

## CONGELAMENTO ULTRA-RÁPIDO DE EMBRIÕES *Mus musculus* COM A UTILIZAÇÃO DE SACAROSE E LACTOSE\*

### ULTRA-RAPID FREEZING OF *Mus musculus* EMBRYOS WITH SUCROSE AND LACTOSE

Mari Lourdes Bernardi \*\* Mara Iolanda Batistella Rubin \*\*\* André Metzdorf \*\*\*\*

#### RESUMO

Cento e seis mórulas de camundongos da cepa CF1 Suiço Albina, coletadas 76-78h após a administração de HCG, foram congeladas em solução de congelamento contendo glicerol 2,0M + sacarose 0,25M (Grupo S) ou Glicerol 2,0M + lactose 0,25M (Grupo L), ambas em PBS modificado. Foi efetuado um pré-tratamento com Glicerol 2,0M durante 4 minutos, sendo as mórulas transferidas, posteriormente, para a solução de congelamento, durante 1 minuto. O envase foi realizado em palhetas de 0,25ml em grupos de 5 a 11 mórulas. As palhetas contendo os embriões foram colocadas em vapor de N<sub>2</sub> durante 2 minutos e, após, mergulhadas em N<sub>2</sub> líquido. O descongelamento foi efetuado em banho-maria a 37°C por 20 segundos e foram recuperadas 103 mórulas após a diluição do crioprotetor, que foi efetuada em solução de sacarose 0,5M (Grupo S) e lactose 0,5M (Grupo L), durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Após três banhos em PBS, os embriões viáveis foram colocados em cultivo em PBS modificado, a 37°C, por 44-48h. Através da avaliação morfológica, após descongelamento, 45 mórulas (86,5%) foram consideradas viáveis no grupo S e 46 (90,2%) no grupo L. O percentual de embriões que se desenvolveram após cultivo foi de 67,3% para o grupo S (n=52) e 64,7% para o grupo L (n=51). A análise estatística não revelou diferenças significativas (P >0,01) no número de embriões viáveis após descongelamento e índice de sobrevivência após cultivo, entre os dois açúcares testados.

**Palavras-chave:** congelamento de embriões, sacarose, lactose

#### SUMMARY

One hundred and six Swiss Albin CF1 mouse morulae were frozen by ultra rapid method. The embryos were collected 76-78h after HCG administration and the freezing was done in glycerol 2.0M + sucrose 0.25M (Group S) or in glycerol 2.0M + lactose 0.25M (Group L), both in Modified Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS). Firstly, the embryos were placed in a equilibration medium containing 2.0M glycerol for 4 minutes after which the morulae were transferred to a freezing solution for 1 minute. The embryos were loaded in groups of 5 to 11 in 0.25ml plastic straws. These straws were maintained for 2 minutes in nitrogen vapour and then plunged into liquid nitrogen. After thawing at 37°C for 20 seconds, one hundred and three morulae were recovered. The cryoprotectant was diluted in 0.5M sucrose solution (Group S) or 0.5M lactose solution (Group L), for 5 minutes at room temperature. After three baths in PBS the viable embryos were cultured in Modified PBS at 37°C, for 44-48h. Through morphological evaluation, 45 (86.5%) and 46 (90.2%) morulae were considered viable after the cryoprotectant dilution in the groups S and L, respectively. The development rate was 67.3% (n=52) with Group S and 64.7% (n=51) with group L. No significant differences (P >0,01) were observed in embryo viability or in survival rate after thawing and culturing, with both sugars.

**Key-words:** embryo freezing, sucrose, lactose

#### INTRODUÇÃO

As pesquisas que envolvem o congelamento de

\* Trabalho apresentado na III Reunião Anual e I Reunião Internacional da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões (SBTE) - Santa Maria, RS, 1988.

\*\* Professor Assistente do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) - Caixa Postal 776 - 90001-970 - Porto Alegre, RS.

