



UTILIZAÇÃO DE BLOQUEADOR SINTÉTICO DE GELO NA VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS IMATUROS DE EQUINOS

LEON, Priscila Marques Moura¹; CORCINI, Carine Dahl¹, SANTOS, Elisa Carolina da Silva²; RAMBO, Gissele¹; LUCIA Jr., Thomaz¹; DESCHAMPS, João Carlos¹

*Laboratório de Reprodução Animal, Faculdade de Veterinária¹, Centro de Biotecnologia² - Universidade Federal de Pelotas - Campus Universitário - Pelotas/RS, Brasil, CEP-96010-900
primleon@hotmail.com*

1. INTRODUÇÃO

A vitrificação é uma técnica de criopreservação que envolve rápidas taxas de resfriamento e aquecimento em presença de concentrações muito altas de crioprotetores, prevenindo assim a formação de cristais de gelo, e diminuindo as crioinjúrias causadas a célula (Vajta, 2000). Apesar da breve exposição dos oócitos as soluções de vitrificação, as altas concentrações de crioprotetores podem causar danos às células devido a sua toxicidade química (Vajta *et al.*, 1998).

Macromoléculas, como polímeros sintéticos, são utilizadas com o objetivo de redução da toxicidade das soluções crioprotetoras (Naitana *et al.*, 1997). O Supercool X-1000™ (21st Century Medicine, Inc., Rancho Cucamonga, CA, USA), bloqueador sintético da formação de gelo, é um copolímero sintético de polivinil álcool (PVA) com 20% vinil acetato (Wowk *et al.*, 2000), que, quando adicionado em baixa concentração nas soluções de vitrificação, suprime a formação de cristais de gelo e se liga a membrana celular, protegendo as células e aumentando a taxa de sobrevivência após a desvitrificação (Fahy *et al.*, 2004). O Supercool X-1000™ mostrou resultados promissores na vitrificação de oócitos de camundongos (Fahy *et al.*, 2004), de eqüinos (Curcio, 2005) e suínos (Macedo *et al.*, 2006),

Com base na literatura revisada, o objetivo deste estudo foi avaliar a adição de bloqueador sintético de gelo, o Supercool X-1000™, nas soluções de vitrificação dos métodos de vitrificação em palhetas abertas estendidas (Open Pulled Straw - OPS) e em superfície sólida (Solid Surface Vitrification - SSV) em oócitos imaturos de eqüinos através da análise da viabilidade de membrana e da taxa de maturação *in vitro*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 481 ovários de éguas, coletados aleatoriamente em abatedouro de Pelotas/RS no período de março a maio de 2007. Os ovários foram transportados em solução 0,9% de NaCl à 35°C, até o Laboratório de Reprodução

Animal/UFPel, onde os complexos *cumulus* oócito (CCO) foram coletados por aspiração dos folículos com diâmetro entre 10 a 30 mm.

Os 1001 CCOs coletados foram divididos aleatoriamente entre dois métodos de vitrificação, em palhetas abertas estendidas (OPS) e em superfície sólida (SSV), além do grupo controle não vitrificado. Dentro de cada método de vitrificação, os CCOs foram subdivididos de acordo ao tratamento das soluções de vitrificação, que foram suplementadas ou não com 1% do Supercool X-1000™.

A vitrificação pelo método OPS foi realizada conforme o protocolo utilizado por Macedo *et al.* (2006). E o método de vitrificação SSV foi adaptado do protocolo utilizado por Dinnyes *et al.* (2005) para oócitos suínos. Após a desvitrificação, os CCOs foram maturados *in vitro* (MIV) conforme descrito por Leon *et al.*, (2007). E, ao fim das 40 horas de incubação da MIV, as células do *cumulus oophorus* foram retiradas por pipetagem em solução de 80 UI de hialuronidase tipo I-S (Sigma® - Aldrich, Alemanha).

