

P

ESQUISA

AUTORES

*Carlos Gilberto Almodin
Vania Cibele Minguetti*

INCUBADORA ALTERNATIVA PARA FERTILIZAÇÃO IN VITRO

*ALTERNATIVE INCUBATOR FOR IN
VITRO FERTILIZATION*

ENDEREÇO: Materbaby

*Dr. Carlos Gilberto Almodin
Av. Angelo Moreira da Fonseca, 3334
87500 tele-fax:(0446) 22-2764
Umuarama - Paraná*

RESUMO

Com o alto custo das incubadoras utilizadas para fertilização *in vitro*, desenvolvemos uma incubadora alternativa a partir de uma estufa Fanen modelo 002CB, trabalhando em sistema fechado, com mistura gasosa pronta fornecida pela White-Martins. A mistura gasosa com 5% de CO₂, 20% de O₂ e balanceada com N₂, circula através de filtro é aquecido e umedecido sendo retido em dissecadores. Os resultados foram aferidos e comparados por fertilização *in vitro* de oócitos bovinos e acompanhados por 48 horas após fertilização havendo desenvolvimento embrionário até mórula. Os resultados comparados com mesma cultura em incubadora Forma Scientific (Los Angeles, USA) revelou resultados ligeiramente superiores da incubadora alternativa.

SUMMARY

Due the high cost of incubators used in vitro fertilization, we have developed the alternative incubator through a model 002CB Fanen incubator (Fanen, São Paulo) working in closed system with gas mixture provided by White-Martins. The gas mixture with 5% of CO₂, 20% of O₂ and completed with N₂, circulating through filter being warmed and moistened and stranded in dissectors. The results were checked with bovine gametes in vitro fertilization and observed for 48 hours after fertilizations, with embryonic development until morula. The results compared to the same culture in Forma Scientific incubator (Los Angeles, USA), showed us results slightly superior when we used the alternative incubator.

INTRODUÇÃO

O grande avanço na área de reprodução humana nos últimos anos tem estado fora do alcance da maioria dos profissionais brasileiros pelo seu alto custo e grande sofisticação. Na instalação de um laboratório voltado à reprodução assistida faz-se indispensável a presença de uma incubadora para cultivo de células. Essas incubadoras normalmente são equipadas com aparatos destinados a nos fornecer condições ideais para cultura líquida, nos propiciando temperatura constante, umidade de 95% e manutenção do pH do meio de cultura obtido através de mistura de gases. As misturas gasosas mais comumente utilizadas são 5% de CO₂ em ar, 5% de CO₂, 20% O₂ e 75% N₂ e atualmente nas culturas voltadas a longos períodos de incubação utilizam mistura gasosa com baixa tensão de O₂ (5% de CO₂, 5% O₂ em 90% N₂).

A oscilação de temperatura é minimizada nas boas incubadoras pela presença de um termostato muito sensível, sendo às vezes computadorizado e ao mesmo tempo resistente para suportar as grandes oscilações que ocorrem comumente nas redes de distribuição no Brasil. A maioria dessas incubadoras são equipadas com uma jaqueta de água, que nada mais é do que um

duplo revestimento interno o qual é mantido cheio com água, tornando assim mais fácil controlar as oscilações de temperatura, porém mesmo com a utilização de termômetro digital é necessária a aferição com termômetros colocados dentro da incubadora e checados periodicamente.

A manutenção do pH dos meios de cultura que utilizam bicarbonato de sódio em sua formulação é obtido pela concentração constante de gases com 5% de CO₂. O cuidado de manusear e manter o embrião fora da incubadora o mínimo possível, é necessário para termos somente pequenas oscilações de pH, não chegando a causar dano. Cada vez que abrimos a porta da incubadora teremos alteração de temperatura e concentração de CO₂, as incubadoras normalmente possuem um sistema computadorizado que restabelecem rapidamente a temperatura e a concentração de gases.

A manutenção da osmolaridade é conseguida com a umidade interna da incubadora que deve ser em torno de 95%, evitando-se que ocorra desidratação ou hiper-hidratação do meio de cultura, o qual forneceria um ambiente hipotônico ou hipertônico aos gametas

dificultando assim seu desenvolvimento. Esta umidade é conseguida com a manutenção de uma bandeja de aço inoxidável com água contendo de 5 a 6 litros de água bidestilada no assoalho da incubadora.