\*\*\* Professor Adjunto, Doutor do Departamento de Clínica de Grandes Animais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) - 97119-900 - Santa Maria, RS

\*\*\*\* Médico Veterinário - Aluno do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Reprodução Animal, da UFSM.

embriões de mamíferos visam, principalmente na última década, à simplificação das técnicas utilizadas através de princípios como: redução do número de passos, diminuição de tempo gasto no processo de congelamento e a utilização de equipamentos pouco sofisticados. Neste sentido, a velocidade de congelamento tem sido aumentada através da utilização de técnicas como a denominada "two-step" (WOOD & FARRANT, 1980) e mais recentemente, o processo de vitrificação (RALL & FAHY, 1985) ou o congelamento ultra-rápido (TAKEDA et al, 1984; TAKAHASHI & KANAGAWA, 1985; WILLIAMS & JONSHON, 1986; SZÉLL & SHELTON, 1987).

Os experimentos de KASAI et al (1981 e 1983) demonstraram que, como um soluto não permeável, a sacarose determina a desidratação parcial e conseqüente proteção eficaz de mórulas de camundongos quando mantidas a 0°C, antes ou após o congelamento. Misturas de glicerol e sacarose em diversas concentrações vêm sendo testadas no congelamento ultra-rápido de embriões de camundongos (TAKEDA et al, 1984; WILLIAMS & JOHNSON, 1985; SZÉLL & SHELTON, 1987; REICHENBACH & RODRIGUES, 1988), ratos (CHUPIN & DE REVIERS, 1986) e bovinos (CHUPIN, 1986 e 1987). Além da sacarose, KRAG et al (1985) utilizaram trealose e TAKAHASHI & KANAGAWA (1985) verificaram o efeito da rafinose, glicose, xilose e lactose no congelamento ultra-rápido de embriões de camundongos.

A colocação dos embriões em solução de PBS contendo apenas glicerol no sentido de promover um equilíbrio, antes da passagem para a solução de congelamento contendo glicerol mais sacarose ou glicerol mais lactose, já foi avaliada por alguns autores (BIERY et al, 1986; SZÉLL & SHELTON, 1987; TAKAHASHI & KANAGAWA, 1988).

O cultivo *in vitro*, após o descongelamento, foi efetuado no intuito de comparar o efeito de sacarose e lactose 0,25M em associação ao glicerol 2,0M, na viabilidade de mórulas de camundongos congeladas pelo método ultra-rápido.

## MATERIAL E MÉTODOS

Fêmeas *Mus musculus* da cepa Suiço Albina CF1, com 8 a 11 semanas de idade, foram superovuladas com 5-8UI de eCG<sup>a</sup> e 5-8UI de HCG<sup>b</sup> num intervalo de 48 horas. Os embriões foram coletados 76 a 78 horas após a administração de HCG através de lavagem dos ovidutos e cornos uterinos com 0,3ml do meio PBS modificado (ELSDEN & SEIDEL, 1982), preparado com MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ao invés de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O. Como suplementação protéica foi acrescentado 20% de soro fetal bovino - SFB.<sup>c</sup>

Mórulas classificadas morfológicamente como excelente (Grau I) e boas (Grau II) foram utilizadas para

congelamento. Os embriões selecionados para congelamento foram submetidos a um pré-tratamento em 0,2ml de uma solução de glicerol<sup>d</sup> 2,0M em PBS acrescido de SFB, durante 4 minutos, à temperatura ambiente (18-22°C). Posteriormente, os embriões foram aspirados e colocados em 0,05ml de solução de congelamento composta de glicerol 2,0M + sacarose<sup>d</sup> 0,25M (Grupo S) ou glicerol 2,0M + lactose<sup>d</sup> 0,25M (Grupo L), por 1 minuto, à temperatura ambiente. Durante este período, os embriões foram envasados em palhetas de 0,25ml<sup>e</sup>, em grupos de 5 a 11, sendo mantidos durante 2 minutos em vapor de N<sub>2</sub>, próximo ao nível superior de um banho de N<sub>2</sub> líquido de aproximadamente 7cm e, então, mergulhados no N<sub>2</sub> líquido. Este procedimento foi efetuado em caixa de isopor medindo 35x29x23cm. Por ocasião do envase as extremidades das palhetas foram preenchidas com solução para diluição do crioprotetor.

