

Universidade do Estado de Santa Catarina
Centro de Ciências Agroveterinárias



**DIFERENTES SOLUÇÕES CRIOPROTETORAS NA
VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS PIV, COM OU SEM O
USO DE NITROGÊNIO SUPER-RESFRIADO.**

Dennys Eduardo Werlich

Lages, SC, Brasil

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS**

Dissertação de Mestrado

**DIFERENTES SOLUÇÕES CRIOPROTETORAS NA VITRIFICAÇÃO DE
EMBRIÕES BOVINOS PIV, COM OU SEM O USO DE NITROGÊNIO SUPER-
RESFRIADO.**

Dennys Eduardo Werlich

Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias

Lages, SC, Brasil

2005

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária
Renata Weingärtner Rosa – CRB 228/14ª Região
(Biblioteca Setorial do CAV/UEDESC)

Werlich, Dennys Eduardo

Diferentes soluções crioprotetoras na vitrificação de embriões bovinos PIV com ou sem o uso de nitrogênio super-resfriado / Dennys Eduardo Werlich. – Lages, 2005. 25 p.

Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências Agroveterinárias / UEDESC.

1. Vácuo. 2. Nitrogênio resfriado. 3. Vitrificação. 4. Embriões PIV 5. Bovinos. I.Título.

CDD – 636.08926

**DIFERENTES SOLUÇÕES CRIOPROTETORAS NA VITRIFICAÇÃO DE
EMBRIÕES BOVINOS PIV, COM OU SEM O USO DE NITROGÊNIO SUPER-
RESFRIADO.**

Por

Dennys Eduardo Werlich

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Ciências Veterinárias, Área de concentração em Reprodução Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Veterinárias**.

Lages, SC, Brasil.

2005

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

A comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**DIFERENTES SOLUÇÕES CRIOPROTETORAS NA VITRIFICAÇÃO DE
EMBRIÕES BOVINOS PIV, COM OU SEM O USO DE NITROGÊNIO SUPER
RESFRIADO.**

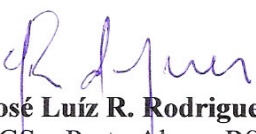
Elaborada por

Dennys Eduardo Werlich.

**como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Veterinárias**

COMISSÃO EXAMINADORA


Dr. Alceu Mezzalira
(Presidente/Orientador)


Dr. José Luiz R. Rodrigues
UFRGS – Porto Alegre RS


Dr. Marcel Frajblat
UNIVALI – Itajaí SC

Lages, Dezembro de 2005.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIACÕES.....	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO	1
MATERIAIS E MÉTODOS	3
Produção <i>in vitro</i> dos embriões	4
Vitrificação	5
Reaquecimento e remoção dos crioprotetores	6
Super-resfriamento do nitrogênio líquido	7
Delineamento Experimental	7
Análise Estatística	8
RESULTADOS	8
DISCUSSO	10
CONCLUSES	15
REFERÊNCIAS	16
Anexo 01	23
Anexo 02	25

AGRADECIMENTOS

Aos Frigoríficos Verdi e Fox, especialmente ao senhor Valdecir Ferreira, pela colaboração na obtenção do material utilizado neste trabalho.

A Eletromec, na pessoa do Sr. Léo Carlos Niski, pelo inestimável apoio na confecção e manutenção do equipamento Nitrocooler.

Ao centro de Ciências Veterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, pela disponibilização de sua infra-estrutura para realização deste trabalho.

Ao Conselho Brasileiro de Pesquisa (CNPq), pelo financiamento do projeto.

Um agradecimento especial, a todas as outras pessoas que colaboraram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Taxa média de eclosão de blastocistos bovinos produzidos <i>in vitro</i> e vitrificados com diferentes crioprotetores.....	9
Tabela 2 – Taxa média de eclosão de blastocistos bovinos produzidos <i>in vitro</i> e vitrificados com diferentes crioprotetores, na presença ou não de nitrogênio super-resfriado.....	10

LISTA DE ABREVIACOES

Bx – Blastocisto expandido

DMSO – Dimetil Sulfoxido.

GLI - Glicerol

EG – Etileno Glicol.

PRO – 1,2 propanediol

FSH – Hormônio Folículo Estimulante.

LF - Líquido folicular.

LH – Hormônio Luteinizante.

OPS – Open Pulled Straw.

PBS – Phosphated buffered saline solution.

SEE – Soro de água em estro.

SOFaaci – Syntetic Oviduct Fluid com aminoácidos, citrato de sódio e mio inositol.

SOF - Syntetic Oviduct Fluid

TCM 199 - Tissue Culture Medium 199.

PIV – Produzidos in vitro

KSOM – Simplex Optimized Medium with K

CR1 – Christers and Rosenkrans 1 Medium

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias

Centro de Ciências Agroveterinárias - CAV

Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

DIFERENTES SOLUÇÕES CRIOPROTETORAS NA VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS PIV, COM OU SEM O USO DE NITROGÊNIO SUPER-RESFRIADO.

AUTOR: DENNYS EDUARDO WERLICH

ORIENTADOR: PROF. Dr. ALCEU MEZZALIRA

Lages, SC, 19 de Dezembro de 2005.