Para avaliação da viabilidade de membrana e do estágio de maturação, os oócitos já desnudos foram corados com uma solução de Hoechst 33342 (Sigma® - Aldrich, Alemanha), diacetato de fluoresceína (Sigma® - Aldrich, Alemanha) e iodeto de propídeo (Sigma® - Aldrich, Alemanha) conforme descrito por Somfai *et al.*, (2006). Posteriormente à montagem das lâminas, foi feita a observação em luz ultravioleta (filtro de excitação BP 330 - 385) no microscópio invertido de epifluorescência (Olympus U-MWV2 - Olympus®, USA).

Na avaliação da viabilidade de membrana, os oócitos foram classificados como viáveis e inviáveis, indicada pela integridade da membrana plasmática e atividade da enzima esterase (Somfai *et al.*, 2006). Quanto ao estágio de maturação nuclear, os oócitos foram classificados como maduros, quando em estágio de metáfase I (MI) e metáfase II (MII), e como imaturos, quando no estágio de vesícula germinativa (VG) e quebra de vesícula germinativa (QVG) (Fernandes, 2004).

Para análise estatística e comparação entre os tratamentos, foram realizadas a distribuição de frequências e a tabulação cruzada dos dados, com análise através do teste de Qui-quadrado e Regressão Logística (Statistix 8.0). O risco foi estimado pela razão de chance (Odds Ratio - OR) e por intervalos de confiança de 95% (IC 95%).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 mostra os dados de maturação *in vitro* e viabilidade de membrana dos grupos OPS e SSV de acordo com o tratamento das soluções de vitrificação, com ou sem a adição do Supercool X-1000™.

Em relação à taxa de MIV do grupo controle (50,9%), foi observada diferença ($P < 0,0001$) entre todos os grupos de vitrificação. Com relação aos grupos de vitrificação, a adição de Supercool X-1000™ no grupo OPS resultou em superior taxa de MIV (20,3%) em relação aos grupos SSV com Supercool X-1000™ (11,4%, $P = 0,0086$; OR = 0,51; IC 95% = 0,31 – 0,84) e SSV sem a presença do Supercool X-1000™ (12,1%, $P = 0,0435$; OR = 0,54; IC 95% = 0,30 – 0,98), e assim como no grupo OPS sem o X-1000 (11,8%, $P = 0,0608$; OR = 0,53; IC 95% = 0,27 - 1,03).

Quanto aos dados de viabilidade de membrana, todos os grupos de vitrificação apresentaram taxas inferiores à do grupo controle (76,6%, $P < 0,0001$). Dentre os grupos de vitrificação, a menor taxa de viabilidade foi do SSV com adição

do Supercool X-1000™ (21,4%), inferior às taxas dos grupos SSV sem X-1000 (32,9%, P = 0,0102; OR = 1,80; IC 95% = 1,15 – 2,82) e OPS adicionado do X-1000 (32,7%, P = 0,0061; OR = 1,78; IC 95% = 1,18 – 2,69).

A adição de Supercool X-1000™ na concentração de 1% nas soluções de vitrificação mostrou melhora nos resultados de MIV e viabilidade de membrana no método de vitrificação por OPS. Na vitrificação por SSV, a adição do bloqueador sintético de gelo não mostrou diferença na taxa de maturação *in vitro*, porém, a taxa de viabilidade de membrana foi diminuída com a utilização do Supercool X-1000™.

Tabela 1 – Maturação nuclear e viabilidade de membrana dos grupos OPS e SSV de acordo com o tratamento das soluções de vitrificação, sem ou com a adição do Supercool X-1000™.

Método de Vitrificação	Supercool X-1000™ (%)	Maturação Nuclear			Viabilidade de Membrana		
		Imaturos (%)	Maturos (%)	total	Inviáveis (%)	Viáveis (%)	Total
Controle	-	132 (49,1)	137 (50,9)	269	63 (23,4)	206 (76,6)	269
OPS	0	97 (88,2)	13 (11,8)	110	80 (72,7)	30 (27,3)	110
	1	161 (79,7)	41 (20,3)	202	136 (67,3)	66 (32,7)	202
SSV	0	131 (87,9)	18 (12,1)	149	100 (67,1)	49 (32,9)	149
	1	240 (88,6)	31 (11,4)	271	213 (78,6)	58 (21,4)	271
Total		761	240	1001	592	409	1001

OPS: vitrificação em palhetas abertas estendidas (Open Pulled Straw); SSV: vitrificação em superfície sólida (Solid Surface Vitrification); Supercool X-1000™ (21st Century Medicine, Inc., Rancho Cucamonga, CA, USA).