Foram congeladas 54 mórulas utilizando sacarose e 52 mórulas com lactose. Após um período de armazenamento que variou de 1 a 6 dias, os embriões foram descongelados em banho-maria a 37°C por 20 segundos. A diluição do crioprotetor foi efetuada em 0,5ml de solução de sacarose 0,5M (Grupo S) ou lactose 0,5M (Grupo L) durante 5 minutos, à temperatura ambiente.

Os embriões recuperados foram submetidos a três passagens em PBS modificado, após as quais a viabilidade dos mesmos foi avaliada através de critério morfológico. Os embriões considerados viáveis foram colocados em cultivo em placas de poliestireno (0 35mm)<sup>f</sup> contendo aproximadamente 3ml de PBS modificado. O cultivo foi realizado em estufa a 37°C e atmosfera úmida, durante 44 a 48 horas.

O índice de sobrevivência após cultivo foi determinado através do número de embriões que se desenvolveram até o estágio de blastocisto expandindo (Bx), blastocisto em eclosão (Bh) ou blastocisto eclodido (Be). O percentual de sobrevivência foi calculado considerando o número de embriões que foram recuperados após a diluição do crioprotetor. Todas as avaliações dos embriões foram processadas sob estereomicroscópio, num aumento de 60 vezes. Os resultados obtidos foram analisados e comparados através do teste qui-quadrado.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O percentual de embriões considerados viáveis após o descongelamento, diluição do crioprotetor e passagem por três banhos em PBS modificado é apresentado na Tabela 1. Dos embriões congelados com sacarose, 86,5% foram considerados viáveis após a diluição do crioprotetor, enquanto um percentual de 90,2% foi obtido no grupo de embriões congelados com lactose.

Estes resultados não diferiam significativamente entre si ( $P > 0,01$ ).

Na Tabela 1 também está representado o índice de sobrevivência, após 44-48h de cultivo. No grupo com sacarose obteve-se um índice de sobrevivência de 67,3% o qual foi semelhante ( $P > 0,01$ ) ao índice de 64,7%, obtido no grupo de embriões congelados com lactose.

Os resultados obtidos demonstraram que embriões de camundongos podem sobreviver ao processo de congelamento por imersão direta em  $N_2$  líquido, com acréscimo de sacarose ou lactose à solução de congelamento.

A realização de pré-tratamento em glicerol propiciou efeitos benéficos nos embriões de camundongos de 8 a 16 células, conforme demonstrado por SZÉLL & SHELTON (1986b), sendo inclusive observado que o período de desidratação em glicerol + sacarose não interferiu na obtenção de índices de sobrevivência. BIERY et al (1986) também obtiveram altos índices de sobrevivência quando usaram pré-tratamento gradativo com três passos em glicerol 3,5M + sacarose 0,5M. Porém, WILLIAMS & JOHNSON (1986) verificaram que, na concentração de glicerol 2,0M, os resultados com pré-tratamento foram inferiores (38%) aos obtidos com ausência de pré-tratamento (67%), apesar desta diferença não ter sido demonstrada nas outras concentrações de glicerol. Desta forma, os índices de 67,3% e 64,7%, obtidos neste experimento foram superiores aos obtidos por WILLIAMS & JOHNSON (1986) e SZÉLL & SHELTON (1987) quando a concentração de glicerol 2,0M foi utilizada, embora os últimos autores tenham obtido maiores índices de sobrevivência em concentração mais elevadas de glicerol. Quando o pré-tratamento foi efetuado em solução contendo apenas glicerol 2,0M ou glicerol 2,0M + lactose 0,25M, TAKAHASHI & KANAGAWA (1988) obtiveram bons resultados (71-86%) com ambos os procedimentos, sendo inclusive superiores aos verificados no presente experimento.