Com o objetivo de determinar a viabilidade de blastocistos expandidos (Bx) bovinos produzidos *in vitro* (PIV) e vitrificados em OPS, dois experimentos avaliaram o efeito de quatro soluções crioprotetoras e duas velocidades de resfriamento. A taxa de eclosão foi utilizada como parâmetro de viabilidade. No primeiro experimento, 720 Bx (12 repetições) foram aleatoriamente distribuídos em 5 grupos: Grupo I (20% EG + 20% DMSO), Grupo II (25% de EG + 25% de GLI), Grupo III (7,0M EG), Grupo IV (20% de EG + 20% de PRO) e Grupo V (controle não vitrificado). A taxa de eclosão do grupo controle (84%) foi superior ($P < 0,05$) aos grupos vitrificados. Não houve diferença nas taxas de eclosão dos grupos I (53,5%) e IV (52,8%), que foram superiores aos grupos II (38,9%) e III (38,9%). No segundo experimento avaliou-se o uso de nitrogênio líquido super-resfriado por ação de vácuo. Utilizou-se 244 Bx (5 repetições), aleatoriamente distribuídos, usando as soluções EG+DMSO (GI e GII) e EG+PRO (GIII e GIV). Não foram observadas diferenças entre as taxas de eclosão dos embriões vitrificados com nitrogênio super-resfriado (GII = 50,2%; GIV = 54,0%) ou nitrogênio normal (GI = 50,1%; GIII = 56,0%), independente da solução empregada. Conclui-se que a solução EG+DMSO e EG+PRO possibilitam taxas de eclosão similares e são mais eficientes que as soluções EG+GLI e EG. O emprego do nitrogênio super-resfriado pelo vácuo não proporciona aumento da viabilidade de blastocistos bovinos PIV vitrificados em OPS.

Palavras chave: Vácuo; Nitrogênio resfriado; Vitrificação; Embriões PIV; Bovinos.

ABSTRACT

Master's Dissertation

Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias

Centro de Ciências Agroveterinárias - CAV

Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

DIFFERENT CRYOPROTECTANT SOLUTIONS IN THE VITRIFICATION OF BOVINE IVP EMBRYOS, WITH OR WITHOUT SUPER COOLED NITROGEN .

AUTHOR: DENNYS EDUARDO WERLICH

ADVISER: PROF. Dr. ALCEU MEZZALIRA

Lages, SC. December, 19, 2005.

The aim of this study was to determine the viability of bovine IVP expanded blastocysts (Bx) submitted to four different cryoprotectant solutions (Experiment 1) and two cooling rate speeds (Experiment 2), and vitrified in OPS. Hatching rate was considered as viability parameter. In the first experiment (12 replications), IVP Bx (n=720) were randomly allocated in to groups: Group I (20% EG + 20% DMSO), Group II (25% EG + 25% GLY), Group III (7,0M EG), Group IV (20% EG + 20% PRO) and Group V (control not vitrified). After 72 hours of culture, the hatching rate of control group (84.0%) was higher ($P<0.05$) than that observed with the vitrified experimental groups. There were no differences among hatching rates observed in Groups I (53.5%), and IV (52.8%), and both were higher than Groups II (38.9%) and III (38.9%). In the second experiment (5 replications) 244 Bx were randomly exposed to EG+DMSO (GI and GII) or EG+PRO (GIII and GIV) solutions in order to evaluate the use of super-cooled liquid nitrogen by vacuum submission. There were no differences among the hatching rates of embryos vitrified with super-cooled (GII = 50.2%; GIV = 54.0%) or normal nitrogen (GI = 50.1%; GIII = 56.0%), independently of the solutions. In conclusion, the EG+DMSO and EG+PRO solution are similar in promoting IVP Bx survival, after vitrification, and they are more efficient than the EG+GLY and EG solutions. The use of super cooled liquid nitrogen does not improve embryo survival after vitrification.

Key words: Vacuum, Cooled nitrogen, Vitrification, IVP embryos, Bovine.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os avanços obtidos na técnica de produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos, vêm despertando o interesse da agroindústria e conquistando significativo espaço no mercado de melhoramento genético. O Brasil tem se destacado no cenário mundial com uma produção de mais de 60.000 embriões PIV produzidos e transferidos em 2003 (THIBIER, 2004), que tem levado a uma oferta de embriões maior que a capacidade de transferência direta para receptoras.

A exemplo do que ocorre nos trabalhos com embriões produzidos *in vivo*, onde cerca de 50% são criopreservados antes de serem transferidos (THIBIER, 2003), a utilização e comercialização de embriões PIV poderia ser maximizada se houvesse o armazenamento dos excedentes, através de uma adequada metodologia de criopreservação. Entretanto, as atuais condições de cultivo determinam a produção de estruturas deficitárias e mais sensíveis à criopreservação (POLLARD e LEIBO, 1994; LEE et al., 1997; LONERGAN et al., 2001; IMAI et al., 2002; NEDAMBALE et al., 2004; PEREIRA et al., 2005). Alterações na transcrição de genes (LONERGAN et al., 2003) e diferenças morfológicas e fisiológicas, em relação aos embriões produzidos *in vivo* (WRIGHT e ELLINGTON, 1995), são responsáveis pela menor viabilidade e maior sensibilidade ao processo de criopreservação dos embriões PIV (RODRIGUES, 1996; VAJTA et al., 1997c).

A viabilidade ainda pode ser influenciada pelo método de criopreservação utilizado (HOCHI et al., 1996), pelo estágio de desenvolvimento e idade do embrião (CSEH et al., 1995; MEZZALIRA et al., 2004). O método convencional de congelamento, não tem se mostrado adequado a criopreservação de embriões PIV

(POLLARD e LEIBO, 1994; KAIDI et al., 2001; MEZZALIRA et al., 2004). A baixa viabilidade embrionária após o congelamento é atribuída ao excessivo tempo de exposição à faixa de temperatura correspondente à temperatura termotrópica de transição dos lipídios (ZERON et al., 1999). Pelo fato dos embriões PIV apresentarem alto teor de lipídios, metodologias de criopreservação que empregam altas velocidades de resfriamento e aquecimento são mais adequadas. A vitrificação tem sido considerada a metodologia mais promissora para criopreservação desse tipo de embriões (ISHIMORI et al, 1992; VAJTA et al, 1997 a,b; BAUTISTA e KANAGAWA,1998; SOMMERFELD e NIEMANN, 1999).