Infelizmente, este tipo de incubadora não é fabricada pela indústria nacional, apesar de já ter havido algumas tentativas frustradas. As incubadoras importadas sem dúvida funcionam muito bem e nos dão excelentes resultados, porém seu alto custo, em torno de US\$ 10.000 a US\$ 18.000 geralmente nos mantém à distância.

MATERIAL

Com a necessidade de obtermos um equipamento menos custoso e que nos fornecesse resultados, desenvolvemos uma incubadora procurando naturalmente imitar os equipamentos mais sofisticados porém com custo mais baixo.

A partir de uma estufa de cultura modelo 002CB (Fanen, São Paulo, Brasil), sem alterar absolutamente nada dos seus componentes internos fizemos adaptações que nos proporcionasse temperatura constante, manutenção de pH e osmolaridade. (Figura 1).

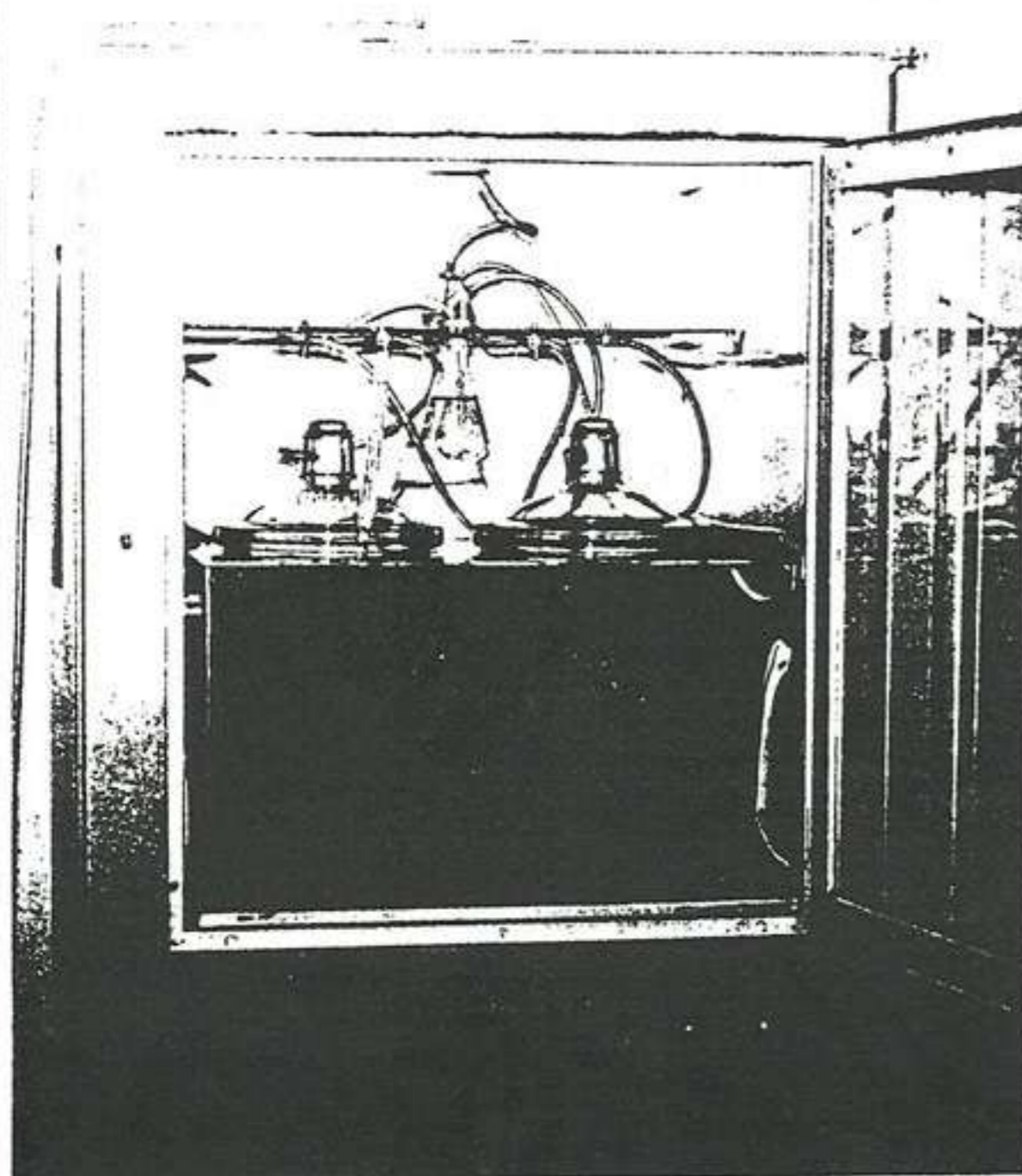
Resolvemos trabalhar em sistema fechado por ser a maneira mais econômica e fácil de obter tais



