

Criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*

Cryopreservation of *in vitro* produced bovine embryos

Raquel Varella Serapião,* Wanderlei Ferreira de Sá,** Ademir de Moraes Ferreira,**
Luiz Sérgio de Almeida Camargo,** Silvia Graciela Torres Gilardi,**** João Henrique Moreira Viana,**
Alessandra de Almeida Ramos,***** Luiz Altamiro Garcia Nogueira***

Resumo

Avaliou-se o processo de congelamento lento utilizando etilenoglicol 1,8 M, quanto à taxa de eclosão de blastocistos, rompimento de zona pelúcida e extrusão celular. Blastocistos de sete dias classificados como de graus I e II foram distribuídos em dois tratamentos: T1(embriões a fresco) e T2 (congelamento lento com etilenoglicol 1,8 M). Realizou-se o congelamento em aparelho automático com curva de -6° a -35°C e queda de 0,5°C/min. Os embriões congelados foram estocados em nitrogênio líquido. Imediatamente após o descongelamento os blastocistos foram cultivados individualmente em gotas de 100 µl do meio Glasgow BHK 21, onde permaneceram por 72 horas. Os embriões do T1 também foram submetidos a essas condições. A taxa de eclosão foi maior no T1 (P<0,01), assim como as de rompimento de zona pelúcida e extrusão celular foram maiores no T2 (P<0,01). Concluiu-se que a criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*, em etilenoglicol 1,8M, resultou em taxas de eclosão satisfatórias, mesmo provocando danos como lesão de zona pelúcida e extrusão celular.

Palavras-chave: bovino, embrião, fertilização *in vitro*, criopreservação.

Abstract

The slow freezing process with ethylene glycol 1,8M was evaluated, especially the blastocysts hatched, fractured of zona pellucida and cellular extrusion rates. The 7 days blastocysts with grades 1 and grade 2, was randomly distributed into 2 treatments: treatment 1(fresh embryos) and treatment 2 (frozen embryos). The process was performed in an automatic machine with graduation of -6 to -35°C, 0,5/min. The embryos of both treatments were storage in liquid nitrogen. After thawing, they were cultivated into 100 µl drops of Glasgow BHK21 medium by 72 hours. The hatching rate was high in the treatment 1(p<0,01), on the other hand the fractured of zona pellucida and cell extrusion rate were high in the treatment 2 (p<0,01). The cryopreservation of bovine embryos derived *in vitro* with ethylene glycol 1,8M resulted satisfactory hatching rates, even with problems as the zona pellucida injury and cell extrusion.

Keywords: bovine, embryo, *in vitro* fertilization, cryopreservation.

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). A criopreservação permite o aproveitamento de receptoras com cio natural, evitando a manutenção de grandes rebanhos de animais; além do transporte de embriões congelados apresentar um menor custo e possibilitar a programação de nascimentos adequada ao manejo de cada fazenda. Oferece ainda condições de se armazenar embriões enquanto se realiza

teste de progênie, e viabiliza a criação de bancos de embriões de animais geneticamente superiores ou em extinção.

Durante os processos de congelamento e descongelamento, ocorrem danos na estrutura celular que são provenientes de fatores como a formação intracelular de cristais de gelo e a diminuição da temperatura antes do congelamento (Zeron et al., 1999). O congelamento lento visa à manutenção do equilíbrio entre as várias fontes de danos, usando-se uma baixa concentração de crioprotetores e controlando a formação de gelo (Vajta, 2000). Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência do processo de congelamento lento, utilizando etilenoglicol 1,8 M, na criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*, verificando sua viabilidade após o

* Mestre em Medicina Veterinária. Rua Aristides Caire, 39 casa 7, Rio de Janeiro, RJ. 20771-000; e-mail: serapis@zipmail.com.br

** Pesquisador Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento, 610, Juiz de Fora, MG. 36038-330;

*** Professor Doutor- Faculdade de Veterinária, UFF. Rua Vital Brazil Filho, 64, Niterói, RJ. 24230-340

**** Mestre em Medicina Veterinária. Rua Leopoldo Miguez, Rio de Janeiro, RJ.

***** Estudante de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais

descongelamento, de acordo com as taxas de eclosão, lesão de zona pelúcida e extrusão celular.

Material e métodos

Oócitos recuperados a partir de ovários coletados de fêmeas bovinas abatidas em matadouro foram selecionados e maturados *in vitro* em meio TCM-199 (Gibco) acrescido de 10% de soro de vaca em cio e 20 mg/ml de FSH, por 24 horas. Após a maturação, os oócitos foram fertilizados *in vitro* com sêmen congelado. Para separação de espermatozoides vivos e mortos foi utilizado o método de *swim up*. A fecundação *in vitro* foi realizada em gotas de 100 µl de meio Fert-Talp acrescido de heparina, cobertas com óleo mineral, com concentração espermática de $2,0 \times 10^6$ espermatozoides/ml por período aproximado de 22 horas.