Diferentes alternativas, como o uso de suportes abertos que permitem o contato direto da amostra com o nitrogênio líquido (VAJTA et al., 1997a; VAJTA et al., 1988) e eliminam o estado de ebulição do nitrogênio, mediante estabilização por pressão negativa, reduzem o efeito isolante do vapor de nitrogênio durante a imersão da amostra (MARTINO et al., 1996; ARAV et al., 2000) e permitem aumentar a velocidade de resfriamento. Esta metodologia se mostrou efetiva na vitrificação de oócitos bovinos (ARAV et al. 2000; SANTOS et al., 2004; SANTOS, 2005), sendo oportuno avaliar sua viabilidade para embriões PIV.

Diferentes combinações crioprotetoras foram empregadas nos últimos anos, com resultados muitas vezes contraditórios em função do emprego de diferentes procedimentos de exposição, tipos de suporte e velocidade de resfriamento. Dentre as soluções correntemente empregadas, o uso de Etileno Glicol (EG) de forma isolada ou em associação com outros crioprotetores permeáveis, tem sido uma unanimidade. Entretanto, o uso de diferentes metodologias dificulta a comparação dos resultados.

A solução composta por Etileno Glicol (EG) e Dimetil Sulfoxido (DMSO) tem sido amplamente utilizada, proporcionando resultados bastante satisfatórios (MEZZALIRA et al., 2004). Todavia, o emprego de DMSO apresenta como inconveniente a necessidade de preparo da solução no momento do uso, em função de sua característica higroscópica, o que dificulta sua aplicação nas rotinas de criopreservação.

Dados de literatura (ISHIMORI et al, 1992; HUBÁLEK, 2003) sugerem os crioprotetores Propanediol (PRO), EG, Glicerol (GLI) e DMSO e as suas possíveis interações, como bons candidatos ao emprego na vitrificação. Combinações de crioprotetores com características mais estáveis possibilitariam o preparo prévio das soluções em meios mais simples, favorecendo assim sua aplicação. Esta facilidade de aplicação, associada ao emprego de nitrogênio estabilizado por vácuo, poderão contribuir significativamente para o avanço do status da criopreservação de embriões PIV de bovinos.

O presente estudo teve por objetivos: Primeiro, determinar as taxas de eclosão de blastocistos expandidos bovinos produzidos *in vitro*, após exposição a diferentes soluções crioprotetoras e a vitrificação. Segundo, determinar as taxas de eclosão de blastocistos expandidos bovinos produzidos *in vitro*, após vitrificação em nitrogênio líquido estabilizado pelo vácuo (super-resfriado).

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no laboratório de reprodução animal Prof. Assis Roberto de Bem, localizado no Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, em Lages SC. Exceto onde indicado, todos os reagentes

foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Nas manipulações de oócitos e embriões foram utilizadas placas de quatro poços obtidas da Nunc. S/A (Roskilde, Denmark).

Produção *in vitro* dos embriões

Ovários bovinos coletados em abatedouros da região foram transportados ao laboratório em solução salina tamponada com fosfato (PBS), adicionada de penicilina e estreptomicina, mantidos a 35°C por período não superior a 5 horas até o início da punção folicular. Os complexos cumulus oócitos foram aspirados de folículos de 2 a 8 mm de diâmetro, através de uma agulha 19G ligada a uma linha de vácuo, com pressão de aspiração de 20 mL/minuto. Os oócitos foram selecionados em líquido folicular, previamente centrifugado. Após a seleção, procedeu-se um banho em TCM 199 tamponado com HEPES e adicionado de 10% de soro de égua em estro (SEE). A maturação foi realizada em meio TCM-199 - sais de Earle (GIBCO BRL, Paisley, NK) adicionado de 26,2 mM de NaHCO₃, 25 mM de HEPES, 0,2 mM de Piruvato de sódio com 0,01 UI de FSH/mL (Folltropin™ - Bioniche, Canada), 0,5µg/mL de LH (Lutropin™ – Bioniche, Canada) e 10% de SEE, por 24 horas a 39,0°C, em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa. A fecundação, realizada com 1,0 x 10⁶ espermatozoides/mL, de um touro *Bos taurus taurus*, selecionados pelo método de migração ascendente, “swim-up”, em meio TALP-Sperm, foi realizada em meio TALP-Fert, adicionado de 30 µg/mL de heparina, 0,72 µg/mL de penicilamina, 0,26 µg/mL de hipotaurina e 0,04 µg/mL de epinefrina, com 24 horas de incubação.

Ao final do período de fecundação, procedeu-se a remoção das células do cumulus através de agitação mecânica e a transferência das estruturas para o meio SOFaaci (HOLM et al., 1999), suplementado com 5% de SEE e mantido sob óleo

mineral. Após 24 horas de cultivo, as estruturas não clivadas foram removidas. As placas foram então acondicionadas em bolsas impermeáveis a gases contendo uma atmosfera úmida de 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂ (VAJTA et al., 1997d), mantidas em estufa de cultivo a 39°C durante mais 162 horas de cultivo. A cada repetição, os blastocistos expandidos (Bx) de qualidade excelente ou boa, obtidos com esta metodologia foram homogeneamente divididos entre os grupos experimentais.

Vitrificação

Os procedimentos de vitrificação foram baseados na tecnologia OPS (VAJTA et al., 1999), utilizando diferentes soluções crioprotetoras e/ou temperaturas de resfriamento de acordo com o tratamento. Em todos os grupos vitrificados, foram envasados três embriões em cada palheta estirada e aberta (OPS).

Na preparação da solução de crioprotetores contendo DMSO, foi utilizado o meio TCM-199 tamponado com HEPES e adicionado de 10% de SEE, sendo as soluções preparadas imediatamente antes do uso. Já as demais soluções foram preparadas previamente, em solução salina tamponada com fosfato (D-PBS) e armazenadas em tubos de 1,5 mL em freezer a -17 °C, sendo descongeladas no momento do uso.

