Ciência Rural, Santa Maria, 21(2):243-248, 1991.
Aprov. p/ publicação em 23/10/91.

INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO E DA CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE NA VIABILIDADE DE MÓRULAS Mus musculus CONGELADAS PELO MÉTODO ULTRA-RÁPIDO.

EFFECTS OF PRE TREATMENT AND LACTOSE CONCENTRATION ON ULTRA RAPID FREEZING MOUSE MORULAE

Alceu Mezzalira* Mara Iolanda Batistella Rubin**

RESUMO

Duzentos e vinte e cinco embriões de camundongos foram congelados em vapor de nitrogênio, em quatro diferentes tratamentos. No tratamento I (n=57), os embriões foram submetidos a um pré-tratamento em glicerol 5,0, sendo posteriormente colocados em uma solução de glicerol 5,0M + lactose 0,25M. No tratamento II (n=54), o procedimento foi semelhante, porém com a utilização de 0,5M de lactose. No tratamento III (n=57), os embriões foram colocados diretamente na solução de glicerol 5,0M + lactose 0,25M. No tratamento IV (n=57), o procedimento foi semelhante ao tratamento III, porém com a utilização de lactose 0,5M. Os embriões foram mantidos por 5 minutos em cada solução, sendo em seguida envasados em grupos de 6 a 12, em palhetas de 0,25ml. O descongelamento foi realizado em banho-maria a 37°C e a remoção do crioprotetor realizada pela exposição, por 5 minutos, a uma solução de lactose na mesma concentração utilizada no congelamento. Após 48 horas de cultivo, os melhores resultados foram obtidos com o tratamento IV (80,7%), quando comparados ao tratamento III (66,7%), tratamento II (66,7%) e tratamento I (31,6%). O pré-tratamento exerceu uma influência negativa, determinando menor viabilidade média (49,2%) em relação aos grupos sem pré-tratamento (73,7%). A concentração de lactose 0,5M proporcionou maior viabilidade média (73,7%) que a lactose 0,25M (49,2%).

Palavras-chave: congelamento ultra-rápido, pré-tratamento, lactose.

* Médico Veterinário, Mestre, Professor do Centro de Ciências Agroveterinárias - Av. Luiz de Camões, 2090 - 88.500 - Lages, SC.

** Médico Veterinário, Doutor, Professor Adjunto da UFSM. Centro de Ciências Rurais - UFSM - Camobi - 97.119 - Santa Maria, RS.

SUMMARY

Two hundred and twenty five morulae were submitted to a ultra rapid freezing in four different treatments. In treatment I (n=57), the embryos were first exposed to a 5.0M glycerol pre treatment, and later to a glycerol 5.0M + lactose 0.25M freezing solution. In the treatment II (n=54) the procedure was similar to the treatment I, but with 0.5M of lactose instead 0.25M. In the treatment III (n=57), the embryos were exposed directly to a glycerol 5.0M + lactose 0.25M freezing solution. In the treatment IV (n=57) the procedure was similar to the treatment III, but with lactose 0.5M instead 0.25M. The embryos were maintened 5 minutes in each solution, and then loaded in groups of 6 to 12, in 0.25ml plastic straws. After thawing in a water bath at 37°C, the cryoprotector was removed by five minutes exposure to a lactose solution in the same concentration than that used in the freezing procedure. After 48 hours of culture, the highest viability was observed in treatment IV (80.7%), followed by treatment III (66.7%), treatment II (66.7%) and treatment I (31.6%). Pretreatment determined a decrease in the viability (49.2%) when compared with the viability of groups without pre treatment (73.7%). The embryo viability was higher with lactose 0.5M (73.7%) than with lactose 0.25M (49.2%).

Key words: ultra rapid freezing, pretreatment, lactose.

INTRODUÇÃO

Muito embora a sacarose seja o açúcar utilizado rotineiramente no congelamento ultra-rápido de embriões, resultados semelhantes ou até mesmo superiores podem ser obtidos com lactose, como demonstram os trabalhos de TAKAHASHI & KANAGAWA (1985), BERNARDI et al (1988) e BERNARDI (1989), com embriões de camundongos.

A obtenção de bons resultados com o método ultra-rápido está condicionada principalmente às concentrações de glicerol e de açúcar utilizados, tendo sido evidenciado que o aumento na concentração de glicerol requer concentrações mais elevadas de açúcares (BIERY et al, 1986). Além disto, uma série de outros fatores como temperatura ambiente, período de exposição, volume das soluções e a utilização de pré-tratamento, podem influenciar a viabilidade, o que por vezes permite a verificação de resultados semelhantes com protocolos bastante diferentes.