Os possíveis zigotos foram cultivados em meio CR2aa, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), juntamente com suas células do *cumulus*, em gotas de 50 µl cobertas com óleo mineral. O meio foi renovado pela metade 48 horas após o início do cultivo. Todas as etapas foram realizadas em estufa incubadora a 38,8°C, 95% de umidade e 5% de CO₂.

Blastocistos de sete dias classificados como de graus I e II, segundo Kennedy et al. (1983) foram divididos em dois tratamentos: T1 (embriões a fresco) e T2 (etilenoglicol 1,8M). Blastocistos do T2 foram lavados em uma solução de DPBS acrescida de BSA 0,4% e posteriormente desidratados em solução de etilenoglicol 1,8 M em PBS + 0,4% de BSA, envasados em palhetas de 0,25 ml e transferidos para o congelador automático de embriões com curva de -6 a -35°C e queda de 0,5°C por minuto. A indução da cristalização (*seeding*) foi realizada cinco minutos após a estabilização da temperatura inicial da curva. No descongelamento, cada palheta foi mantida 10 segundos no ar e 20 segundos em banho-maria a 35°C. Os embriões de ambos os tratamentos foram lavados em DPBS acrescida de BSA 0,4% e em meio Glasgow BHK21 e distribuídos individualmente em gotas de 100 µl do mesmo meio condicionado com monocamada de células da granulosa. O cultivo foi realizado por 72 horas. As taxas de eclosão, lesão da zona pelúcida e extrusão celular foram avaliadas 72 horas após o início do cultivo.

Os parâmetros analisados foram taxas de eclosão de blastocistos, lesão de zona pelúcida e extrusão celular. Diferenças entre os tratamentos foram avaliadas pela análise de tabela de contingência utilizando o teste de qui-quadrado.

Resultados e discussão

Dos 312 blastocistos produzidos, apenas 217 foram utilizados no experimento (Tabela 1), sendo 80 a fresco e 137 congelados. Blastocistos iniciais, blastocistos eclodidos e blastocistos com forma e coloração heterogênea em alguns ou vários blastômeros, presença evidente de células no espaço perivitelínico e na blastocele, confusa diferenciação celular e forma indefinida, não foram utilizados. Hasler et al. (1997) argumentam que quanto menor o estágio de desenvolvimento do embrião, menor a taxa de sobrevivência após o descongelamento. Sendo assim, os blastocistos iniciais são mais sensíveis do que os de estágio mais avançado. A zona pelúcida funciona como uma proteção para o embrião a qual

quer dano que venha a sofrer. Partindo deste princípio, os blastocistos eclodidos se tornam muito mais vulneráveis aos processos de criopreservação. Rodrigues et al. (1995) demonstraram que embriões PIV oriundos do 7º e 8º dias pós-fecundação, apresentaram uma taxa de sobrevivência pós-descongelamento maior comparada à dos dias 6, 9 e 10, utilizando etilenoglicol 1,8M, e sugeriram que o aumento da sensibilidade destes embriões a crioinjúrias pode estar relacionado com a morfologia, metabolismo e fisiologia celular.

Tabela 1 – Estruturas obtidas na PIV de embriões bovinos

	Total	% do Total
Nº de Ovários	354	-
Nº de Oócitos	966	100,0
Nº de Clivados	581	60,2
Nº de Blastocistos	312	32,2
Embriões Congeláveis	217	22,5
Blastocistos Iniciais	43	4,5
Blastocistos Eclodidos	5	0,5
Descartados	47	4,9

A taxa de produção de blastocistos do presente experimento está de acordo com o resultado de vários autores (Rodrigues e Garcia, 2000 e Rizos et al., 2001), embora um pouco inferior aos achados de Dayan et al. (2000).

As taxas de embriões eclodidos, lesão de zona pelúcida e extrusão celular após o descongelamento estão representados na Tabela 2. Dos 137 blastocistos congelados, 36 embriões foram perdidos durante os procedimentos de congelamento e descongelamento. Essa perda pode estar relacionada com a destruição total das estruturas pelo processo de congelamento, propriamente, dito e a aderência dos embriões à parede interna das palhetas. A viabilidade de embriões submetidos aos processos de criopreservação está diretamente relacionada com o tempo de equilíbrio, concentração e diluição do crioprotetor utilizado, além dos métodos de congelamento (Nowshari et al., 1994). A extensão das lesões causadas pela criopreservação depende de fatores que incluem tamanho, forma, permeabilidade, qualidade e sensibilidade do embrião. Esses fatores são determinados pela espécie, estágio e origem dos embriões (Vatja, 2000).

