



## Meios congelados na produção de embriões *in vitro* em bovinos

Frozen-thawed media for *in vitro* production of bovine embryo

Marcelo Marcos Montagner<sup>1</sup>, Jairo Pereira Neves<sup>2</sup>, João Francisco Coelho de Oliveira<sup>2</sup>,  
Marcelo Barcellos Rosa<sup>3</sup>, Marlon de Moraes Flores<sup>4</sup>, Ederson Bisognin Bortolotto<sup>1</sup>  
& Paulo Bayard Dias Gonçalves<sup>2</sup>

### RESUMO

A produção de embriões bovinos *in vitro* (PIV), atualmente, é laboriosa, apresenta custo relativamente elevado e alta variabilidade nos resultados. No sentido de torná-la mais simples, obter maior repetição nos resultados, diminuir custo e facilitar a sua utilização a campo, foram delineados experimentos para avaliar a eficácia de um sistema para PIV utilizando meios preservados pela congelamento. Inicialmente, em 3 replicações, um total de 534 oócitos foram divididos em dois grupos. No grupo tratamento, os meios utilizados na PIV (meio de maturação, Fert-TALP, sp-TALP 1x, sp-TALP 10x e KSOM modificado) foram preservados a -19°C e no grupo controle, utilizou-se meios refrigerados a 5°C e armazenados por no máximo 15 dias. Foi, também, verificado se ocorreram interações moleculares associativas nos meios devido à congelamento, para isso foram realizadas varreduras espectrais em cada meio, antes da congelamento e após 15, 30, 150 dias de preservação a -19°C. A maturação, a fecundação e o cultivo embrionário foram efetuados em TCM-199 modificado, Fert-TALP e KSOM modificado, respectivamente, em estufa a 39°C com 5% de CO<sub>2</sub> e umidade saturada. As percentagens de clivagem, de blastocistos expandidos (Bx)/oócitos e de Bx/clivados no grupo tratamento (73,5%; 17,5%; 23,9%, respectivamente) foram similares às obtidas no grupo controle (76,3%; 18,8%; 24,6%, respectivamente). Não se observaram modificações significativas nos meios, do ponto de vista de interações moleculares associativas, nas diferentes etapas examinadas pelas varreduras espectrais. A utilização de um sistema para PIV com meios preservados por congelamento não diminui a produção de embriões quando comparado ao sistema convencional. Esse sistema possibilita, também, a escolha das melhores partidas, as quais podem ser utilizadas por um longo período, fornecendo assim, melhores resultados com menor variabilidade. Além disso, o processo de produção de embriões *in vitro* fica mais prático, eficaz, econômico e acessível aos laboratórios menos equipados.

**Descritores:** maturação de oócitos, embriões, fecundação *in vitro*, congelamento de meios.

### ABSTRACT

The *in vitro* production of bovine embryos (IVP) is a complex, expensive process, and has variable results. The aim of this research was to develop a system of IVP, using frozen-thawed media to turn the process easier and less expensive. Initially, a total of 534 oocytes were used in this study, performing 3 replicates. The oocytes were divided into two groups. In the treatment group, the media used in IVP was preserved at -19°C. In the control group, the routine process was performed using fresh media preserved at 5°C up to 15 days. The possible molecular interaction of the different compounds of the media caused by freezing was verified using a spectrophotometer. The analyses were performed before freezing and after 15, 30 and 150 days maintained at -19°C. The oocytes and embryos were incubated at temperature of 39°C, an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air and saturated humidity. The maturation was accomplished in modified TCM-199 and the embryo culture was performed using KSOM. The percentage of cleavage, expanded blastocysts (Bx)/oocyte and Bx/cleavage in the treatment group (73.5%; 17.5%; 23.9%, respectively) were similar to those obtained in the control group (76.3%; 18.8%; 24.6%, respectively). No significant molecular interactions in the media were observed in the different stages examined. The efficiency of the frozen-thawed media is similar to the fresh media to produce embryos *in vitro*. With the frozen-thawed system, it is possible to work more time with batch that resulted in a higher rate of blastocyst. Therefore, this system allows obtain results with less variability. In addition, the *in vitro* production of bovine embryos becomes more practical, efficient, cheaper and possible to less equipped laboratories.

