

CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES DE CAMUNDONGOS E BOVINOS UTILIZANDO METANOL COMO CRIOPROTETOR¹

CARLOS MIGUEL JAUME² e ANA LÚCIA CAMPOS³

RESUMO - Embriões de camundongos coletados no quarto dia após a injeção de HCG foram colocados diretamente em uma solução 3 M de metanol em PBS suplementado com 10% de soro fetal bovino (PBSS), à temperatura ambiente, durante dez minutos. Foram acondicionados em "paillets" de 0,25 ml e colocados diretamente a -10°C durante cinco minutos antes e durante seis minutos depois de induzir a formação de gelo. O descongelamento foi realizado em banho-maria a 37°C durante 20 segundos. Os embriões foram colocados diretamente em PBSS, lavados duas vezes e colocados em cultura utilizando meio T₆ suplementado com 10% de soro fetal bovino, a 37°C numa atmosfera umedecida de 5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂. Os embriões bovinos foram coletados de fêmeas superovuladas, sete dias após o cio, e processados da mesma maneira que os embriões de camundongo. Dos 104 embriões de camundongo criopreservados e descongelados, 48,2% continuaram seu desenvolvimento em cultura. Dos 20 embriões bovinos criopreservados e descongelados, oito foram transferidos diretamente a receptoras, e doze foram colocados em cultura. Nenhuma das receptoras ficou gestante e nenhum dos embriões continuou seu desenvolvimento em cultura.

Termos para indexação: soro fetal bovino, mergulhados em nitrogênio líquido, fêmeas superovuladas.

CRYOPRESERVATION OF MOUSE AND BOVINE EMBRYOS USING METHANOL AS CRYOPROTECTANT

ABSTRACT - Mouse embryos were collected from superovulated animals on the fourth day after HCG injection. They were put directly into a solution of 3 M methanol in PBSS at room temperature during ten minutes. Thawing was carried out in a waterbath at 37°C during 20 seconds. Embryos were placed directly into PBSS washed twice and put into culture using medium T₆ supplemented with 10% fetal calf serum at 37 °C in a humid atmosphere of 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂. Bovine embryos were cultured under the same conditions, only using PBS supplemented with 20% fetal calf serum as culture medium. Of the 104 frozen mouse embryos, 48,2% continued developing in culture after thawing. None of the eight bovine embryos that were thawed and transferred directly to recipients resulted in pregnancy and none of the twelve bovine embryos that were thawed and put into culture continued to develop.

Index terms: superovulated animals, plunged directly into liquid nitrogen, fetal calf serum.

INTRODUÇÃO

Uma das conseqüências da presença de substâncias crioprotetoras que penetram nas células, quando

são descongeladas e colocadas no seu ambiente fisiológico, é a possibilidade de sua destruição, em decorrência do enchimento brusco das células, causado pela diferença da pressão osmótica entre o meio interno e o externo, e a diferença de velocidade com que atravessam as membranas celulares a água e as substâncias crioprotetoras. Portanto, é necessário remover gradativamente as substâncias crioprotetoras dos embriões descongelados antes de transferi-los para receptoras, controlando, desta maneira, a velocidade com a qual a água penetra nas células para diluir a concentração intracelular do crioprotetor (Leibo & Mazur 1978, Willadsen et al. 1978).

¹ Aceito para publicação em 22 de março de 1989.

Convênio EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite e Centro de Biologia da Reprodução, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

² Eng. - Agr., Ph.D., EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite (CNPGL), Rodovia MG 133, km 42d, CEP 36155 Coronel Pacheco, MG.

³ Biol., EMBRAPA/CNPGL.

O metanol oferece crioproteção a células (Hudita 1959, Meryman 1968, Ashwood-Smith & Lough 1975) e a embriões de camundongos (Rall et al. 1984). Além do mais, o uso do metanol como crioprotetor na criopreservação de embriões, por possuir a propriedade de entrar e sair das células muito rapidamente (Naccache & Sha'afi 1973), oferece, ainda, a vantagem de que os embriões, uma vez descongelados, possam ser transferidos diretamente às receptoras, sem necessidade da retirada prévia do crioprotetor (Rall et al. 1984).

O presente trabalho foi planejado para testar o uso do metanol como substância crioprotetora na criopreservação de embriões de camundongos e de bovinos.