No experimento 1, os embriões do grupo I (EG+DMSO) foram expostos por 1 minuto a uma solução composta de 10% Etileno Glicol (EG) + 10% Dimetil Sulfoxido (DMSO), seguida da exposição por 20 segundos à solução de vitrificação (20% EG + 20% DMSO). Nos demais grupos, as amostras descongeladas foram adicionadas de 10% de SEE. No grupo II (EG+GLI), os embriões foram expostos por 5 minutos a 10% de Glicerol (GLI), seguido de 1 minuto em uma solução de 10% de GLI + 20% de EG,

e finalmente expostos por 30 segundos à solução de vitrificação (25% GLI + 25% EG). No grupo III (EG), os embriões foram expostos por 2 minutos a 1,5 M de EG, seguido de 2 minutos em uma solução com 3,5 M de EG e finalmente expostos por 30 segundos à solução de vitrificação (7,0 M EG). No grupo IV (EG+PRO), os embriões foram expostos por 1 minuto a uma solução 10% de EG + 10% de Propanediol (PRO), seguido da exposição por 20 segundos à solução de vitrificação (20% EG + 20% PRO). O grupo V (controle não vitrificado) foi utilizado como controle da taxa de eclosão em cada repetição.

No experimento 2, os embriões foram vitrificados nas soluções EG+DMSO ou EG+PRO usando nitrogênio normal ou nitrogênio líquido super-resfriado. Embriões não vitrificados foram utilizados como controles da taxa de eclosão em cada repetição.

Reaquecimento e remoção dos crioprotetores

Para o aquecimento, as OPS contendo os embriões foram expostas ao ar por um período de quatro segundos e em seguida mergulhadas em uma solução de TCM Hepes com 10% de SEE e gradientes decrescentes de sacarose. Os embriões vitrificados na solução EG+DMSO (Grupo I) e EG (Grupo III), foram submetidos a dois períodos de 5 minutos em gradientes de 0,3 e 0,15 M de sacarose. Já os embriões vitrificados em EG+GLI (Grupo II) e EG+PRO (Grupo IV) foram submetidos a dois períodos de 5 minutos em gradientes de 0,6 e 0,3 M de sacarose, antes de passarem ao meio de manutenção isosmótico. As soluções de sacarose foram preparadas a partir do meio TCM 199, tamponado com Hepes e adicionado de 10% SEE. Após estarem em meio de manutenção, os embriões de cada grupo foram submetidos a 72 horas de cultivo em meio SOFaaci + 5% SEE a 39°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de

umidade relativa. A avaliação da viabilidade foi procedida com 72 horas, tendo como parâmetro as taxas de eclosão.

Super-resfriamento do nitrogênio líquido

O super-resfriamento do nitrogênio líquido foi obtido através do uso do equipamento denominado Nitrocooler (Anexo 2), confeccionado com uma bomba de sucção para produção de vácuo, adaptada a um recipiente de metal com tampa hermética, contendo em seu interior outro recipiente de isopor com aproximadamente 300 mL de nitrogênio líquido. O nitrogênio líquido foi resfriado até o início de sua solidificação (-210°C), mediante a ação do vácuo produzido pela aplicação de sucção, durante um período médio de 5 minutos. Após a abertura da tampa do recipiente, o nitrogênio retornava ao estado líquido, porém em uma forma estável sem emissão de vapor por até 10 minutos. Durante este período as OPS contendo os embriões foram imersas no líquido refrigerante estabilizado (super-resfriado) e em seguida transferidas para outro recipiente contendo nitrogênio não estabilizado (em ebulição) onde permaneciam em média por 30 minutos, até o reaquecimento.

Delineamento experimental

No experimento 01 quatro diferentes soluções crioprotetoras foram avaliadas, tendo como parâmetro de viabilidade a taxa de eclosão após o reaquecimento. Foram utilizados 720 blastocistos expandidos, em 12 repetições, sendo divididos em 05 grupos: quatro tratamentos de vitrificação e um controle não vitrificado.

No experimento 02 foram avaliadas duas velocidades de resfriamento obtidas através do uso de nitrogênio líquido normal (-196°C) ou super-resfriado (-210°C) pela

ação do vácuo. Como parâmetro de viabilidade foi considerado a taxa de eclosão após o reaquecimento. Para vitrificação foram repetidos os procedimentos dos grupos que proporcionaram os melhores resultados no experimento 1. Foram utilizados 244 blastocistos expandidos, em 05 repetições, divididos em 05 grupos: quatro tratamentos de vitrificação e um controle não vitrificado.

Análise estatística

Os dados dos diferentes grupos foram submetidos à análise de variância com a utilização do pacote estatístico Bioestat e as diferenças das médias submetidas ao teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

No experimento 1, observou-se que os embriões do grupo controle (não vitrificados) apresentaram taxas de eclosão superiores (84,0%; $P < 0,05$) aos grupos vitrificados. Em relação aos grupos vitrificados, as maiores taxas de eclosão foram observadas nos grupos I (EG+DMSO = 53,5%) e grupo IV (EG+PRO = 52,8%). Os grupos II (EG+GLI) e III (EG) apresentaram resultados semelhantes (38,9%), porém com taxas de eclosão inferiores ($P < 0,05$) aos demais grupos (Tabela 01).

Tabela 01 – Taxa média de eclosão de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* e vitrificados com diferentes crioprotetores (12 repetições).

Tratamentos	Embriões recuperados	Taxa de eclosão	
	n	n	(%)
Grupo I - EG+DMSO	144	77	53,5 ^a
Grupo II - EG+GLI	144	56	38,9 ^b
Grupo III - EG	144	56	38,9 ^b
Grupo IV - EG+PRO	144	76	52,8 ^a
Controle não vitrificado	144	121	84,0 ^c

^{a, b, c} Letras diferentes indicam efeito significativo (P<0.05).

No experimento 2, observou-se maior viabilidade (P<0,05) do grupo controle não vitrificado (83,8%), não sendo observadas diferenças nas taxas de eclosão dos grupos EG+DMSO (50,1%) ou EG+PRO (56,0%) vitrificados usando nitrogênio normal (-196°C), com resultados muito próximos daqueles obtidos no primeiro experimento. A utilização de nitrogênio líquido super-resfriado não afetou as taxas de eclosão dos embriões vitrificados com EG+DMSO (50,2%) ou com EG+PRO (54,0%), como demonstra a tabela 02.

