devido ao seu baixo peso molecular quando comparado a outros crioprotetores, proporcionando rápida entrada e saída na célula durante o período de equilíbrio e rehidratação (VOELKEL E HU, 1992). O etilenoglicol é o menos tóxico, seguido pelo glicerol e propilenoglicol (RUMPF *et al.*, 2004). Nesse contexto, o aperfeiçoamento destas biotécnicas, através da utilização de uma solução crioprotetora que forneça maior viabilidade embrionária se justifica. TAKAGI *et al.* (1994) verificando a viabilidade de embriões bovinos no descongelamento constatou que o Etilenoglicol mono metil éter (EGMME) não altera a viabilidade embrionária. Com isso o teste de toxicidade é o primeiro passo para a utilização do EGMME como uma nova solução crioprotetora.

O objetivo do trabalho foi verificar a toxicidade da solução crioprotetora composta por EGMME-DMSO e EG-DMSO, utilizando quatro grupos de exposição ao EGMME associado a 20% de DMSO ou a 15%, para a criopreservação de embriões bovinos.

2. METODOLOGIA

Para a produção *in vitro* dos embriões Bovinos foram executadas as seguintes etapas.

Maturação *In Vitro* - Como fonte de complexos cumulus ovócitos (CCOs) foram utilizados ovários bovinos coletados no abatedouro (Famile®). Os ovários foram transportados até o laboratório em garrafa térmica a temperatura de 24-35°C, contendo solução salina acrescida do antibiótico gentamicina. No laboratório os folículos com 3 a 8 mm de diâmetro foram puncionados com um 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 dos folículos 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. O líquido folicular (LF) sobrenadante foi centrifugado a 2000g por cinco minutos para posterior uso na manutenção dos CCOs até o início da seleção morfológica. Os CCOs selecionados foram os com grau 1 e 2 (DELOOS *et al.*, 1989) e foram lavados em TCM-hepes [TCM 199 + 10% de SFB] antes de serem transferidos para placa de maturação. Foram utilizados 3027 ovócitos oriundos de 523 ovários para a realização do teste de toxicidade. A maturação *in vitro* (MIV) foi realizada em placas de multi-poços (Nunc, Nunclon, Dn) em 400µl de meio (Bio Reprodução Anima®), 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.

Fecundação *In Vitro* - Ao final do período de MIV os CCOs foram transferidos para placa de fecundação *in vitro* (FIV) contendo 400µl meio de fecundação (Bio Reprodução Anima®), (PARRISH *et al.*, 1988) previamente estabilizado em estufa. 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.

Cultivo *In Vitro* - 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 (Bio Reprodução Anima®), suplementado com 5% de SFB e mantido sob óleo mineral. 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 (blastocistos) para uso nos tratamentos experimentais.

2.1 Teste de toxicidade do crioprotetor EGMME-DMSO X EG-DMSO

Os embriões foram homogeneamente distribuídos para constituição de seis grupos, totalizando 681 embriões. Um grupo controle sem crioprotetor (G0) e um grupo controle de exposição a solução de vitrificação (SV) composta por 20% de Etileno glicol (EG) + 20% de Dimetil Sulfóxido (DMSO) preconizada por VAJTA *et al.* (1997) e quatro grupos de exposição ao EGMME associado a 20% de DMSO ou a 15%, constituindo um grupo de exposição a 10% EGMME + 20% DMSO (G10); 15% EGMME + 20% DMSO (G15) e 20% EGMME + 20% DMSO (G20). Nesta etapa, o teste de toxicidade foi realizado de acordo com a metodologia de vitrificação que prevê uma fase de estabilização em uma solução de equilíbrio (SE = 50% da

concentração SV) durante 1,0 min antes da exposição à SV por 25 segundos (VAJTA *et al.*, 1997). Após o período de exposição às soluções, os embriões foram banhados em solução Aquecimento e Re-hidratação, em solução de sacarose, mediante banhos sequenciais de 5 min em (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 eclosão e re-expansão determinando a sobrevivência avaliada pela capacidade de evoluir em estágios de desenvolvimento, antes de passarem a placa de CIV, para cultivo suplementar e posterior avaliação da taxa de desenvolvimento em 24h.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas 6 rotinas com um total de 113 embriões, com uma média de 18.91 rendimento global por tratamento/rotina. Obteve-se uma taxa de clivagem dos embriões de 80,22% e uma taxa de desenvolvimento embrionário de 24,07%. No teste de normalidade a distribuição foi normal onde podemos realizar uma análise de variância, através do programa Statistix®. A variável avaliada foi à taxa de eclosão dos embriões após a exposição aos crioprotetores analisados, onde foram obtidas as seguintes médias de eclosão por tratamento nas 24hs, sendo demonstrado na tabela abaixo:

Tabela 1: Taxa De Re-expansão e Eclosão Dos Embriões Nas 24hs Após A Exposição Aos Crioprotetores

TRATAMENTO	MÉDIA RE- EXPANSÃO %	MÉDIA ECLOSÃO %	Total
T1 controle s/ criop.	53.04	34.10	87.14
T2 20% EG+20% DMSO	47.86	34.15	82.01
T3 20% EGMME+15% DMSO	44.18	35.76	79.94
T4 15% EGMME+15% DMSO	52.14	29.06	81.20
T5 15% EGMME+20% DMSO	47.76	30.30	78.06
T6 10% EGMME+20% DMSO	42.63	24.44	67.07

A partir desta **tabela**, foi possível observar que não houve diferença estatística ($P > 0.05$) entre as diferentes concentrações de crioprotetores, aos quais os embriões foram expostos. A toxicidade para as células não depende apenas das propriedades químicas dos crioprotetores, mas também do estágio de desenvolvimento embrionário (RUMPF *et al.*, 2005). Estudos relataram que os embriões PIV são mais sensíveis à criopreservação do que os produzidos *in vivo* e que a crio tolerância reduzida está associada ao alto conteúdo lipídico presente no citoplasma desses embriões (ABE *et al.*, 2002; MUCCI *et al.*, 2006). Embriões cultivados *in vitro* na ausência de SFB são mais criotolerantes que aqueles cultivados em meio contendo soro (SEIDEL JR., 2006), porém neste experimento foi utilizada uma concentração reduzida de soro durante o cultivo (5%). CABRITA *et al.* (2003) relataram que, devido à baixa toxicidade, o dimetilsulfóxido (DMSO) seria um bom crioprotetor para embriões. No entanto, segundo RODRIGUES *et al.* (2008), a elevada concentração de DMSO não pode ser tolerada pela maioria das células. FAN *et al.* (2009) em estudo para vitrificação de células endoteliais corneanas, verificou que o EG foi o melhor crioprotetor, em concentração de 52% na solução de

vitrificação, apresentando melhor resultado isolado do que em conjunto com os outros crioprotetores testados, entre eles o EGMME. No entanto, TAKAGI *et al.* (1994), verificou que o reaparecimento da blastocela e ampliação de blastocistos após 48hs não foram alterados em embriões congelados com EGMME 1,3M e com EG 1,8M, e as taxas de eclosão foram superiores em comparação aos outros crioprotetores testados.

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados encontrados podemos concluir que Etileno Glicol Monometil Éter possui semelhante resultado de sobrevivência dos embriões tanto em menor ou igual concentração, comparado com Etileno Glicol produto já utilizado associado ao DMSO como constituinte das soluções de vitrificação, o que nos remete uma possibilidade deste produto ser testado no processo de vitrificação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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. **Mol. Reprod. Dev.**, v.61, p.57-66, 2002.
- CABRITA E. et al., Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*), **Cryobiology** **47**, 204–213, 2003.
- DE LOOS F. et al., T.A.. Morphology of immature bovine oocytes, **Gamete Res.**, v.24, p.197-204, 1989.
- FAN W.; MA X.; GE D. et al., Cryoprotectants for the vitrification of corneal endothelial cells. **Cryobiology** **58**, 28-36, 2009.
- KASAI, M., Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 42, p. 67-75, 1996.
- MUCCI N.; ALLER J.; KAISER G.G.; HOZBOR F. et al., Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, **65**:1551– 62, 2006.
- PARRISH J.J. et al., Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen, **Theriogenology** **25**, 591-600, 1986.
- PARRISH J.J., SUSKO-PARRISH J., WINER M.A. and FIRST N.L., Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction** **38**, 1171-1180, 1988.
- RODRIGUES. P J.; PARAGUASSÚ-BRAGA F.H.; CARVALHO L. et al., Evaluation of trehalose and sucrose as cryoprotectants for hematopoietic stem cells of umbilical cord blood, **Cryobiology** **56**, 144–151, 2008.
- RUMPF R.; BRANDÃO D.; PEREIRA D. et al.; **Vitrificação de embriões produzidos in vitro [Workshop]**, Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004.
- RUMPF R.; BEM A.; PEIXER M., et al., **Trasferência e micromanipulação de embriões nas espécies bovinas e eqüinas [Manual]**, Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005.
- Statistix®. Statistix 9 analytical software. Tallahassee, FL, USA. 2008.
- SEIDEL JR., Modify oocytes and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenology**, v.65, p.228-235, 2006.
- VAJTA G.; HOLM P.; GREVE T.; CALLESEN H., The submarine incubation system, a new tool for in vitro embryo culture: A technique report. **Theriogenology** **48**, 1379-1385, 1997.
- VOEKEL, A.; HU, Y.X.. Direct transfer of frozen thawed bovine embryos. **Theriogenology**, v.37, p.23-37, 1992.