

TESTE DE TOXICIDADE DE UM NOVO COMPONENTE PARA SOLUÇÃO DE VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS

MIRIANE MENDES PEREIRA¹; ELISÂNGELA MIRAPALHETA MADEIRA²; BRUNA MION¹; LIGIA MARGARETH CANTARELLI PEGORARO¹; ARNALDO DINIZ VIEIRA²; THOMAZ LUCIA JUNIOR²

¹Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- EMBRAPA – mirimendes@hotmail.com;
brunamion@veterinaria.med.br; ligia.pegoraro@embrapa.br

²ReproPEL, Faculdade de Veterinária– elisangelamadeira@yahoo.com.br ;;
tomjr2004@yahoo.com.br; vieira_ad@yahoo.com.

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos vem-se tornando uma prática promissora, e, certamente, terá importante papel na aplicação comercial de programas de melhoramento genético. Entretanto, para que a PIV possa ser amplamente difundida é essencial que os embriões possam ser estocados em nitrogênio líquido (KHURANA e NIEMANN, 2000). Embora tenha ocorrência de um progresso nas porcentagens de embriões que são capazes de desenvolvimento normal, existe um menor número destes *in vitro* do que naqueles produzidos *in vivo* (KHURANA E NIEMANNH, 2000; TAKAHASHI, 2000.; LONERGAN, 2003). Várias diferenças foram mostradas entre esses dois tipos de embriões, como número de células, tolerância à criopreservação e anormalidades cromossômicas (VIUFF, 2000; WARD, 2001; RIZOS, 2003).

A vitrificação tornou-se uma alternativa para criopreservação de células e de tecidos. Recentemente, seu sucesso tem aumentado às expectativas em diversas áreas de conhecimento envolvidas com a preservação de gametas e embriões (KULESHOVA E LOPATA, 2002). As interações entre a composição bioquímica das células e as propriedades das soluções crioprotetoras estão associadas à presença de polímeros, açúcares ou outras macromoléculas sintéticas e/ou biológicas (TITTERINGTON, 1995), aos métodos de desidratação celular e ao tipo de crioprotetor (KULESHOVA, 1999).

O desafio para se obter êxito na criopreservação de embriões consiste em estabelecer-se uma adequada sequência de eventos envolvendo composição, passando pelo tempo de desidratação celular e o coeficiente de permeabilidade com a finalidade de evitar que as injúrias tóxicas e/ou osmóticas atinjam a estrutura celular. Pesquisas sobre técnicas de criopreservação incluíram estudos sobre o tipo e a concentração de crioprotetores, resfriamento e de congelamento, semeadura e temperaturas em queda, temperaturas de descongelamento e as taxas e métodos de remoção de crioprotetor (FAHNING e GARCIA, 1992), porém este é um assunto que deve ter um constante estudo e pesquisa para aumentar a viabilidade do embrião após o processo de criopreservação.

O objetivo do seguinte estudo é comparar a toxicidade do Etileno Glicol (EG) e Etileno Glicol MonoMetil Eter (EGMME) em diferentes proporções de exposição, com finalidade de obter um melhor método de criopreservação, visando obter melhores taxas de sucesso no reaquecimento dos embriões.

2. METODOLOGIA

Produção *in vitro* dos embriões

Maturação *in Vitro* (MIV)- 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 ovários foram lavados e solução salina e 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 de grau 1 e 2 (DELOOS, 1989) e foram lavados em TCM-hepes [TCM 199 + 10% de Soro Fetal Bovino] antes de serem transferidos para placa de maturação.

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.

Fertilização *In Vitro* (FIV)- Ao final do período de MIV os CCOs foram transferidos para placa de FIV contendo 400µl meio de fecundação (Bio Reprodução Anima®), (PARRISH, 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, 1986) com modificações. Após a seleção, foi realizada a inseminação (dia zero, D0) utilizando uma dose inseminante de 1,0 x 10⁶ espermatozoides/mL por 18 a 22 horas sob as mesmas condições da MIV.

Cultivo *In Vitro* (CIV) - 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®), (HOLM, 1994) 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, 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.

Teste de toxicidade do crioprotetor EGMME X EG

Em embriões obtidos em D7 foi realizada a seleção morfológica (LINDNER e WRIGTH, 1983) e distribuição homogênea dos embriões nos estágios de blastocisto e blastocisto expandido classificados como graus de 1 e 2 entre os tratamentos de exposição ou não às diferentes concentrações de crioprotetores. Serão constituídos quatro grupos: Controle sem crioprotetor ; 10% EGMME (T1); 15% EGMME (T2) e 20% EG (T3). O teste foi realizado de acordo com (SOMMERFELD e NIEMANN, 1999), mantendo os embriões expostos aos tratamentos durante 5 min a 39°C antes da 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 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, que foi avaliada pela capacidade do embrião evoluir de estágio de blastocisto e blastocisto expandido para (blastocisto eclodido).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No seguinte trabalho foram utilizados 4141 oócitos oriundos de 850 ovários, com uma taxa de clivagem de 70.05% e taxa de desenvolvimento de 20.65% , obtendo se assim um total de 704 embriões para os testes. Foram feitas doze rotinas de PIV, e a média de embriões foi de 176, e a de embriões utilizados por tratamento/rotina foi de 14.6. No teste de normalidade a distribuição foi normal onde podemos realizar uma análise de variância, através do programa Statistix®.