Tabela 2 – Avaliação do cultivo *in vitro* de blastocistos a fresco e criopreservados em etilenoglicol 1,8 M, após 72 horas

	Tratamento 1*	Tratamento 2**
Total	80 (100,0 %)	101 (100,0%)
Degenerados	16 (20,0 %)	62 (61,4%)
Eclodidos	64 (80,0%) ^a	39 (38,6%) ^b
Zona Pelúcida Rompida	0 (0,0 %) ^a	7 (6,9%) ^b
Presença de Células de Extrusão	4 (5,0%) ^a	39 (38,6%) ^b

* Embriões a fresco

** Embriões Congelados

^{a,b} Colunas com diferentes letras diferem entre si (P <0,01).

Os embriões submetidos à criopreservação apresentaram taxa de lesão de zona pelúcida após descongelamento e reidratação maior ($P < 0,01$) no T2, caracterizando a alteração das propriedades físicas da zona pelúcida. Este tipo de lesão normalmente ocorre durante a etapa final da curva de congelamento (Vatja, 2000). Embriões PIV apresentam maior fragilidade da zona pelúcida (Abe et al., 1999), caracterizada por uma susceptibilidade aumentada à digestão enzimática (Khurana e Niemann, 2000). Já a lesão na zona pelúcida pode ter levado a um aumento do choque osmótico, proporcionando uma ação deletéria aos embriões na reidratação, por permitir a entrada de água muito rapidamente, pois a zona pelúcida funciona como proteção para os blastômeros.

A extrusão celular também foi maior ($P < 0,01$) no T2, provavelmente pelo enfraquecimento das junções intercelulares, acarretado pelo processo de criopreservação (Dobrinsky, 1996). Estes danos são mais freqüentes no início do processo de congelamento quando há alteração nos lipídios, microfilamentos e microtúbulos (Vatja, 2000). De acordo com os achados de Fair et al. (2001), embriões criopreservados apresentam uma grande redução na rede de conexão intercelular. Embriões PIV apresentam um grau de compactação celular inferior aos embriões produzidos *in vivo*, o que está associado à pouca formação de junções *gap*. Essas diferenças no citoesqueleto entre os embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* é, em parte, explicada pela diferença na expressão gênica (Fair et al., 2001). Outra hipótese é que a presença de células de extrusão está relacionada com a conservação dos embriões em nitrogênio líquido, o que pode causar uma grave desnaturação das funções e organelas intracelulares e destruição da citoarquitetura central do embrião (Dobrinsky, 1996).

A taxa de eclosão no T2 foi inferior à do T1 ($P < 0,01$), resultado semelhante aos demonstrados por Sommerfeld e Niemann (1999). Entretanto, Sá et al. (2001) observaram que o etilenoglicol 1,8 M não afetou o potencial de desenvolvimento

embrionário *in vivo*. Embriões PIV são mais sensíveis a temperaturas abaixo de 14°C, comparados com os produzidos *in vivo*. Sugere-se que esta sensibilidade esteja associada à redução de densidade dos embriões, resultante das altas concentrações de lipídios (Pollard e Leibo, 1994). Dobrinsk et al. (1996) sugerem que o aumento do volume de lipídios encontrado nos embriões PIV é decorrente da suplementação do meio de cultivo com soro fetal. Kaidi et al. (2001) avaliaram o efeito da criopreservação na massa celular interna e número de células do trofoderma, assim como o consumo de glicose, piruvato e oxigênio em embriões, constatando a diminuição dos parâmetros imediatamente após o descongelamento e 72 horas de cultivo. Em concordância, Khurana e Niemann (2000) também sugerem que aumento da atividade glicolítica nos embriões criopreservados caracteriza a resposta ao estresse causado pelo congelamento/descongelamento. Estes fatores podem estar relacionados com a menor sobrevivência de blastocistos do T2 em relação aos do T1.

Os embriões descongelados que não eclodiram entraram em processo de degeneração, apresentando forma indefinida e evidente desorganização celular, o que impossibilitava a identificação de seu estágio de desenvolvimento (Dobrinsk, 1996; Fair et al., 2001). A degeneração destes embriões pode ter ocorrido em função do crioprotetor não ter saído rapidamente dos blastômeros como esperado, ficando maior tempo em contato com as estruturas celulares, acarretando maiores prejuízos a estes blastocistos, já que avaliados logo após o descongelamento (Shaw et al., 1997; Kuleshova et al., 1999).