**Key words:** oocyte maturation, embryos, *in vitro* fertilization, freezing media.

## INTRODUÇÃO

A produção de embriões *in vitro* (PIV) é um instrumento auxiliar no melhoramento animal e é uma ferramenta com potencial para a formação de bancos de germoplasma na preservação de animais em extinção [3,6]. Na atualidade, o processo para PIV, em bovinos é complexo e laborioso devido às várias etapas até a transferência dos embriões. É difícil, também, manter uma constância nos resultados [1,4,5], sendo que um dos fatores que contribui para isso é a variação na qualidade das partidas de meios utilizados. Na metodologia tradicional, esses meios são conservados sob refrigeração e, para não perderem a sua qualidade, devem ser armazenados no máximo por 15 dias. Com isso, há necessidade de produção freqüente dos meios, o que eleva o custo e diminui a praticidade, bem como eleva o efeito das variações entre cada preparação sobre os índices de produção de embriões.

Neste trabalho, objetivou-se a implementação de um sistema de PIV utilizando meios preservados pela congelção. Através do qual, torna-se possível simplificar a metodologia envolvida na PIV, melhorar a qualidade e a repetição dos resultados, diminuir o custo, bem como facilitar a utilização da PIV no campo e em laboratórios menos equipados.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Para determinação da influência da preservação dos meios através da congelção sobre a PIV em bovinos, os oócitos, aspirados de folículos ovarianos com diâmetro entre 2 e 8mm, foram selecionados e maturados *in vitro*. A maturação dos oócitos foi realizada, durante 24 horas, em TCM-199 modificado, contendo 25mM de HEPES, 2,2mg de bicarbonato de sódio/100ml, 5mg de LH/ml, 0,5mg de FSH/ml e 10% de soro de vaca em estro (SVE). Para a maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário o cultivo foi efetuado em gotas de 200ml de meio, em placas de Petri (60mm), sob óleo de silicone e incubação a 39°C em uma atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> e umidade saturada. Durante a PIV, procurou-se manter a relação de 1 oócito ou embrião para cada 10ml de meio.

Visando a fecundação *in vitro*, um *pool* de sêmen congelado foi utilizado durante todos os experimentos. A recuperação espermática foi realizada com

a passagem do sêmen por gradientes de percol [8]. A inseminação (dia 0 da PIV) foi efetuada com a concentração de 2x10<sup>6</sup> espermatozoides/ml de meio Fert-TALP contendo 10mg de heparina/ml. O tempo de co-cultivo de espermatozoides e oócitos foi de 18 a 22 horas.

Após o período de fecundação, as células do cumulus foram retiradas com micropipeta e os possíveis zigotos de cada grupo foram lavados 3 vezes e colocados em meio de cultivo embrionário KSOM modificado [8] com 10% de SVE, na presença de monocamada de células epiteliais de oviduto. Passadas 48 horas da inseminação, somente as estruturas embrionárias com duas ou mais células foram mantidas na gota de co-cultivo e o desenvolvimento embrionário foi avaliado no dia 9 da PIV, para a observação de blastocistos expandidos (Bx).

Este experimento foi implementado em 3 replicações, no qual se utilizou um total de 534 oócitos. Esses oócitos foram divididos em dois grupos.

No grupo tratamento, os meios utilizados na PIV (meio de maturação, Fert-TALP, sp-TALP 1x, sp-TALP 10x e KSOM modificado) foram submetidos à congelção e preservação a -19°C. É importante salientar que os meios foram congelados prontos para serem utilizados, ou seja, filtrados e contendo substâncias como o soro, heparina e gonadotrofinas. O volume de meio congelado em cada alíquota foi calculado para a realização de uma replicação do experimento. Os recipientes utilizados foram tubos plásticos (corning de 15ml e eppendorff de 1,5ml).

No grupo controle, utilizou-se a metodologia convencional, com meios refrigerados a 5°C e armazenados por no máximo 15 dias, sendo utilizadas as mesmas partidas dos meios do grupo tratamento.

Foram verificados possíveis efeitos da congelção sobre a estrutura química dos meios, com relação a alterações moleculares associativas, para isso, realizaram-se varreduras espectrais [9]. Com esse objetivo, foram preparadas duas amostras com 5 ml de cada meio para cada etapa avaliada pelas varreduras espectrais. Em 3 replicações, foram avaliadas 4 etapas, dia 0, 15, 30 e 150. Sendo que se considerou dia 0 os meios refrigerados (5°C) e dias 15, 30 e 150, os meios congelados e preservados na temperatura de -19°C, respectivamente por 15, 30 e 150 dias.

