



DIFERENTES MÉTODOS DE CONGELAÇÃO DE EMBRIÕES DE VACAS NELORES PRODUZIDOS *in vitro* (CONGELAMENTO TRADICIONAL X VITRIFICAÇÃO)

Bárbara Fachini Agostinho¹; Carla Patrícia de Souza¹; Fábio Luiz Bim Cavaliere²; Luiz Paulo Rigolon²; Milena Seko³

RESUMO: O experimento foi desenvolvido no Centro de Biotecnologia da Reprodução (BIOTEC). Foram realizadas punções foliculares em 10 vacas doadoras. Os animais tiveram acesso à água e sal mineral *ad libitum*. Os oócitos foram quantificados e classificados como bom, regular e ruim. Os oócitos foram submetidos ao processo de fertilização *in vitro*, o sêmen utilizado foi de touro da raça Nelore, foi realizado centrifugação em gradiente percoll (45 e 90), durante 30 segundos. Após cultivo, foram realizadas duas outras avaliações, no estágio de mórula (8 células) e blastocisto inicial. Os embriões obtidos foram divididos em dois tratamentos: Tratamento 1 – Método de congelamento tradicional e Tratamento 2 – Método de vitrificação. Após o congelamento os embriões foram descongelados e levados à incubadora, com atmosfera contendo 20% CO₂ em ar, com máxima umidade, foram observados após 24 horas quantos embriões de cada tratamento eclodiram. Sendo que no Tratamento 1 eclodiram 15 (22,7%) embriões e no Tratamento 2 eclodiram 22 (33,3%). Não havendo diferença estatística. Concluímos que podemos utilizar a técnica de vitrificação para o congelamento de embriões bovinos.

PALAVRAS CHAVE: Blastocisto; Fertilização *in vitro*; Oócitos

1 INTRODUÇÃO

Atualmente uma das ferramentas importantes para a produção animal é a Fertilização *in vitro* (FIV). O desenvolvimento dessa técnica, deve-se aos avanços da biotecnologia, a qual englobam demais métodos que envolvem desde inseminação artificial até clonagem.

Progressos genéticos têm sido obtidos pelo congelamento dos embriões, cuja os principais objetivos são: conservar os embriões excedentes; utilização eficiente de receptoras; permitir programar os nascimentos considerando o manejo da fazenda ou datas de exposições e leilões; entrada e saída de material genético em rebanhos ou em países com menores custos, tramitações e riscos de transmissão de doenças do que animais comercializados em pé; além de permitir a preservação de espécies com risco de extinção.

Neste processo, os embriões são desidratados e pré-congelados evitando formação de cristais que lesionam os blastômeros. A desidratação é parcial e o meio de congelamento possui crioprotetores. Os crioprotetores são substâncias de baixo peso

¹ Acadêmicas do Curso de Medicina Veterinária. Departamento de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá – PR. Bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica do PROBIC – Cesumar. baby@wnet.com.br

² Docentes do CESUMAR. Departamento de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá – PR. fabiobim@cesumar.br; rigolon@wnet.com.br

³ Funcionária do Laboratório BIOTEC – CESUMAR. Departamento de Biotecnologia em Reprodução Animal do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá – PR. biotec@cesumar.br

molecular que podem ou não penetrar nas células através da membrana plasmática tendo como ação estabilizar as membranas celulares, retirar água intracelular e reduzir a concentração de eletrólitos do meio extracelular.

Há diversas técnicas de congelamento de embriões, dentre as quais encontram-se: congelamento normal, vitrificação e congelamento ultra-rápido.

No congelamento normal os embriões alcançam o equilíbrio osmótico antes da queda de temperatura, mantendo-o até o resfriamento, que é rápido. Antes do congelamento usa-se crioprotetores evitando formar cristais (Schneider/ Mazur, 1986), que são retirados após, evitando o choque osmótico.

A vitrificação tem sido usada há vários anos para conservar células, tecidos e órgãos, sendo recentemente utilizada na conservação de embriões e ovócitos (Rall e Fahy, 1985; Nakagata, 1989). Trata-se de um processo termodinâmico, onde um fluido incrementa sua viscosidade durante o resfriamento, adquirindo propriedades de um sólido (Bautista e Kanagawa, 1998).

Nesse processo não formam cristais sendo que o fluido passa para o estado sólido não estruturado similar ao vidro. O processo se faz mediante imersão direta em nitrogênio líquido necessitando empregar uma ou mais soluções de crioprotetores permeáveis que podem ser tóxicas para as células (Palasz e Mapletoft, 1996).

Estudos se basearam em incorporar distintas associações de crioprotetores de baixa toxicidade ao meio de vitrificação, com o objetivo de melhorar os resultados dessa técnica (Cabodevilla et al., 1997).

