

## VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES *MUS DOMESTICUS DOMESTICUS* CONTIDOS EM VOLUMES DIFERENTES DE 9,0 M DE ETILENO GLICOL

Assaf, S.S.<sup>1</sup>; Duarte, M.E.S.<sup>2</sup>; Lange, M.C.<sup>3</sup>; Rodrigues, J.L.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ/UNESP – Botucatu – SP. <sup>2</sup>Unidade de Experimentação Animal - Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas - Porto Alegre – RS. <sup>3</sup>Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução – UFRGS – Porto Alegre – RS. [assafss@yahoo.com.br](mailto:assafss@yahoo.com.br)

Este trabalho foi desenvolvido com embriões *Mus domesticus domesticus* com o objetivo de verificar a viabilidade *in vitro* dos embriões vitrificados usando diferentes volumes de solução 9,0 molar de etileno glicol. Os experimentos tiveram como objetivo determinar a taxa de eclosão dos embriões vitrificados em volumes diferentes de 9,0 M de etileno glicol. No experimento I, os 881 embriões coletados foram distribuídos em 4 tratamentos: tratamento 1 (T1 = controle): 307 embriões foram cultivados *in vitro* em meio PBSm, acrescido de 0,4% de BSA; tratamento 2 (T2): 292 embriões foram expostos à solução de glicerol 10% acrescida de 0,4% de BSA, envasados em palhetas de 0,25 mL e submetidos ao congelamento pelo método rápido em Biocool®; tratamento 3 (T3): 138 embriões foram expostos durante 2 minutos à solução de desidratação (10% de EG + 6% BSA em PBSm) e então transferidos para a solução de vitrificação (50% de EG + 6% de BSA em PBSm), onde permaneceram por 30 segundos sendo após transferidos para o volume de 1 µL no interior de um fio de teflon, medindo 0,4 mm de diâmetro, 2,0 cm de comprimento e 0,05 mm de espessura. Os fios foram acondicionados em uma caixa de aço inoxidável para serem armazenados em nitrogênio líquido; tratamento 4 (T4): 144 embriões foram expostos à solução de desidratação (10% de EG + 6% BSA em PBSm) e após 2 minutos, foram transferidos para a solução de vitrificação (50% de EG + 6% BSA em PBSm), onde permaneceram por 30 segundos e foram colocados em volume de 1 µL no interior do fio de teflon. Os fios de teflon foram estocados em globetes unidos às raques e mantidos em nitrogênio líquido. Após o aquecimento, os embriões foram cultivados em PBSm suplementado com 0,4% de BSA. As taxas de eclosão embrionária observadas foram: T1=79,80% (245/307); T2=40,07% (117/292); T3=39,13% (54/138) e T4=25,69% (37/144). No segundo experimento 747 embriões foram distribuídos em 3 tratamentos: tratamento 1 (T1= controle): 80 embriões foram cultivados *in vitro* em meio KSOM acrescido de 0,4% de BSA; tratamento 2 (T2): 334 embriões expostos em solução de glicerol 10% acrescida de 0,4% de BSA, foram envasados em palhetas de 0,25 mL e submetidos ao congelamento pelo método rápido em Biocool®; tratamento 3 (T3): 333 blastocistos foram expostos durante 2 minutos à solução de desidratação (10% de EG + 0,4% BSA em PBSm) e então transferidos para tubos eppendorf de 2,0 mL contendo a solução de vitrificação (50% de EG + 0,4% BSA em PBSm). Após o cultivo *in vitro*, as taxas de eclosão embrionária observadas nos 3 tratamentos foram respectivamente: 88,75% (71/80), 42,22% (141/334) e 19,82% (66/333). Baseado nesses resultados conclui-se que embriões *Mus domesticus domesticus* submetidos à técnica de vitrificação após exposição à solução de 9,0 M de etileno glicol e envase em fios de teflon assegurou índices satisfatórios de sobrevivência embrionária. As taxas de sobrevivência dos embriões *Mus domesticus domesticus* foram independentes do procedimento de estocagem em botijão de nitrogênio líquido. A vitrificação em solução de 9,0 M de etileno glicol com envase em tubos eppendorf não foi eficiente para promover altas taxas de sobrevivência embrionária, mas proporcionou segurança biológica aos embriões durante o armazenamento.

## VITRIFICATION OF *MUS DOMESTICUS DOMESTICUS* EMBRYOS EXPOSED TO DIFFERENTS VOLUMES OF 9.0 M ETHYLENE GLYCOL SOLUTION

This work was performed with *Mus domesticus domesticus* embryos to verify the *in vitro* viability of vitrified embryos using different volumes of ethylene glycol-based solution. The experiment I consisted of four treatments. The 881 collected embryos were arranged as follows: treatment 1 (control): 307 fresh embryos were cultured *in vitro* in PBSm + 0.4% BSA without being exposed to either dehydration or cryoprotectants agents; treatment 2: 292 embryos were loaded into 0.25 mL french straws containing 10% glycerol + 0.4% BSA in PBSm and after 10 minutes the straws were submitted to the rapid-freezing procedure (Biocool®, controlled freezer); treatment 3: 138 embryos were exposed during 2 minutes to a dehydration solution (10% ethylene glycol + 6% BSA in PBSm) and then transferred to the vitrification solution (50% ethylene glycol + 6% BSA in PBSm) in teflon wire with 0.4 mm diameter, 2 cm length and 0.05 mm thickness containing the drop of 1 µL volume, and placed into stainless steel box for the storage in LN<sub>2</sub>; treatment 4: 144 embryos were exposed to a dehydration solution (10% ethylene glycol + 6% BSA in PBSm) and after 2 minutes were transferred to the teflon wire, that was previously loaded with 1 µL of the vitrification solution (50% ethylene glycol + 6% BSA in PBSm). Finally, the teflon wires were placed into plastic globets attached to aluminum canes and maintained in LN<sub>2</sub>. After thawing, the embryos were serially washed in PBSm, and then cultured in PBSm supplemented with 0.4% BSA. The hatched blastocyst rates observed in the treatments were: T1 =79.80% (245/307); T2=40.07% (117/292); T3=39.13% (54/138) and T4=25.69% (37/144). In the second experiment, 747 embryos were arranged as follows: treatment 1 (control): consisted of 80 fresh embryos cultured *in vitro* in KSOM medium + 0.4% BSA without being exposed to either dehydration or cryoprotectants agents; treatment 2: 334 embryos were loaded into 0.25 mL french straws containing 10% glycerol + 0.4% BSA in PBSm and after 10 minutes the straws were submitted to the rapid-freezing procedure (Biocool®, controlled freezer); treatment 3: 333 embryos were exposed during 2 minutes to a dehydration solution (10% ethylene glycol + 0.4% BSA in PBSm) and then transferred to the eppendorf tubes loaded with the vitrification solution (50% ethylene glycol + 0.4% BSA in PBSm). After *in vitro* culture, the hatched blastocysts rates observed were: T1=88.75% (71/80); T2=42.22% (141/334) and T3=19.82% (66/333). Based on these results it is concluded that the embryos of *Mus domesticus domesticus* submitted to vitrification procedure after being exposed to 9.0 M of ethylene glycol - based solution and loaded in teflon wires were efficient to promote satisfactory embryo survival rates. The survival rate of *Mus domesticus domesticus* embryos was independent of the LN<sub>2</sub> storage procedure. The embryo vitrification procedure after being exposed to 9.0 M of ethylene glycol - based solution and loaded in eppendorf tubes were not efficient to warrant the embryo's biologically security during storage in liquid nitrogen.