As varreduras espectrais compreenderam a faixa espectral de 200–800nm para todas as amostras. Para a realização das varreduras, foi utilizado um espectrofotômetro Perkin Elmer - Lambda 16, com feixe duplo. Na Figura 1, está um fluxograma das atividades desenvolvidas para a realização deste experimento.

Para a realização da análise estatística, o delineamento experimental utilizado foi o de blocos inteiramente casualizados. Os diferentes tratamentos foram realizados simultaneamente, sendo que cada replicação foi considerada um bloco. Os resultados em porcentagens foram transformados pelo PROC RANK no programa estatístico SAS, com a finalidade de aplicação de testes paramétricos para a análise dos resultados. O modelo estatístico foi o seguinte:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \epsilon_{ij}$$

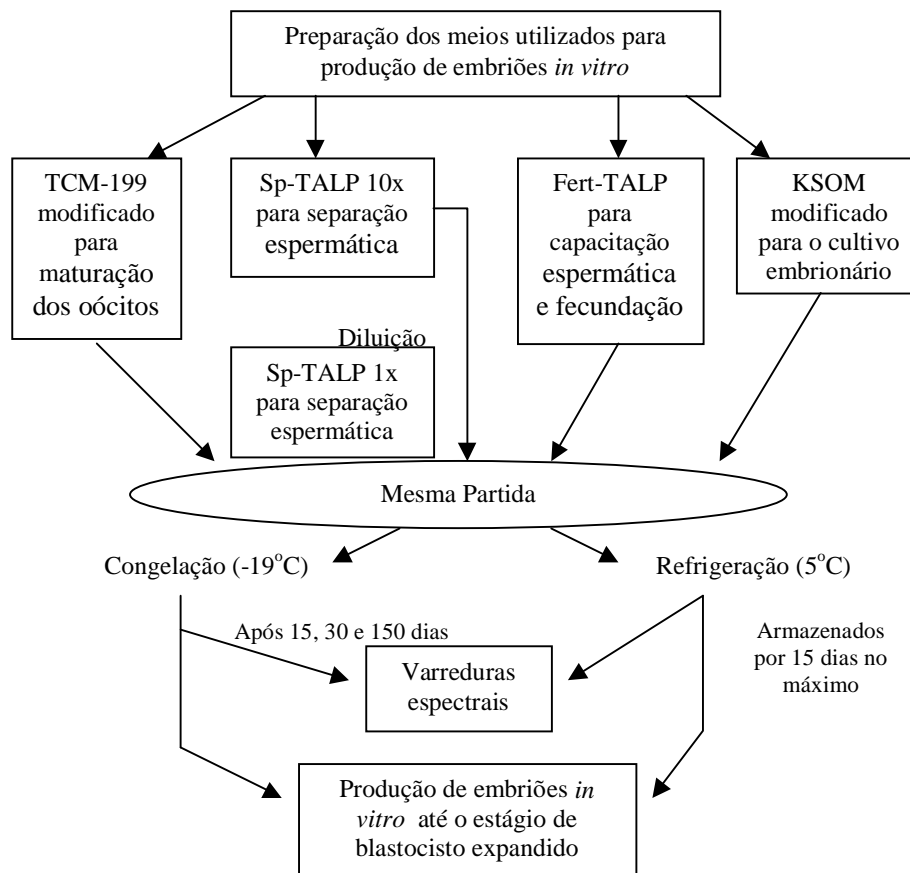
onde  $Y_{ij}$  é a variável dependente,  $\mu$  é a constante comum para todas observações,  $\alpha_i$  é o efeito dos tratamentos,  $\beta_j$  é o efeito dos blocos e o  $\epsilon_{ij}$  é o efeito do resíduo. Os dados serão apresentados com a média e o erro padrão da média.

## RESULTADOS

O sistema com meios congelados (tratamento) forneceu porcentagens de clivagem (73,5%), Bx/óocitos (17,5%) e Bx/clivados (23,9%) similares às obtidas com o sistema tradicional (controle; 76,3%; 18,8%; 24,6%, respectivamente; Figura 2;  $p > 0,75$ ). Não foi observada diferença quanto à quantidade de embriões produzidos nos dois sistemas.