Conclusão

A criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*, utilizando etilenoglicol 1,8 M, resulta em taxas de eclosão satisfatórias, apesar do aumento do rompimento de zona pelúcida e extrusão celular dos embriões e dos danos ocorridos no citoesqueleto.

Referências

ABE, H.; OTOI, T.; TACHIKAWA, S. et al. Fine Structure of bovine morulae and blastocysts *in vivo* and *in vitro*. *Anat. Embryol. (Berl)*, v. 199, n. 6, p. 516-527, 1999a.

DAYAN, A.; WATANABE, M. R.; WATANABE, Y. F. Fatores que interferem na produção comercial de embriões FIV. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*, v. 28, p. 181-185, 2000.

DOBRINSKY, J. R. Cellular Approach to Cryopreservation of Embryos. *Theriogenology*, v. 45, p. 17-26, 1996.

FAIR, T.; LONERGAN, P.; DINNYES, A. et al Ultrastructure of Bovine Blastocysts Following Cryopreservation: Effect of Method of Blastocyst Production. *Molecular Reproduction and Development*, v. 58, p. 186-195, 2001.

HASLER, J. F.; HURTGEN, P. J.; JIM, Z. Q. et al. Survival of IVF-derived bovine embryos frozen in glycerol or ethylene glycol. *Theriogenology*, v. 48, p. 563-579, 1997.

KAIDI, S.; BERNARD, S.; LAMBERT, S.; et al. Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced *in vitro*. *Biology of Reproduction*, v. 65, n. 4, p. 1127-1134, 2001.

KENNEDY, C. G.; BOLAND, M. P.; GORDON, I. The effects of embryo quality of freezing on subsequent development of thawed low embryo. *Theriogenology*, v. 19, p. 823-832, 1983.

KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Effects of cryopreservation on glucose metabolism and survival of bovine morulae and blastocysts derived "in vitro" or "in vivo". *Theriogenology*, v. 54, p. 313-326, 2000.

KULESHOVA, L. L.; MACFARLANE, D. R.; TROUNSON, A. O.; SHAW, J. M. Sugars exerts a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solution and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology*, v. 38, p. 119-130, 1999.

NOWSHARI, M. A.; NAYUDU, P. L.; HODGES, J. K. Effects of cryoprotectant concentration, equilibration time and thawing procedure on survival and development of rapid frozen-thawed matured mouse oocytes. *Theriogenology*, v. 42, p. 1193-1204, 1994.

POLLARD, J. W.; LEIBO, S. P. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology*, v. 41, p. 101-106, 1994.

RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND, M.P. et al. Effect of culture on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. *Theriogenology*, v. 56, p. 1-16, 2001.

RODRIGUES, C. F. M.; GARCIA, J. M. Fecundação "in vitro" em bovinos; aplicação comercial. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*, v. 28, p. 186-187, 2000.

RODRIGUES, J. L.; ULLAH, N.; DÖPKE, H. H.; NIEMANN, H. Viability of IVMFC derived bovine embryos following freezing in 3,6M ethylene glycol as cryoprotective additive. In: X REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, 10., São Paulo. *Proceedings...* Jaboticabal: UNESP Jaboticabal, 1995. *ARS Veterinária*, v. 11, n. 2, p. 60-67, 1995.

SÁ, W. F.; VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M. et al. Uso de glicerol em diferentes concentrações de etilenoglicol na congelação de embriões da raça Holandesa. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA (CONBRAVET), 2001, Salvador – BA. *Anais da Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária*, Brasília, DF: Conselho Federal de Medicina veterinária, p. 251, 2001.

SHAW, J. M.; KULESHOVA, L. L.; MAC FARLANE, D. R. et al. Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll or Dextran. *Cryobiology*, v. 35, p. 219-229, 1997.

SOMMERFELD, V.; NIEMANN, H. Cryopreservation of bovine "in vitro" produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology*, v. 38, p. 95-105, 1999.

THOMPSON, J. G.; ALLEN, N. W.; MCGOWAN, L. T. et al. Effect of delayed supplementation of fetal calf serum to culture medium on bovine embryo development "in vitro" and following transfer. *Theriogenology*, v. 49, p. 1239-1249, 1998.

VAJTA, G. Criopreservação de ovócitos e embriões bovinos produzidos "in vitro" *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*, v. 28, p. 85-94, 2000.

ZERON, Y.; PEARL, M.; BOROCHON, A. et al. Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature oocytes. *Cryobiology*, v. 38, p. 35-42, 1999.