MATERIAL E MÉTODOS

Camundongos

Foram superovuladas fêmeas F_1 de camundongos Suíço x C57 de três semanas de idade e acasaladas com machos suíços, do biotério do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), para a produção de embriões. Para provocar a superovulação, os animais receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) de 5 UI de gonadotrofina placentária equina (PMSG), seguida 48 h mais tarde por outra injeção i.p. de 5 UI de gonadotrofina coriônica humana (HCG). Após a segunda injeção, as fêmeas foram acasaladas em gaiolas individuais com machos de fertilidade comprovada. Quatro dias após a segunda injeção, os animais foram sacrificados, e as trompas, junto com a porção terminal dos cornos uterinos, foram lavadas com meio de Dulbecco (Dulbecco & Vogt 1954) modificado por Whittingham (1971), e suplementado com 10% de soro fetal bovino (PBSS), para a colheita de embriões. Após a colheita, os embriões foram lavados seis vezes em meio estéril, e os considerados anormais, descartados. Os embriões morfologicamente normais de cada colheita foram divididos aleatoriamente em três grupos: C_1) um grupo controle da qualidade dos embriões; C_2) um grupo controle do efeito do crioprotetor sobre os embriões; e um grupo criopreservado.

O grupo C_1 permaneceu no meio PBSS até que os embriões a serem criopreservados fossem induzidos à formação de gelo ou nucleação, quando foram colocados em cultura. Os grupos C_2 e o de criopreservação foram colocados diretamente numa solução 3 M de metanol em PBSS. O grupo de embriões que

foi criopreservado permaneceu na solução de metanol 3 M durante dez minutos, depois, eles foram acondicionados em paillets de 0,25 ml e colocados diretamente a -10°C . Após cinco minutos, a essa temperatura, foi induzida a formação de gelo, e eles permaneceram mais seis minutos na mesma temperatura. Após a indução de gelo nos embriões a serem criopreservados, os embriões do grupo C_2 foram lavados em PBSS e colocados em cultura. Uma vez transcorridos os seis minutos de equilíbrio, após a nucleação a -10°C , os embriões a serem criopreservados foram submetidos à queda de temperatura de $0,5^{\circ}\text{C}$ por minuto até -30°C , quando foram mergulhados diretamente em nitrogênio líquido a -196°C .

Os embriões ficaram no nitrogênio líquido durante um período de tempo, variando de um dia a um ano. A descongelação foi realizada em banho-maria a 37°C , durante 20 segundos, e os embriões, despejados dos pailletes diretamente em PBSS, onde permaneceram durante dez minutos; logo depois foram lavados duas vezes em PBSS e colocados em cultura.

A cultura *in vitro* dos embriões foi realizada no meio T_6 (Quinn & Whittingham 1980), suplementado com 10% de soro fetal bovino, a 37°C , numa atmosfera umedecida de 5% CO_2 , 5% O_2 e 90% N_2 , durante 24 horas.

Bovinos

Os embriões foram obtidos por colheita não-cirúrgica de fêmeas mestiças Holandês x Zebu (Gir e Guzerá) superovuladas do rebanho do Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite, da EMBRAPA. A superovulação foi estimulada mediante uma injeção subcutânea de 70 mg de um extrato de hipófise de cavalo (Moore & Shelton 1964) por dia, durante três dias consecutivos, iniciadas entre o dia 8 e 12 do ciclo estral. Todos os animais receberam, junto com a terceira dose de extrato, uma injeção intramuscular de 25 mg de prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$. A detecção de cio foi realizada duas vezes ao dia, e os animais foram inseminados artificialmente 12 e 24 horas após a detecção de cio. Os animais foram submetidos à colheita não-cirúrgica de embriões, sete dias após a manifestação de cio.

O meio de cultura utilizado para a colheita, manipulação e cultura dos embriões foi o mesmo usado para os camundongos, sendo que para a colheita o meio foi utilizado sem suplementação, e, para a manipulação e cultura, foi suplementado com 20% de soro fetal bovino. Uma vez localizados os embriões, foram lavados pelo menos cinco vezes em meio de cultura estéril, e classificados, de acordo com sua

morfologia, em: 1) excelente (os sem nenhum defeito); 2) bom (os que apresentaram algum defeito, mas que não comprometiam a sua viabilidade); 3) defeituoso (os que apresentaram um ou mais defeitos que poderiam vir a comprometer sua viabilidade); e 4) não viável (os que não foram fertilizados, ou que estavam degenerados, sem possibilidades de sobrevivência).