A exposição de embriões à sacarose, antes da sua colocação em glicerol + sacarose, parece influenciar negativamente na sobrevivência embrionária, quando comparada com a permeação prévia em glicerol, tendo

SZÉLL & SHELTON (1986b) sugerido que a exposição prévia ou concomitante a soluções de sacarose afeta desfavoravelmente a permeação do glicerol.

Embora tenha sido demonstrado o efeito benéfico da sacarose no armazenamento de embriões a 0°C (KASAI et al, 1981 e 1983), a mesma foi incapaz de conferir proteção aos danos do congelamento, quando utilizada sem adição de outro crioprotetor (WILMUT, 1972; KASAI et al, 1981). É evidente o fato de que a

desidratação prévia conferida pela sacarose ou outros açúcares permite o congelamento em velocidade extremamente rápida. Mesmo assim, o exato mecanismo de proteção conferido pela associação destes açúcares com glicerol ou DMSO ainda não está completamente elucidado. O mecanismo não pode ser explicado apenas pela proteção contra os efeitos de solução visto

que, como exposto por SZÉLL & SHELTON (1986b), apesar dos menores tempos de exposição a estes efeitos, maiores níveis de glicerol são necessários para proteger os embriões congelados pelo método ultra-rápido, quando comparadas às concentrações utilizadas no congelamento lento. Quando constataram que a exposição prévia à sacarose reduziu a taxa de permeação do glicerol, com conseqüente diminuição do índice de sobrevivência, SZÉLL & SHELTON (1987) levantaram a hipótese de que o glicerol protege o embrião durante o congelamento ultra-rápido reduzindo as diferenças de pressão osmótica entre os espaços intra e extracelulares, principalmente pela sua habilidade em reduzir a quantidade de gelo formada, em baixas temperaturas.

Apesar das investigações constantes, ainda não existe uma uniformidade na metodologia empregada e nos resultados obtidos com o congelamento ultra-rápido. Assim, considera-se que os resultados divergentes obtidos por diversos pesquisadores pode ser devido a diferenças no processo de congelamento, tais como: execução ou não de pré-tratamento em solução contendo crioprotetores, associados ou não a açúcares; tempo e temperatura de desidratação; concentração dos solutos crioprotetores; estágio de desenvolvimento embrionário; processo de envase e colocação de  $N_2$  líquido.

Além da necessidade de avaliar o desenvolvimento *in vivo* de embriões congelados com os métodos

TABELA 1 - Viabilidade de mórulas de camundongos congeladas pelo método ultra-rápido, após descongelamento e cultivo.

| Grupo | Embriões        |                  |          |      |                 |      |
|-------|-----------------|------------------|----------|------|-----------------|------|
|       | Congelados<br>n | Recuperados<br>n | Viáveis* |      | Desenvolvidos** |      |
|       |                 |                  | n        | %    | n               | %    |
| S     | 54              | 52               | 45       | 86,5 | 35              | 67,3 |
| L     | 52              | 51               | 46       | 90,2 | 33              | 64,7 |

\* Após descongelamento e diluição do crioprotetor

\*\* Após cultivo por 44-48 horas.

empregados neste experimento, outras investigações deverão ser efetuadas para avaliar qual a combinação de glicerol e açúcares que poderá determinar um aumento da viabilidade dos embriões após o descongelamento.

É provável que maiores concentrações de glicerol na solução de congelamento possam melhorar os índices de sobrevivência, após descongelamento e cultivo, conforme já verificaram TAKEDA et al (1984) e SZÉLL & SHELTON (1987).