A Tabela 1 demonstra a média de embriões que demonstraram a capacidade de manter seu desenvolvimento e evoluir para o estágio de blastocisto eclodido após exposição às diferentes concentrações dos crioprotetores.

Tabela 1: Média de eclosão dos embriões após a vitrificação com as diferentes concentrações dos crioprotetores.

Tratamento	Média de Eclosão
Controle	33,41 ^a
T1 (10%EGMME)	32,92 ^a
T2 (15% EGMME)	25,08 ^{ab}
T3 (20% EG)	17,05 ^b

Entre os crioprotetores intracelulares mais utilizados podem ser citados dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, metanol e etilenoglicol (EG). Entre eles, o etilenoglicol se destaca por apresentar baixa toxicidade e baixo peso molecular, o que facilita sua rápida permeação para o interior das células durante um curto período de exposição (KASAI, 1990). A exposição dos embriões a uma elevada concentração de etileno glicol, não causa efeitos deletérios decorrentes de toxicidade, como observado por Cortês e Rodrigues, (2000), ao realizarem teste de toxicidade com embriões de camundongo à solução de 9,0 M de EG seguida do cultivo in vitro. Entretanto, esse crioprotetor apresentou baixas taxas de eclosão quando comparado aos outros tratamentos utilizados nesse experimento.

O Etileno monometil éter é amplamente usado como solvente industrial (ROWE,1982) e (NIOSH, 1983), entretanto não há dados na literatura de resultados na criopreservação de embriões. As taxas de eclosão adquiridas com o uso desse

crioprotetor não apresentaram diferença estatística do controle (sem crioprotetor) na concentração de 10% e foram melhores que as taxas obtidas com o uso do etilenoglicol.

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados encontrados podemos concluir que Etileno Glicol Monometil Éter possui uma menor toxicidade em menor concentração do que o Etileno Glicol, produto já utilizado como constituinte das soluções de vitrificação, sugerindo que este produto seja testado para tal procedimento para verificar sua capacidade físico-química frente ao processo de vitrificação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CORTÊS, P. C. G.; RODRIGUES, J. L. Sobrevivência de blastocistos *Mus domesticus domesticus* vitrificados em meio contendo 9,0 M de etileno glicol na presença de sacarose. **Ciência Rural**, v. 30, p. 461-467, 2000.
- DE LOOS F.; VAN VLIET, C.; VAN MAURIK, P. KRUIP T.A. 1989. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Res.**, v.24, p.197-204,
- FAHNING, M.L., GARCIA, M.A., 1992. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. **Cryobiology** 29, 1–18.
- KASAI, M.; HAMAGUCHI, Y.; ZHU, S.E.; MIYAKE, T.; SAKURAI, T.; MACHIDA, T. High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a simple method. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 1042-1046, 1992b.
- KHURANAH NK, NIEMANN H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. **Theriogenology** 2000;54:741–56.
- KULESHOVA, L.L.; LOPATA, A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. **Fertility and Sterility**, v. 78, p. 449-454, 2002.
- KULESHOVA, L.L.; MAC FARLANE, D.R.; TROUNSON, A.O.; SHAW, J.M. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. **Cryobiology**, v. 38, p. 119-130, 1999.
- LINDNER M. G. & WRIGHT R.W. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. **Theriogenology** 20, 407-416.
- LONERGAN, P., RIZOS, D., GUTIERREZ-ADAN, A., FAIR, T., BOLAND, M.P., 2003a. Oocytes and embryos quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reprod. Dom. Anim.** 38, 259–267.
- NIOSH. The glycol ethers, with particular reference to 2-methoxyethanol and 2-ethoxyethanol: Evidence of adverse reproductive effects. **DHHS (NIOSH) publication.** 1983; 83-112.
- PARRISH J.J., SUSKO-PARRISH J., WINER M.A. AND FIRST N.L. (1988) Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction** 38, 1171-1180.
- PARRISH J.J., SUSKO-PARRISH J.L., LEIBFRIED-RUTLEDGE M.L., CRITSER E.S., EYESTONE W.H. AND FIRST N.L. (1986) Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology** 25, 591-600.