Tabela 02 – Taxa média de eclosão de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* e vitrificados com diferentes crioprotetores, na presença ou não de nitrogênio super-resfriado.

Tratamentos	Nitrogênio super-resfriado	Embriões recuperados n	Taxa de Eclosão (%)
GI - EG+DMSO	-	49	50,1 ^a
GII - EG+DMSO	+	46	50,2 ^a
GIII - EG+PRO	-	50	56,0 ^a
GIV - EG+PRO	+	50	54,0 ^a
Controle não vitrificado	#	49	83,8 ^b

^{a, b} Letras diferentes indicam efeito significativo (P<0.05).

DISCUSSÃO:

Embora idênticas taxas de eclosão com embriões vitrificados ou simplesmente cultivados tenham sido relatadas (PEREIRA et al., 2005), na maioria dos estudos observa-se um decréscimo de viabilidade, o que também foi verificado neste estudo, onde as taxas de eclosão dos grupos controle (84,0 e 83,8%) foram significativamente superiores às observadas nos grupos vitrificados do experimento 1 (38,9 a 53,5%) e experimento 2 (50,1 a 56,0%), respectivamente. As soluções de vitrificação compostas por EG+DMSO e EG+PRO proporcionaram as melhores taxas de eclosão,

demonstrando que ambas podem ser empregadas com sucesso na vitrificação de blastocistos bovinos PIV.

Estudos prévios com embriões de camundongos (ISHIMORI et al., 1992) já demonstraram a viabilidade da combinação EG+DMSO. No mesmo estudo, os autores também avaliaram a solução EG+PRO, que, entretanto, mostrou-se menos viável que a combinação EG+DMSO (46,0 x 79,0%).

O tratamento que utilizou a associação EG+GLI proporcionou baixa taxa de eclosão (38,9%), após a vitrificação. Kuwayama et al. (1994) obtiveram alta sobrevivência (83,3% de re-expansão) após vitrificação de embriões bovinos PIV em 25% GLI + 25% PRO, com 16 passos de adaptação, relatando distorção da zona pelúcida e excessiva retração dos blastocistos, que não sobreviveram, quando a adição foi em dois passos. Estes dados sugerem que quando se emprega glicerol, a exposição e a remoção devem ser graduais, o que pode justificar a baixa viabilidade (eclosão) observada neste experimento com o emprego de glicerol em três passos. Entretanto, diferentes citações de literatura apresentam dados contraditórios em relação ao presente estudo. Taxas de eclosão de 53% foram obtidas por Donnay et al., (1998) após vitrificação de embriões PIV com 25% EG + 25% GLI, adicionados em três passos. Martinez et al. (1998) obtiveram 59,6% de eclosão com a associação de EG+GLI, sendo que em novo experimento, (MARTINEZ et al., 2002), os autores obtiveram 45% de eclosão após vitrificação de embriões PIV em palhetas com a solução composta por 25% EG + 25% GLI, observando um significativo acréscimo na taxa de eclosão (66,6%) com a inclusão de 0,1M de sacarose.

Rodrigues (1996) obteve maior taxa de eclosão (32,0%) quando utilizou pré-tratamento com 1,5 M de EG por 2 minutos, antes da vitrificação de embriões D7 com a associação de EG+Ficol+Sacarose. No presente estudo, o tratamento que utilizou EG proporcionou menor taxa de eclosão (38,9%), após a vitrificação. Já Martinez et al. (1998) utilizando EG+Ficol+Sacarose obtiveram taxas de eclosão de 57,7%, superiores ao deste estudo. Esta variabilidade de resultados demonstra a necessidade de se buscar soluções que sejam adequadas para um determinado protocolo e um tipo específico de estrutura a ser criopreservada.

Vajta et al. (1999), observaram redução da taxa de re-expansão e eclosão quando a temperatura da solução, durante a exposição dos embriões, foi reduzida de 35 para 20°C. Entretanto, esta diferença foi compensada com maior tempo de exposição à solução de equilíbrio, antes da exposição à solução de vitrificação. Os autores observaram ainda uma queda na taxa de eclosão quando substituíram o soro fetal bovino por albumina sérica bovina.

Estes resultados contraditórios e extremamente variáveis reforçam a possível interferência de fatores como os meios de cultivo, as metodologias de criopreservação, a formulação das soluções ou mesmo a procedência dos embriões. Imai et al. (2002) avaliaram a influência do cultivo na criotolerância de embriões PIV, observando que embriões cultivados em meio CR1 são mais precoces, porém mais sensíveis ao congelamento do que embriões cultivados em TCM 199. Nedambale et al. (2004) avaliaram os meios de cultivo KSOM e SOF isoladamente ou em seqüência, observando maior viabilidade com o uso seqüencial. Verificaram ainda maior viabilidade com a vitrificação (60%) em relação ao congelamento convencional (30%) destes embriões, o

que demonstra que embora tenha melhorado a qualidade, o uso sequencial dos meios não foi capaz de produzir embriões com a mesma qualidade dos produzidos *in vivo*.

É possível que o desenvolvimento de metodologias mais adequadas e fisiológicas para a produção de embriões, possibilite o emprego de métodos convencionais de criopreservação no futuro. No entanto, até que este estágio seja obtido, a avaliação dos diferentes fatores que interferem nos métodos alternativos de criopreservação devem ser investigados.