Com base na análise dos resultados obtidos da varredura espectral dos meios (de maturação, Fert-TALP, sp-TALP 1x, sp-TALP 10x e KSOM modificado), em 3 replicações, não foram observadas alterações, quanto a interações moleculares associativas, nesses meios nas diferentes etapas avaliadas, pois o  $\lambda_{\text{máximo}}$  não variou em nenhuma replicação (Tabela 1).

O sistema com meios congelados forneceu maior praticidade na preparação dos meios para PIV, bem como uma maior economia de material utilizado como meios, filtros, seringas, recipientes, ponteiras, etc. Além disso, com o sistema congelado, houve uma economia de tempo, aproximadamente 6 horas, em cada rotina de PIV.



**Figura 1.** Metodologia utilizada para avaliar a influência da congelação dos meios sobre a produção de embriões *in vitro*.

## DISCUSSÃO

Os meios para PIV têm a temperatura de solidificação mais baixa que a da água, ocorrendo a propriedade coligativa conhecida como crioscopia [2]. Segundo essa propriedade, em meios binários (um sólido com um líquido), durante a solidificação, ocorrem interações de forma que a temperatura em que se separa o primeiro cristal da solução sólida é a temperatura de solidificação da solução líquida e existem duas temperaturas de solidificação, a inicial e a final [7]. Como os meios para PIV são complexos, é difícil prever e determinar qual a temperatura exata para total solidificação dessas soluções, mas no processo de congelamento a -19°C, realizado neste trabalho, foi atingida a temperatura de solidificação inicial

dos meios, porém não sabemos se foi atingida a temperatura de solidificação final. Portanto, não há como afirmar que os meios foram congelados totalmente, mas o termo congelamento, mesmo assim, parece cabível e adequado.

Durante a solidificação, há uma variação contínua da composição das fases líquida e sólida da solução [7]. Nos meios para PIV, devido à sua complexa composição, é difícil fazer uma previsão da variabilidade físico-química da solução com a congelamento. Porém, nas medidas espectrofotométricas dos meios avaliados antes da congelamento e após a congelamento e preservação, por 15, 30 e 150 dias, a -19°C, não foram observadas bandas secundárias, o que é indicativo de que não ocorreram alterações estruturais associativas devido à congelamento (Tabela 1).

**Tabela 1.** Varredura espectral (200-800nm) dos meios Fert-TALP, sp-TALP 1x, sp-TALP 10x, meios de maturação (MM) e KSOM com 10% de soro fetal bovino (KSOM), antes da congelamento (dia 0) e após permanecerem 15, 30 e 150 dias congelados a -19°C.

Meio Analisado	$\lambda^*$ máximo (nm)	Dia (Absorbância)			
		0	15	30	150
Fert-TALP	273,6	1,0010	1,0436	1,0348	1,03010
Sp-TALP 1X	N.O.**	N.O.	N.O.	N.O.	N.O.
Sp-TALP 10X	318,4	0,2205	0,2283	0,2276	0,2265
MM***	560,0	0,1949	0,2025	0,2012	0,1980
	276,0	0,7796	0,7856	0,7823	0,7842
KSOM	276,8	0,6246	0,6149	0,6172	0,6178

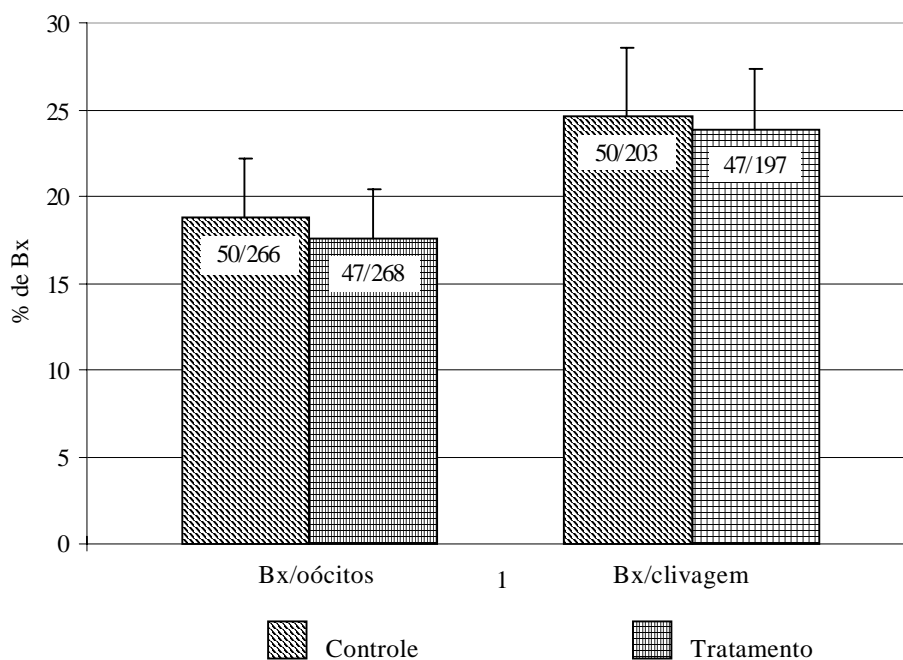
\* $\lambda$  - comprimento da onda \*\* N.O. - Não observado, valores menores que o limite de detecção do aparelho  
 \*\*\*MM - No meio de maturação houveram dois picos na varredura espectral, por isso aparecem dois  $\lambda_{\text{máximos}}$  na tabela.