Pode-se optar pelo congelamento de embriões a fim de obter progressos genéticos a baixo custo e um melhor controle de enfermidades. O objetivo desse projeto foi a avaliação dos dois métodos de congelamento de embriões bovinos produzidos *in vitro* (Congelamento tradicional x vitrificação). Sendo que o resultado de congelamento está condicionado pela qualidade do embrião desde a coleta, congelamento e desenvolvimento embrionário. Portanto, o presente estudo teve como interesse encontrar condições ótimas para cada situação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento realizou-se no Centro de Biotecnologia da Reprodução (BIOTEC), utilizando 10 vacas mestiças, desverminadas e adaptadas em grama estrela, recebendo o concentrado, tendo acesso à água e sal mineral *ad libitum*. Após 30 dias os ovários das vacas foram aspirados padronizando as ondas foliculares. Foram sincronizadas com implantes subcutâneos auriculares contendo 5mg de Norgestomet (Crestar® – Intervet), estando por 5 dias. Realizou-se mais 6 aspirações em cada animal, com intervalo de 15 dias, obtendo oócitos suficientes para fecundação *in vitro*. Os oócitos foram quantificados e classificados como bom, regular e ruim conforme descrito por Leibfried & First (1979): de qualidade 1, *cumulus* completo; de qualidade 2, *cumulus* parcial; e de qualidade 3, *cumulus* expandido. A maturação ocorreu em TCM199 com sais de Earles, glutamina e NaHCO₃ com 10% de soro fetal bovino (SFB), 22 µg/mL piruvato, 50 µg/mL de gentamicina, 0,5 µg de FSH/mL, 50 µg de LH/mL e 1µg de estradiol/mL, mantidos em estufa, a 38,5°C, 5% de CO₂ em ar com máxima umidade por 22-24hs. Nesse tempo CCOs permaneceram em microgotas de 100 µL de meio de maturação coberta por óleo mineral. A fecundação ocorreu em 100 µL de meio TALP com 10 µg/mL de heparina, 22 µg/mL de piruvato, 50 µg/mL de gentamicina, albumina sérica bovina - BSA (s/ ácidos graxos), solução de PHE (2 µM de penicilina, 1 µM de hipotaurina e 0,25 µM de epinefrina). O sêmen usado foi de touro da raça Nelore, descongelado em banho-maria a 35° C. Para seleção dos espermatozóides e remoção de diluidores e plasma seminal, centrifugou-se (30 seg) em gradiente percoll (45 e 90). Utilizou-se 2x10⁶ spz/mL e após 30

min de incubação, os CCOs foram transferidos para as microgotas (20 óocitos/gota), onde permaneceram por 10 à 18 hs, a 38,5° C, em atm 5% de CO₂.

O cultivo ocorreu por 18hs pós-inseminação, em incubadora. Realizou-se 2 avaliações, estágio de mórula (8 cels) e blastocisto inicial, totalizando 132 embriões viáveis. Após dividiu-se os embriões em 2 tratamentos: T1- Método Tradicional (66 embriões) e T2- Vitriificação (66 embriões). Em seguida foram descongelados voltando para incubadora, notando com 6,12 e 24 horas se os embriões chegaram a blastocisto eclodido.

O delineamento experimental foi totalmente casualizado e os animais distribuídos em 2 tratamentos de acordo com o modelo estatístico apresentado: $Y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$, onde μ = média; t_i = tratamento i (embriões eclodidos do método tradicional e vitriificação); e_{ij} = erro associado a cada observação. Para a análise foi usado Software GLIM 4.0 distribuição binomial função de ligação logarítmica (Nelder e Wedderburn, 1972).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos foram de 15 embriões eclodidos num total de 66 embriões congelados pelo método tradicional, o que corresponde a 22,7% de eclosão enquanto que para o método de vitriificação foram obtidos 22 embriões eclodidos de um total de 66, correspondendo a 33,3% de eclosão.

4 CONCLUSÃO

De acordo com a taxa de eclosão, os métodos de congelamento tradicional e de vitriificação obtiveram resultados diferentes. O método de vitriificação numericamente obteve um resultado melhor, portanto podemos utilizar esta técnica para congelamento de embriões obtidos *in vitro*.

REFERÊNCIAS

BAUTISTA, J.N.; KANAGAWA H. **Current status of vitrification of embryos an oocytes in domestic animals:** Ethylene glycol as na emerging cryoprotectant of choice Jpn J Vet. Res 45, 1998, págs. 183-191.

CABODEVILA, J.A.; TERUEL, M.T.; CALLEJAS, S.S.; CATALANO, R.C. e ERSINGER, C.A. **Vitrificación de enbriones bovinos Protocolos disponibles:** Aplicación y resultados, CABIA, 31, 1997, págs. 22-30.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N.L. **Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*.** J. Anim. Sci., v. 48, p. 76-86, 1979.

NAKAGATA, N. **High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification.** J Reprod Fert 87, 1989. págs. 479-483.

NELDER, J.; WEDDERBURN, R.W.M. Generalized linear models. J. Ress. Stat. Sci., v. 135, p. 370-384, 1972.

PALASZ, A.T.; MAPLETOFT, R.J. **Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes:** recent advances. Biotechnology Advances, v.14, 1996, págs.127-149.

RALL, W.F.; FAHY, G. **Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by Vitriification** Nature, 1985, págs. 313, 573-575

SCHNEIDER, U.; MAZUR, P. **Implications and applications of the long-term preservation of embryos by freezing** In: Morrow D.A., ed. Current Therapy in Theriogenology II, Philadelphia: WB Saunders Co, 1986, págs. 81-83.