## FONTES DE AQUISIÇÃO

- a - INTERGONAN- Vermie Veterinar Chemie, 4152 Kempen 1, RFA
- b - PRIMOGONYL- Schering - Pharma D - 100 Berlin 65, RFA
- c - LABORCLIN- Cassiano Ricardo, 455 - Pinhais. 83321-090 - Piraquara, PR.
- d - MERCK S.A - Cx.P. 55077 - 22732-970 - Rio de Janeiro, PR.
- e - IMV - L'Aigle - France .
- f - DESCARPLAST - Estrada dos Menezes, 255. 24451-230 - São Gonçalo, RJ.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIERY, K.A., SEIDEL Jr., G.E., ELSDEN, R.P. Cryopreservation of mouse embryos by direct plunging into liquid nitrogen. *Theriogenology*, v. 25, n. 1, p. 140, 1986.
- CHUPIN, D. Quick freezing of bovine blastocysts. *Theriogenology*, v. 25, n. 1, p. 147, 1986.
- CHUPIN, D. Quick freezing of day 7 bovine blastocysts: optimum parameters of dehydration step. *Theriogenology*, v. 27, n. 1, p. 219, 1987.
- CHUPIN, D., DE REVIERS, M.M. Quick freezing of rat embryos. *Theriogenology*, v. 26, n. 2, p. 157-165, 1986.
- ELSDEN, R.P., SEIDEL Jr, G.E. *Embryo Transfer Procedures for cattle* Colorado: Colorado State University, 1982. 41 p.
- KASAI, M., NIWA, K., IRITANI, A. Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. *J Reprod Fert*, v. 63, p. 175-180, 1981.
- KASAI, M., NIWA, K., IRITANI, A. Protective effect of sucrose on the survival of mouse and rat embryos stored at 0°C. *J Reprod Fert*, v. 68, p. 377-380, 1983.
- KRAG, K.T., KOEHLER, I.M., WRIGHT Jr., R.W. Trehalose: a non permeable cryoprotectant for direct freezing of early stage murine embryos. *Theriogenology*, v. 23, n. 1, p. 200, 1985.
- RALL, W.F., FAHY, G.M. Ice free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, v. 313, p. 573-575, 1985
- REICHENBACH, H.D., RODRIGUES, J.L. Survival of mouse morulae and early blastocysts after direct plunging into liquid nitrogen. *Theriogenology*, v. 29, n. 1, p. 294, 1988.
- SZÉLL, A., SHELTON, J.N. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. *J Reprod Fert*, v. 78, p. 699-703, 1986.
- SZÉLL, A., SHELTON, J.N. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol-sucrose solutions on day-3 mouse embryos. *J Reprod Fert*, v. 80, p. 306-316, 1987.
- TAKAHASHY, Y., KANAGAWA, H. Quick freezing of mouse embryos by direct plunge into liquid nitrogen vapor: effects of sugars. *Jpn J Vet Res*, v. 33, p. 141-144, 1985.
- TAKAHASHY, Y., KANAGAWA, H. The role of lactose in quick freezing of mouse embryos. *Theriogenology*, v. 29, n. 1, p. 315, 1988.
- TAKEDA, T., ELSDEN, R.P., SEIDEL Jr., G.E. Cryopreservation of mouse embryos by direct plunging into liquid nitrogen. *Theriogenology*, v. 21, p. 266, 1984.
- WILLIAMS, T.J., JOHNSON, S. E. Quick freezing of day four mouse embryos. *Theriogenology*, v. 23, n. 1, p. 235, 1985.
- WILLIAMS, T.J., JOHNSON, S.E. A method for one-step freezing of mouse embryos. *Theriogenology*, v. 26, n. 1, p. 125-133, 1986.
- WILMUT, I. Effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stages development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Science*, v. 11, p. 1071-1079, 1972.
- WOOD, M.J., FARRANT, J. Preservation of mouse embryos by two-step freezing. *Cryobiology*, v. 17, p. 178-180, 1980.