O efeito do pré-tratamento em concentrações de 1,0 a 4,0M de glicerol foi investigado por WILLIAMS & JOHNSON (1986), que verificaram resultados semelhantes aos obtidos sem pré-tratamento, exceto com glicerol 2,0M, onde os resultados obtidos sem pré-tratamento (67,0%) foram superiores aos com pré-tratamento (38,0%).

Utilizando a concentração 5,0M de glicerol, SZÉLL & SHELTON (1987) investigaram o efeito do pré-tratamento em glicerol, verificando neste caso, que os embriões são menos dependentes da concentração de sacarose utilizada na solução de congelamento, sendo possível a obtenção de idêntica viabilidade com concentrações desde 0,125 até 1,0M de sacarose. Já na ausência de pré-tratamento, a viabilidade é dependente da concentração de sacarose, obtendo-se melhores resultados com 0,5M de sacarose associada a 5,0M de glicerol.

O presente estudo teve o propósito de investigar a influência do pré-tratamento em glicerol e das concentrações 0,25 e 0,5M de lactose na viabilidade de mórulas **Mus musculus** congeladas pelo método ultra-rápido, em glicerol 5,0M.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas mórulas classificadas como excelentes (Grau I) ou boas (Grau II), provenientes de fêmeas Suiço Albino. As mórulas foram mantidas em PBS modificado (WHITTINGHAM, 1971) e submetidas a quatro diferentes tratamentos. No tratamento I (n=57), os embriões foram submetidos a um pré-tratamento em glicerol 5,0M, sendo em seguida colocados na solução de congelamento composta por glicerol 5,0M + lactose 0,25M. No tratamento II (n=54) o procedimento foi semelhante, porém com a utilização de 0,5M de lactose na solução de congelamento. No tratamento III (n=57), os embriões foram colocados diretamente na solução de congelamento composta por glicerol 5,0M + lactose 0,25M. No tratamento IV (n=57), o procedimento foi semelhante ao tratamento III, porém utilizando-se lactose 0,5M.

Os embriões foram mantidos por 5 minutos em cada solução, sendo em seguida envasados em grupos de 6 a 12 em 0,05ml da solução de congelamento, em palhetas de 0,25ml, que tiveram suas extremidades preenchidas por 0,15ml da solução de lactose na mesma concentração utilizada no congelamento. A solução de congelamento contendo os embriões permanecia na parte média da palheta, separada por duas bolhas de ar.

O congelamento foi realizado em vapor de nitrogênio, por um minuto, sendo em seguida mergulhados no mesmo. O descongelamento foi realizado em banho-maria a 37ºC por 20 segundos e a remoção do crioproteror realizada pela deposição do conteúdo da palheta em mais 0,1ml da solução de lactose 0,25 ou 0,5M.

O cultivo foi realizado em meio de Whitten modificado (THADANI, 1982), em estufa a 37°C com 5% de C02 e 95% de umidade, sendo realizadas duas avaliações com 24 e 48 horas de cultivo. Na primeira avaliação foram considerados viáveis os embriões que desenvolveram no mínimo até o estágio de blastocisto inicial, e na segunda avaliação, foram considerados viáveis os que atingiram os estágios de blastocisto expandido, blastocisto em eclosão ou blasto-

cisto eclodido.

A análise estatística foi realizada através do delineamento para experimentos fatoriais, com nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 48 horas de cultivo a maior viabilidade foi obtida com o tratamento IV (80,7%), seguida do tratamento III (66,7%), tratamento II (66,7%) e tratamento I (31,6%) (Tabela 1).

A utilização de lactose 0,5M proporcionou maior viabilidade média (73,7%) quando comparada aos 49,2% obtidos com lactose 0,25M (Tabela 2), evidenciando a necessidade de maiores concentrações de lactose com níveis elevados e glicerol (5,0M), para a obtenção de bons resultados, fato também demonstrado por BIERY et al (1986) e SZÉLL & SHELTON (1987) com sacarose.

O pré-tratamento em glicerol exerceu uma influência negativa, determinando menor viabilidade média (49,2%), quando comparada com os grupos sem pré-tratamento (73,7%) (Tabela 2).