No experimento foram utilizados 24 embriões classificação 1 e 2. Todos os embriões foram colocados diretamente na solução 3 M de metanol em PBSS, à temperatura ambiente, durante dez minutos. Um grupo de quatro embriões foi utilizado como grupo C₂ (controle do efeito do crioprotetor sobre os embriões). Os outros 20 embriões foram submetidas ao processo de criopreservação. O protocolo de criopreservação seguido com os embriões bovinos foi igual ao descrito para os embriões de camundongo. Os embriões do grupo C₂ permaneceram na solução 3 M de metanol até que o grupo de embriões a serem criopreservados tivessem sido induzidos à formação de gelo (20 a 30 minutos), quando foram colocados diretamente em PBSS durante dez minutos, e, após serem lavados duas vezes, foram colocados em cultura, no mesmo meio, em tubos fechados a 37°C durante 24 horas. Os embriões criopreservados permaneceram de 30 a 60 dias a -196°C em nitrogênio líquido antes de serem descongelados.

O processo de descongelação seguido para os embriões bovinos foi o mesmo descrito para os embriões de camundongo. Dos 20 embriões criopreservados e descongelados, oito foram transferidos por via não cirúrgica para receptoras que estavam no mesmo estágio do ciclo estral que as doadoras quando os embriões foram coletados. Os outros doze embriões, após a descongelação, foram colocados em cultura em meio PBSS, nas mesmas condições que os embriões do grupo C₂.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da criopreservação de embriões de camundongos estão apresentados na Tabela 1. Dos 104 embriões do grupo C1, 102 se desenvolveram até o estágio de blastocisto expandido em cultura, o que representa uma média de desenvolvimento em cultura de 97,8% ± 4,9%. Dos 104 embriões do grupo C2, 100 se desenvolveram até o estágio de blastocisto expandido, ou seja, uma média de desenvolvimento em cultura de 96,4% ± 6,7%. O desenvolvimento em cultura dos 98 embriões criopreservados se caracterizou por uma grande variabilidade

TABELA 1. Efeito do uso de metanol como crioprotetor na criopreservação de embriões de camundongos.

	C1	C2	Criopreservados
Nº embriões	104	104	104
% desenvolvimento	97,8±4,9	96,4±6,7	48,2±21,6

nos resultados. Dos 104 embriões criopreservados, 98 foram recuperados após o descongelamento, ou seja, 5,7% dos embriões foram perdidos no processo de criopreservação e de descongelamento e 95 foram recuperados após 24 horas de cultura, dos quais 50 se desenvolveram até o estágio de blastocisto expandido, o que resulta numa média de desenvolvimento dos embriões criopreservados de 48,2% ± 21,6%.

A percentagem média de desenvolvimento em cultura dos embriões recuperados foi de 53,5% ± 24,0%.

Os resultados da criopreservação de embriões bovinos usando metanol como crioprotetor estão apresentados na Tabela 2. Dos quatro embriões do grupo C2, todos se desenvolveram em cultura, sendo que nenhum dos doze embriões descongelados e colocados em cultura se desenvolveram, nem os oito descongelados e transferidos resultaram em gestação.

No presente trabalho, uma solução de 3 M de metanol em PBSS proporcionou crioproteção na criopreservação de embriões de camundongo. A taxa de crescimento em cultura, após descongelamento dos embriões de camundongo, é semelhante à obtida por Rall et al. (1984). A taxa de desenvolvimento em cultura apresentou uma grande variabilidade constatada pelo desvio-padrão. O presente experimento

TABELA 2. Efeito do uso do metanol como crioprotetor na criopreservação de embriões bovinos.

	C2	Cultura	Transferidos
Nº embriões	4	12	8
% desenvolvimento	100	0	0

não fornece informações a respeito de quais possam ser as causas desta alta variabilidade nos resultados. Não houve diferença na taxa de desenvolvimento entre os grupos C1 e C2, o que significa que a permanência de embriões de camundongo durante o tempo e na concentração de metanol utilizada não teve efeito deletério para o posterior desenvolvimento em cultura. Rall et al. (1984) observaram que os embriões de camundongo não perdiam sua vitalidade quando foram mantidos numa solução 3 M de metanol durante três horas à temperatura ambiente. A taxa de desenvolvimento em cultura, após descongelamento dos embriões de camundongo criopreservados, usando metanol como crioprotetor, neste experimento, foi menor do que as obtidas no laboratório usando-se glicerol como crioprotetor (resultados não publicados).