As observações de Hubálek (2003) de que o DMSO, EG e PRO permeiam facilmente as células, diferente do glicerol que têm menor permeação e é menos efetivo, estão em acordo com os dados obtidos neste estudo. As taxas de eclosão observadas com EG+DMSO neste estudo (50,1 a 53,5%) são um pouco inferiores aos 63,0% observados por Vajta et al., (1996) e semelhantes às obtidas previamente por (LAZAR et al., 2000), 46,0% ou por nossa equipe, 47,1% (MEZZALIRA et al., 2001), 49,6 e 54% (MEZZALIRA et al., 2004). Nossos resultados, entretanto, foram inferiores aos obtidos por Pereira et al., (2005), com semelhante metodologia. Esta diferença pode ser atribuída ao aumento na criotolerância dos embriões desenvolvidos em meio condicionado por células da granulosa, ou pelo método de cultivo em grupos no sistema “well of the well”. Adicionalmente, a maior criotolerância pode, ao menos em parte, ser devido à distinta origem dos animais trabalhados pelos autores (*Bos taurus indicus*), em relação ao presente estudo (*Bos taurus taurus*). Visintin et al. (2002) relatam diferenças na constituição, com menor teor lipídico, nos embriões *Bos taurus indicus* (Nelore) em relação aos *Bos taurus taurus* (Holandesa), relatando ainda diferenças na criotolerância.

As taxas de viabilidade embrionária baseadas na taxa de eclosão observadas com o emprego das soluções EG+DMSO e EG+PRO, nas condições deste experimento,

sugerem que ambas podem ser empregadas com sucesso na criopreservação de embriões bovinos PIV com a metodologia OPS. Entretanto, a possibilidade do emprego de soluções previamente preparadas (EG+PRO), confere maior agilidade ao processo e deve ser considerado, no momento de escolha de um protocolo.

O super-resfriamento do nitrogênio líquido tem se mostrado viável na criopreservação de oócitos bovinos. Resultados expressivos de desenvolvimento embrionário (38%) após a vitrificação de oócitos bovinos maturados foram relatados por Arav et al. (2000), com o emprego de um equipamento que possibilita o super-resfriamento do nitrogênio líquido, pela aplicação de vácuo. Santos et al., (2004) e Santos (2005), vitrificando oócitos bovinos imaturos ou maturados, também demonstraram aumento da viabilidade com o emprego de nitrogênio super-resfriado. Estes resultados foram determinantes para a realização do segundo experimento, utilizando o vácuo associado aos protocolos que produziram as melhores taxas de eclosão, EG+DMSO e EG+PRO. O equipamento utilizado proporcionou o super-resfriamento do nitrogênio líquido até o ponto de solidificação seguido do bloqueio da ebulição, o que está em acordo com a descrição de Martino et al. (1996) e Arav et al. (2000). Porém, diferente dos resultados observados por Arav et al. (2000) e Santos et al. (2004), a utilização de nitrogênio super-resfriado pela ação de vácuo não proporcionou aumento de viabilidade aos embriões PIV vitrificados com EG+DMSO (50,2%) ou com EG+PRO (54,0%). Isto pode ter sido determinado pelo distinto comportamento osmótico dos embriões, que são constituídos por mais de uma centena de células e que respondem individualmente a qualquer estresse osmótico, apresentando uma maior relação superfície/volume e conseqüentemente apresentando maior capacidade de permeação. Assim, mesmo com menor velocidade de resfriamento, é possível que as

células tenham conseguido suficiente permeação de crioprotetores para vitrificar adequadamente, diferente do que ocorre com células maiores como os oócitos. Nowshari & Brem (2001), trabalhando com embriões de camundongo no estágio de pró-núcleo, não observaram efeito significativo do nitrogênio líquido super-resfriado. Estes dados estão em acordo com os resultados obtidos neste estudo, muito embora os autores tenham trabalhado com embriões de espécie (murina) e estágio (pró-núcleo) diferentes. Todavia, embora os autores tenham trabalhado com embriões de uma célula, seu volume é bastante reduzido em relação aos bovinos, o que reforça a possibilidade de uma maior relação superfície/volume e como consequência a ausência de efeitos benéficos do nitrogênio super-resfriado. Estes fatos evidenciam a necessidade de novos estudos avaliando-se o nitrogênio super-resfriado utilizado na vitrificação de embriões bovinos PIV com reduzida concentração dos crioprotetores.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que:

-As soluções EG+PRO e EG+DMSO são similares na manutenção da sobrevivência de blastocistos expandidos bovinos após a vitrificação.

- As soluções EG+PRO e EG+DMSO são mais eficientes que as soluções EG+CLI ou EG em promover a sobrevivência embrionária após vitrificação.

-O uso de nitrogênio líquido super-resfriado não melhora a sobrevivência de blastocistos bovinos PIV vitrificados em OPS.

REFERÊNCIAS

Arav, A.; Zeron, Y.; Ocheretny, A. A new device and method for vitrification increases the cooling rate and allows successful Cryopreservation of bovine Oocytes. **Theriogenology**, v.53, p.248, 2000. Abstract.

Bautista, J.A.N.; Kanagawa, H. Current status of vitrification of embryos and oocytes in domestic animals: Ethylene glycol as an emerging cryoprotectant of choice. **J. Vet. Res.**, v.45, p.183-91, 1998.

Cseh, S.; Kreysing, U.; Lucas-Hahn, A.; Niemann, H. Direct rehydration of IVM, IVF, and IVC bovine embryos frozen in ethylene-glicol. **Theriogenology**, v.43, p.190, 1995.

Donnay, I.; Auquier, P.H.; Kaidi, S. et al. Vitrification of in Vitro produced bovine blastocysts: methodological studies and developmental capacity. **An. Reprod. Sci.**, v.52, p.93-104, 1998.

Hochi, S.; Semple, E.; Leibo, S.P. Effect of cooling and warming rates during cryopreservation on survival of in-vitro produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 46, p.837-847, 1996.

Holm, P.; Booth, P.J.; Schmidt, M.H. et al. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology**, v.52, p.683-700, 1999.

Hubálek, Z. Protectants used in the Cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, v.46, p.205-29, 2003.

Imai, K.; Matoba, S.; Dochi, O.; Shimoira, T. Different factors affect competence and cryotolerance in in vitro produced bovine embryos. **J. Vet. Med. Sci.**, v.64, p.887-91, 2002.