aspecto externo da incubadora

requisitos. Construimos duas caixas de aço inoxidável totalmente vedadas com diferença de tamanho de um centímetro, sendo esse espaço entre as duas caixas preenchidas com uma placa de isopor. Essas caixas possuem uma tampa superior comum também com isopor e com duas aberturas em círculos do tamanho exato de dois dissecadores de vidro. Os dois dissecadores são colocados dentro das caixas ficando a tampa dos dissecadores na parte superior das caixas. É importante que as caixas sejam mantidas a 2 cm do fundo da incubadora evitando-se o contacto direto da parede inferior das caixas com o assoalho da incubadora. A tampa superior das caixas possui dois orifícios pequenos, que permitem a passagem de dois termômetros até o nível interno dos dissecadores, na altura onde permaneceram as placas com os gametas, nos dando assim a temperatura da água do interior das caixas nos níveis dos gametas. Essas caixas com aproximadamente 20 litros de água, funcionam como uma jaqueta e permitem oscilações de temperatura, que são desprezíveis. Os dissecadores são equipados com grade inferior, servindo de assoalho onde serão colocadas as placas com os gametas. Abaixo dessa grade, o espaço existente é mantido com 5 ml de água deionizada e bidestilada para manutenção da umidade necessária. A manutenção do pH é obtida através de uma mistura gasosa comprada, já preparada da White-Martins (mistura de gases para análise sanguínea) com 5% de CO_2 , 20% de O_2 e balanceada com N_2 . A mistura gasosa sai da bala por uma mangueira de silicone, grau médico até um filtro de gases Acro 50 de O_2 Um (Gelman, USA) seguindo até um erlenmayer de 500 ml com 250 ml de água deionizada e bidestilada. A mangueira é conectada a uma agulha de aço inoxidável que penetra através de uma rolha de silicone para o interior do erlenmayer onde borbulha no interior da água fazendo um aquecimento e umedecimento, saindo do erlenmayer por uma outra agulha de aço com a ponta inferior acima do nível da água a qual está conectada a um tubo tipo espaguete de teflon que passa por um tri-way e daí segue até os dissecadores. A finalidade desse primeiro tri-way é ter controle sobre a circulação do gás do primeiro erlenmayer até os dissecadores, e quando fechado manter o gás retido nos dissecadores. Dos dissecadores sai outro tubo de teflon conectado a outro tri-way, e deste até um pequeno erlenmayer com 100 ml de água deionizada e bidestilada.

Este segundo tri-way, quando aberto, permite a livre circulação do gás, confirmando assim a circulação deste. Quando fechado, não permite a saída do gás do interior dos dissecadores. Após a colocação das placas no interior dos dissecadores, abrimos um fluxômetro e deixamos fluir três litros por minuto, com os quatro tri-ways (dois de cada dissecador) permitindo a passagem livre do gás, borbulhando no interior do primeiro erlenmayer, sofrendo aquecimento e umedecimento, entrando nos dissecadores e confirmando a circulação dos gases pelo borbulhar do segundo erlenmayer. Após 5 minutos de circulação, fechamos a válvula da bala e observamos o fluxômetro parando lentamente, e quando o primeiro e maior erlenmayer parar de borbulhar fechamos os quatro tri-ways, matendo desta maneira os gases retidos no interior dos dissecadores. Assim, atingimos o objetivo de temperatura constante, umidade e concentração adequada de CO_2 , facilidade para confeccioná-la, os baixos custos e a fácil comprovação dos resultados, acreditamos estar ao alcance de qualquer profissional. Neste momento já estamos usando-a para fertilização *in vitro* em humanos com resultados similares.