A colocação de embriões bovinos diretamente numa solução 3 M de metanol e depois transferidos diretamente em PBSS não resultou em nenhum prejuízo para o posterior desenvolvimento em cultura desses embriões. Contudo, os embriões criopreservados em uma solução 3M de metanol não sobreviveram após o descongelamento e transferência direta ao útero das receptoras nem à cultura *in vitro*. No caso de camundongos, Rall et al. (1984) observaram uma taxa maior de sobrevivência em embriões transferidos diretamente ao útero de receptoras em pseudo-gestação (81%) do que em cultura *in vitro* (50%). O presente experimento não oferece nenhuma informação sobre qual seja a causa da falha do metanol em proporcionar proteção na criopreservação de embriões bovinos. Os embriões apresentam uma aparência boa após serem descongelados, mas não sobrevivem. Uma possibilidade pode ser a sugerida por Lovelock (1954): a da toxidez química, como consequência do aumento de concentração do metanol acima do nível tóxico, à medida que aumenta a quantidade de gelo na solução residual que rodeia o embrião.

O metanol é uma molécula menor do que o glicerol e o dimetilsulfóxido, podendo entrar e sair das células muito rapidamente, tanto assim que não é visível nenhuma variação de volume do embrião quando são colocados diretamente numa solução 3 M de metanol. Esta característica permite que os embriões sejam transferidos diretamente para as receptoras imediatamente após o descongelamento, sem mais manipulação. Este fator é muito importante do ponto de vista prático, já que colocaria os embriões criopreservados ao alcance de um grande número de pessoas, uma vez que eliminaria todo o equipamento

necessário e também a destreza requerida para a manipulação dos embriões após o descongelamento. Este argumento é suficiente para estimular um maior esforço da pesquisa neste sentido.

CONCLUSÕES

1. Tanto os embriões de camundongo como os de bovino suportam serem colocados diretamente numa solução 3 M de metanol em PBSS e transferidos diretamente para PBSS, sem diminuir seu potencial de desenvolvimento em cultura.

2. Uma solução 3 M de metanol em PBSS oferece crioproteção na criopreservação de embriões de camundongos.

3. Uma solução 3 M de metanol em PBSS não oferece crioproteção a embriões bovinos nas condições de criopreservação utilizadas no presente trabalho.

AGRADECIMENTOS

À chefe do biotério, Dra. V.M. Peters e aos seus funcionários, pelo fornecimento e cuidado dos camundongos. Aos Srs. E.L. Alvim e J.B. Faria, pela excelente assistência técnica durante a execução deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ASHWOOD-SMITH, M.J. & LOUGH, P. Cryoprotection of mammalian cells in tissue culture with methanol. **Cryobiology**, **12**:517-18, 1975.
- DULBECCO, R. & VOGT, M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. **J. Exp. Med.**, **99**:167-82, 1954.
- HUDITA, H. Studies on freezing and freeze-drying of blood, with special reference to addition of alcohol. **Low Temp. Sci.**, **B17**:85-103, 1959.
- LEIBO, S.P. & MAZUR, P. Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing. In: DANIELS JUNIOR, J. ed. **Methods of mammalian reproduction**. New York, Academic Press, 1978. p.179-201.
- LOVELOCK, J.E. The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing. **Biochem. J.**, **56**:265-70, 1954.
- MERYMAN, H.T. Modified model for the mechanism of freezing injury on erythrocytes. **Nature**, London, **218**:333-36, 1968.

- MOORE, N.W. & SHELTON, J.N. Response of the ewe to a horse anterior pituitary extract. **J. Reprod. Fert.**, 7:79-87, 1964.
- NACCACHE, P. & SHA'AFI, R.I. Patterns of non-electrolyte permeability in human red blood cell membrane. **J. Gen. Physiol.**, 62:714-36, 1973.
- QUINN, P. & WHITTINGHAM, D.G. Factors affecting the fertilizing capacity of mouse and human spermatozoa. **Arch. Androl.**, 5:A125, 1980. Suppl.
- RALL, W.F.; CZLONKOWSKA, M.; BARTON, S.C.; POLGE, C. Cryoprotection of Day-4 mouse embryos by methanol. **J. Reprod. Fert.**, 70:293-300, 1984.
- WHITTINGHAM, D.G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. **Nature**, London, 233:125-26, 1971.
- WILLADSEN, S.; POLGE, C.; ROWSON, L.E.A. The viability of deep-frozen cow embryos. **J. Reprod. Fert.**, 52:391-93, 1978.