Ishimori, H.; Takahashi, Y.; Kanagawa, H. Viability of vitrified mouse embryos using various cryoprotectant mixtures. **Theriogenology**, v.37, p.481-87, 1992.

Kaidi, S; Berard, S.; Lambert, P. 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, p.1127-34, 2001.

Kuwayama. M.; Fujikawa, S.; Nagai, T. Ultrastructure of IVM-IVF bovine blastocysts

vitrified alter equilibration in Glycerol 1,2-Propanediol using 2-step and 16-step procedures. **Cryobiology**, v.31, p.415-22, 1994.

Lazar, L.; Spak, J.; David, V. The vitrification of in vitro fertilized cow blastocysts by the open pulled straw method. **Theriogenology**, v.54, p.571-578, 2000.

Lee, E.S.; Okamoto, Y.; Yamashina, H.; Fukui, Y. Pregnancy rates after transfer of fresh or frozen bovine blastocysts developed from serum-free or protein-free media. **Theriogenology**, v.47, p.350, 1997.

Lonergan, P.; Rizos, D.; Ward, F.; Boland, M.P. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.41, p.427-37, 2001.

Lonergan, P.; Rizos, D.; Kanka, J. Et al. Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment alter fertilization and the implications for blastocyst quality. **Reproduction**, v.126, p.333-46, 2003.

Martino, A.; Songsasen, N.; Leibo, S.P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biology of Reproduction**, v.54, p.1059-1069, 1996.

Martinez, A.G.; Matos, D.G.; Furnus, C.C.; Brogliatti, G.M. In vitro evaluation and pregnancy rates after Vitrification of in vitro produced bovine embryos. **Theriogenology**, v.50, p.757-67, 1998.

Martinez, A.G.; Valcárcel, A.; de la Heras, M.A. Vitrification of in vitro produced bovine embryos: in Vitro and in vivo evaluations. **An. Reprod. Science**, v. 73, p.11-21, 2002.

Mezzalira, A.; Thaler Neto, A.; Barbieri, D.P. et al. Vitriificação de embriões bovinos produzidos PIV tratados com citocalasina B. **Rev. Bras. Reprod. Animal**, v.25, p.422-23, 2001.

Mezzalira, A.; Mezzalira, J.C.; Moraes, A.N. et al. Vitrification of bovine embryos: Age of embryos and exposure time to cryoprotectant influences viability. **Arch. of Vet. Sci**, v.9, p.107-111, 2004.

Nedambale, T.L.; Dinnyés, A.; Groen, W. et al. Comparison of in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or Vitrification. **Theriogenology**, v.62, p.437-49, 2004.

Nowshari, M. A.; Brem, G. Effect of freezing rate and exposure time to cryoprotectant on the development of mouse pronuclear stage embryos. **Hum. Reprod.**, v.16, p.2368-73, 2001.

Pereira, D.C.; Dode, M.A.N.; Rumpf, R. Evaluation of different culture systems on the in vitro production of bovine embryos. **Theriogenology**, v.63, p.1131-41, 2005.

Pollard, J.W.: Leibo, S.P. Chilling sensitivity of mammalian embryos. **Theriogenology**, v.41, p.101-106, 1994.

Rodrigues, J.L. Effect of pre-equilibration in 1.5 or 3.6M Ethylene glycol on the survival of day-7 IVMFC bovine blastocysts vitrified in EFS solution. **Theriogenology**, v.45, p.168, 1996. Abstract.

Santos, R.M., Barreta, M.H., Mezzalira, J.C., et al., Vitriificação de ovócitos bovinos em nitrogênio líquido com atmosfera normal ou vácuo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32 errata s/p. 2004. Suplemento.

Santos, R.M. Criopreservação de ovócitos bovinos por vitriificação (Dissertação de Mestrado Centro de Ciências Agroveterinárias), Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages SC, 29p., 2005.

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.

Thibier, M. More than half a milion bovine embryos transferred in 2002. **Embryo Transfer Newsletter**, v.21, p.12-19, 2003.

Thibier, M. Stabilization of numbers of in vivo collected embryos in cattle but significant increases of in vitro bovine produced embryos in some parts of the world.

Embryo Transfer Newsletter, v. 22, p.12-19, 2004.

Vajta, G.; Holm, P.; Greve, T.; Callesen, H. Factors affecting survival rates of in Vitro produced bovine embryos after vitrification and direct in-straw rehydration. **Anim. Reprod. Sci.**, v45, 191-200, 1996.

Reprod. Sci., v45, 191-200, 1996.

Vajta, G.; Booth, P.J.; Holm, P. et al. Successful vitrification of early-stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. **Cryo-letters**, v.18, p.191-195, 1997a.

Vajta, G.; Holm, P.; Greve, T.; Callesen, H. Survival and development of bovine blastocysts produced in vitro after hatching, vitrification and in-straw direct rehydration.

J. Reprod. and Fertil., v.111, p.65-70, 1997b.

Vajta, G.; Hyttel, P.; Callesen, H. Morphological changes of in-vitro produced bovine blastocysts after vitrification, in-straw direct rehydration, and culture. **Mol. Reprod. Devel.**, v.48, p.9-17, 1997c.

Devel., v.48, p.9-17, 1997c.

Vajta, G.; Holm, P.; Greve, T.; Callesen, H. The Submarine Incubation System, a new tool in vitro embryo culture. A technique report. **Theriogenology**, v.48, p.1379-1385,

1997d.

Vajta, G.; Holm, P.; Kuwayama, M. et al. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v.51, n.1, p.53-58, 1998.

Vajta, G.; Rindom, N.; Peura, T.T. et al. The effect of media, serum and temperature on in vitro survival of bovine blastocysts after open pulled straw (OPS) vitrification. **Theriogenology**, v.52, p.939-48, 1999.