Aspecto interno da incubadora

ESTUDO COMPARATIVO DE EFICIÊNCIA

Para comprovarmos a eficiência de tal aparato, procedemos à fertilização de oócitos bovinos com sêmen congelado de boi da raça marquejana, e cultivados em meio GPM fornecido pela Serono do Brasil. O estudo foi realizado em mesmo local e condições, ao mesmo tempo procedendo-se cultivo comparativo em incubadora Forma Scientific modelo 359 (Forma Los Angeles, USA) que é a incubadora mais utilizada pelos laboratórios de reprodução assistida do Brasil e do exterior.

Na noite anterior à colheita dos oócitos, foram colocados na incubadora 20 ml de GPM para as placas de cultivo (Placas Costar cat 3035) e para preparo de sêmen, além de 20 ml de Bulbecco's Buffered Saline (GIBCO, Grand Island, NY, USA) para lavagem dos oócitos.

Os oócitos, após a colheita, foram retirados do líquido folicular sob microscópio estereoscópico, transferidos para placas de lavagem com Bulbecco's Buffered Saline e depois transferidos para as placas com meio de cultivo e colocadas em incubação até o momento da fertilização. Os espermatozoides congelados (Lagoa da Serra - Sertãozinho - SP), após serem descongelados em temperatura ambiente, colocou-se 1 ml em tubo de centrifuga (Costar cat 3216) e homogeneizados com 2 ml de GPM e centrifugados a 320 G por 30 minutos. Retira-se o sobrenadante e homogeneiza-se com 2 ml de GPM e procede-se nova centrifugação nas mesmas condições. Após a segunda centrifugação, retira-se o sobrenadante sem quebrar o pellet e adiciona-se 0,5 ml de GPM, sendo então mantido em incubadora por duas horas aguardando a espermo-migração e capacitação espermática. Após este tempo, os oócitos são inseminados com 50.000 a 100.000 espermatozoides por oócito e mantidos em incubadora por 48 horas quando então foram verificados sob microscópio invertido (Olympus CK2 Japão).

RESULTADOS

Do total de 524 oócitos foram cultivados 277 na incubadora Forma e obtivemos 39 embriões com 2 células, 29 embriões com 3 a 4 células e 76 embriões com mais de 4 células e em 133 não houve fertilização.



Embrião bovino com 2 células

Na incubadora alternativa foram cultivados 247, e obtivemos 45 embriões com 2 células, 42 embriões com 3 a 4 células, 81 embriões com mais de 4 células e em 79 oócitos não houve fertilização.

	oócitos	2 cels	3/4 cels	>4 cels	%
forma	277	29	39	76	52
alternativa	247	45	42	81	68

CONCLUSÃO

Após várias culturas com gametas bovinos e desenvolvimentos de embriões de camundongos em ambas as estufas, constatamos resultados muito similares. Porém, a incubadora alternativa revelou resultados levemente superiores a incubadora Forma. Houve manutenção a contento do meio de cultura, ocorrendo oscilações desprezíveis do pH. Acreditamos que a incubadora alternativa vem de encontro a condições econômicas da maioria das clínicas que se dedicam ao tratamento do casal estéril. A extrema facilidade para confeccioná-la, os baixos custos e a fácil comprovação dos resultados, acreditamos estar ao alcance de qualquer profissional. Neste momento já estamos usando -a para fertilização in vitro em humanos com resultados similares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Dondekar RV, Quingley MM. Laboratory setup for human in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 42:2. 1984.
- 2 - Bigger JD, Whinten WK, Whittigan DG. The culture of mouse embryos in vitro. *Fertil. Steril.* 40:92. 1985.
- 3 - Weeck LL, Maloney M. Laboratory quality control. In vitro fertilization Norfolk. p 178-180. 1986.
- 4 - New Dat, Stein KF. Cultivation of mouse embryos in vitro. *Nature.* 199:297-299. 1963.