Com a congelamento e descongelamento, alguns elementos dos meios podem diminuir a atividade biológica, mas o sistema com meios congelados não diminuiu os índices de produção de embriões, quando comparado ao sistema tradicional (Figura 2). Isso sugere que se há alguma perda na atividade biológica dos elementos nos meios congelados a -19°C, essa não influencia na maturação do oócito, na fecundação e no desenvolvimento embrionário.

É previsível, também, que os meios preservados a -19°C mantenham a qualidade por um período bem mais longo, talvez anos, do que quando são armazenados sob refrigeração. Dessa forma, melhores partidas de meios podem ser escolhidas e utilizadas por mais tempo, bem como grandes volumes de meio podem ser preparados, com menor erro e sem desperdício,

contribuindo, assim, para obtenção de resultados melhores e mais constantes. O sistema de meios congelados torna a PIV mais prática e econômica, pois há uma economia significativa de tempo, de mão-de-obra e de materiais utilizados. Também, permite que os meios sejam fornecidos por centros produtores para equipes ou laboratórios de PIV menos estruturados.

A congelamento dos meios é importante para a realização de pesquisas relacionadas com a PIV, pois, quando se avaliam diferentes substâncias ou concentrações, cada replicação implica em muitas manipulações. Com essa metodologia, faz-se as manipulações, preparação das soluções para todas as replicações, em um único dia, com maior quantidade de meio e de substâncias envolvidas na pesquisa, com menor gasto de tempo e material, bem como menor erro nos experimentos.



**Figura 2.** Porcentagem de blastocistos expandidos (Bx) com diferentes sistemas de produção de embriões *in vitro*, utilizando-se meios refrigerados (controle) ou meios preservados por congelamento (tratamento). Cada barra representa a média e o erro padrão da média de 3 replicações. Não houve diferença entre os diferentes sistemas quanto a produção de blastocistos expandidos ( $p > 0,75$ ).

## CONCLUSÕES

A utilização de um sistema para PIV com meios preservados através da congelamento não diminui o índice de produção de embriões quando comparado ao sistema convencional, possibilitando a escolha das

melhores partidas, as quais podem ser utilizadas por longo período. Assim, o sistema com meios congelados permite obter melhores resultados com maior repetição, praticidade, eficácia e economia no processo de produção de embriões *in vitro*.

## REFERÊNCIAS

- 1 Carolan C., Lonergan P. & Van Langendonck A. 1995. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Theriogenology*. 43: 1115-1128.
- 2 Castellan G. 1986. *Fundamentos de físico-química*. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 527p.
- 3 Foote R.H. 1996. Review: Dairy Cattle Reproductive Physiology Research and Management - Past Progress and Future Prospects. *Journal of Dairy Science*. 79: 980-990.
- 4 Fukui Y., McGowan L. T. & James R. W. 1991. Factors affecting the *in vitro* development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*. 92: 125-131.
- 5 Liu Z. & Foote R. H. 1995. Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O<sub>2</sub>. *Biology of Reproduction*. 53: 786-790.
- 6 Pieterse M. C. & Kappen K. A. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*. 30: 751-762.
- 7 Pilla L. 1980. *Físico-química*. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 912p.
- 8 Rosenkrans Jr. C. F., Zeng G. Q. & McNamara G. T. 1993. Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. *Biology of Reproduction*. 49: 459-462.
- 9 Vogel J. B. 1992. *Análise química quantitativa*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 690p.