Visintin, J.A.; Martins, J.F.P.; Bevilacqua, E.M. et al. Cryopreservation of *Bos taurus* vs *Bos indicus* embryos: Are they really different? **Theriogenology**, v.57, p.345-59, 2002.

Wright, R.W.; Ellington, J. Morphological and physiological differences between in vivo and in vitro-produced preimplantation embryos from livestock species. **Theriogenology**, v.44, p.1167-89, 1995.

Zeron, Y.; Pearl, M.; Borochoy, A.; Arav, A. Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes. **Cryobiology**, v.38, p.35-42, 1999.

ANEXO 01:

Trabalho apresentado no Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Goiânia 2005.

Embriões bovinos produzidos *in vitro* e vitrificados com diferentes crioprotetores, utilizando nitrogênio em atmosfera normal ou vácuo.

Bovine in vitro produced embryos vitrified with different cryoprotectants in normal atmosphere or vacuum nitrogen.

D.E. Werlich, F. B. Cruz, S. Bunn, K. C. Wentz, M. Francescato, M.H. Barreta, A. Mezzalira
Universidade do Estado de Santa Catarina UDESC – Centro de Ciências Agroveterinárias - Lages SC
E-mail: mezzalira@cav.udesc.br

Introdução

Inúmeros estudos têm sido direcionados para a criopreservação de ovócitos e embriões, buscando crioprotetores menos tóxicos, reduzindo o tempo de exposição e aumentando a taxa de resfriamento/reaquecimento. Metodologias que usam o contato direto com o nitrogênio, como grades metálicas, palhetas estiradas, crioloops, e micropipetas de vidro, entre outras, possibilitam maior taxa de resfriamento, proporcionando bons resultados, principalmente com ovócitos. Maiores taxas de resfriamento são obtidas com a aplicação de vácuo sobre o nitrogênio, o que reduz sua ebulição, aumentando a transmissão do calor. Este estudo teve por objetivo avaliar diferentes soluções crioprotetoras na vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIV), utilizando nitrogênio em atmosfera normal ou submetido ao vácuo.

Material e Métodos

Blastocistos expandidos (Bx) bovinos produzidos *in vitro* foram submetidos em D7 a um de quatro grupos experimentais e vitrificados em OPS, ou a um grupo controle (n=49) não vitrificado. No G1 (n=49) os Bx foram expostos por 1 minuto a 10% EG + 10% DMSO e por 20 segundos à solução de vitrificação (20% EG + 20% DMSO) e então mergulhados em nitrogênio. O G2 (n=46) constou do mesmo procedimento, porém com a vitrificação efetuada em nitrogênio submetido ao vácuo, até iniciar a solidificação. No G3 (n=50) os Bx foram expostos por 1 minuto a 10% EG + 10% PROH e por 20 segundos à solução de vitrificação (20% de EG + 20% de Propanediol) e então mergulhados em nitrogênio. O G4 (n=50) constou do mesmo procedimento, porém com a vitrificação efetuada em nitrogênio submetido ao vácuo. O vácuo foi produzido com um equipamento artesanal (Nitrocooler) constituído de uma bomba elétrica acoplada a um recipiente metálico revestido com isopor e contendo cerca de 300 mL de nitrogênio. O aquecimento foi realizado pela exposição (5 minutos cada) a concentrações decrescentes de sacarose (0,3 e 0,15M no G1 e G2) e (0,6 e 0,3M no G3 e G4). Todas as soluções foram preparadas em TCM 199, com HEPES e 10% de soro de égua em estro. Os embriões foram então submetidos a um período de cultivo de 48 horas, quando se avaliou as taxas de eclosão. Os dados de cinco repetições foram submetidos à análise de variância com 5% de significância.

Resultados e Discussão

As taxas de eclosão foram semelhantes em todos os tratamentos ($P > 0,05$), sendo 50,1% para os embriões vitrificados com EG+DMSO em atmosfera normal (G1); 50,2% para os embriões vitrificados com EG+DMSO em vácuo (G2); 56,0% para os embriões vitrificados com EG+PROH em atmosfera normal (G3); e 54,0% para os embriões vitrificados com EG+PROH em vácuo. O grupo controle apresentou 83,8% de eclosão. Diferente dos achados de Santos et al (2004) que obtiveram maior viabilidade com o uso de vácuo na vitrificação de ovócitos bovinos, neste estudo não foi observado efeito benéfico do vácuo na criopreservação de blastocistos. Este comportamento diferente pode dever-se ao fato dos blastocistos serem multicelulares, portanto com distinta relação superfície/volume e assim, distinto coeficiente de permeabilidade. As taxas de eclosão observadas com as duas soluções crioprotetoras são satisfatórias e semelhantes às aquelas já obtidas (49,6 a 54,0%) no laboratório (Mezzalira et al, 2004). Os resultados

obtidos permitem concluir que: O propanediol pode ser usado em substituição ao DMSO, proporcionando idêntica viabilidade na vitrificação de blastocistos bovinos produzidos in vitro; A utilização de nitrogênio submetido ao vácuo, embora possibilite aumentar a taxa de resfriamento e a viabilidade de ovócitos vitrificados, não tem efeito benéfico na vitrificação de blastocistos.

Referências bibliográficas

Mezzalira, A., Mezzalira, J.C., Moraes, A.N., et al., 2004 Vitrification of bovine IVP embryos: Age of embryos and exposure time to cryoprotectant influences viability. **Archives of Veterinary Science. 9:** 107-11.

Santos, R.M., Barreta, M.H., Mezzalira, J.C., et al., 2004. Suplemento. Vitrificação de ovócitos bovinos em nitrogênio líquido com atmosfera normal ou vácuo. **Acta Scientiae Veterinariae, 32:**errata s/p.

Palavras-chave: Vácuo, Vitrificação, Blastocistos, Propanediol, OPS.

Keywords: Vacuum, Vitrification, Blastocysts, Propanediol, OPS.

ANEXO 2

Foto do equipamento Nitrocooler, utilizado na vitrificação de embriões.