Utilizando concentrações de glicerol 3,0 e 4,0M, WILLIAMS & JOHSON (1986) verificaram que o pré-tratamento não exerceu influências significativas. Já SZÉLL & SHELTON (1987) verificaram um aumento de viabilidade com glicerol 3,0 e 4,0M, não sendo constatada qualquer influência com 5,0M, quando o pré-tratamento foi utilizado. Entretanto, SZÉLL & SHELTON (1987) utilizaram sacarose 1,0M em maior volume em relação a lactose 0,5M na remoção do crioprotetor, o que pode ter determinado a diferença de comportamento. BERNARDI (1989) evidenciou que maiores concentrações de açúcar possivelmente possam ser mais eficazes na remoção do crioprotetor nos caso em que o congelamento é realizado na ausência de açúcar, ou quando do uso de maior volume da solução de congelamento. Isto pode explicar a baixa viabilidade obtida com glicerol 5,0M + lactose 0,25M na presença de pré-tratamento (31,6%), já que a proporção da solução de congelamento e da solução de lactose 0,25M utilizada na remoção do crioprotetor foi 1: 5, enquanto que SZÉLL & SHELTON (1987) obtiveram alta viabilidade com protocolo idêntico (82,0%) utilizando 1 parte da solução de congelamento para 11 partes de sacarose.

Neste estudo foi obtida maior viabilidade na ausência de pré-tratamento (73,7%), evidenciando que o pré-tratamento proporciona maior permeação de glicerol e, neste caso, concentrações baixas como 0,25M de lactose possivelmente não sejam efetivas para sua remoção. Estas observações são ainda reforçadas pelo aumento da viabilidade verificada com a utilização de 0,5M de lactose (66,7%) na presença de pré-tratamento, muito embora este resultado seja inferior aos 80,7% obtidos com o mesmo nível de lactose, na ausência de pré-tratamento.

Desta forma, nas condições do presente experimento, o pré-

tratamento em 5,0M de glicerol diminui a viabilidade de mórulas congeladas pelo método ultra-rápido, enquanto que a concentração de 0,5M de lactose na solução de congelamento e na remoção do crioprotetor, proporciona maior viabilidade embrionária, quando comparada com a concentração de 0,25M.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERNARDI, M.L. **Avaliação de diferentes concentrações de glicerol, sacarose e lactose no congelamento ultra-rápido de mórulas Mus musculus**. Santa Maria, UFSM, 1989. 105 p. (Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, 1989.

BERNARDI, M.L., RUBIN, M.I.B., METZDORF, A. Congelamento ultra-rápido de embriões **Mus musculus** com a utilização de sacarose e lactose. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, 1988, Santa Maria, RS. **Anais**... Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria, 1988, 63 p. p. 56.

BIERY, K.A., SEIDEL Jr., G.E., ELSDEN, R.P. Cryopreservation of mouse embryos by direct plunging into liquid nitrogen. **Theriogenol**, v. 25, n. 1, p. 140, 1986. Abstract.

SZÉLL, A., SHELTON, J.N. Osmotic and cryoprotective effects of glycerol-sucrose solutions on day-3 mouse embryos. **J Reprod Fert**, v. 80, p. 309-316, 1987.

TAKAHASHI, Y., KANAGAWA, H. Quick freezing of mouse embryos by direct plung into liquid nitrogen vapour: Effects of sugars. **Jpn Vet Res**, v. 33, p. 141-144, 1985.

THADANI, V.M. Mice produced from eggs fertilized in vitro at a very low sperm egg ratio. **J Exp Zool**, v. 219, p. 277-283, 1982.

WHITTINGHAM, D.G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. **Nature**, v. 233, p. 125-126, 1971.

WILLIAMS, T.J., JOHNSON, S.E. A method for one-step freezing of mouse embryos. **Theriogenol**, v. 26, n. 1, p. 125-133, 1986.

TABELA 1 - Viabilidade após cultivo, de mórulas **Mus musculus** congelada pelo método ultra-rápido, com quatro diferentes tratamentos.

GRUPO	PRÉ TRATAMENTO	CONCENTRAÇÃO LACTOSE	EMBRIÕES CONGELADOS n	VIÁVEIS 24h	(%) 48h
I	GLICEROL 5,0M	0,25M	57	29,8	31,6
II	GLICEROL 5,0M	0,5M	54	55,5	66,7
III	---	0,25M	57	56,1	66,7
IV	---	0,5M	57	75,4	80,8

TABELA 2 - Viabilidade média após cultivo de mórulas **Mus musculus** congeladas com duas concentrações de lactose, com e sem a utilização de pré-tratamento em glicerol.

PRÉ-TRATAMENTO	LACTOSE 0,25M	LACTOSE 0,5M	MÉDIA
GLICEROL	31,6%	66,7%	49,2%A
AUSENTE	66,7%	80,7%	73,7%B
MÉDIA	49,2%a	73,7%b	

A,B: letras desiguais na coluna indicam diferença significativa (p< 0,05)

a,b: letras desiguais na linha indicam diferença significativa (p< 0,05).