A principal característica de oócitos eqüinos é a presença de uma grande quantidade de gotas de lipídio em associação com as mitocôndrias e o retículo endoplasmático liso (Fernandes, 2004), por este motivo tanto oócitos como embriões desta espécie são extremamente sensíveis ao estresse oxidativo, e durante a criopreservação, a formação de radicais livres de oxigênio diminui marcadamente a viabilidade celular (Somfai *et al.*, 2007).

Os resultados observados neste estudo sugerem que, a adição de menores concentrações do bloqueador sintético de gelo nas soluções de vitrificação de oócitos imaturos de eqüinos sejam testadas.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que a adição do bloqueador sintético de gelo, Supercool X-1000™, nas soluções de vitrificação do método OPS mostrou resultados superiores em relação à taxa de maturação *in vitro* e a viabilidade de membrana dos oócitos eqüinos. Enquanto que a adição do bloqueador sintético de gelo nas soluções de vitrificação do método SSV não mostrou efeito na taxa de MIV, porém, diminuiu a taxa de viabilidade de membrana dos oócitos eqüinos.

5. REFERÊNCIAS

CURCIO, B. R. **Maturação e Vitriificação de Oócitos Eqüinos Incubados em Meio Contendo Hormônio do Crescimento e Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-I**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, 75 p., 2005.

DINNYES, A.; SOMFAI, T.; SAGE, D.; MAROSAN, M.; CARNWATH, J.; NIEMANN, H.; Cryopreservation of in vitro porcine oocytes by solid surface vitrification. **Reproduction Fertility Development**, v. 17, p. 191–192, 2005.

FAHY, G. M.; WOWK, B.; WU, J.; PAYNTER, S. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. **Cryobiology**, v. 48, p. 22–35, 2004.

FERNANDES, C. B. **Maturação *in vitro* de ovócitos eqüinos: comparação entre os meios TCM 199, SOFaa e HTF:BME, e avaliação da adição de FSH bovino, FSH eqüino e do hormônio de crescimento eqüino por meio da transferência de ovócitos**. Dissertação apresentada ao Pós-graduação em Medicina Veterinária, UNESP, Botucatu, 129 p., 2004.

LEON, P. M. M., SANTOS, E. C. S., RAMBO, G., LUCIA Jr., T., DESCHAMPS, J. C. Aumento da taxa de maturação in vitro de oócitos eqüinos com a adição de cisteamina ao meio In: V Jornadas Técnicas de la Facultad de Veterinaria, 2007, Montevideo/Uruguai. **V Jornadas Técnicas de la Facultad de Veterinaria**. Montevideo: Facultad de Veterinaria, 2007.

MACEDO Jr., M. C.; DESCHAMPS, J. C., LUCIA Jr., T.; BORDIGNON, J.; SERRET, C. G.; RAMBO, G.; PIVATO, I.; SCHMITT, E. In vitro penetration of fresh and vitrified swine oocytes by homologous spermatozoa using different incubation systems. **Animal Reproduction Science**, v. 92, p. 334–348, 2006.

NAITANA, S.; LEDDA, S.; LOI, P.; LEONI, G.; BOGLIOLO, L.; DATTENA, M.; CAPPAL, P. Polyvinyl alcohol as a defined substitute for serum in vitrification and warming solutions to cryopreserve ovine embryos at different stages of development. **Animal Reproduction Science**, v. 48, p. 247–256, 1997.

SOMFAI, T.; DINNYES, A.; SAGE, D.; MAROSAN, M.; CARNWATH, J. W.; OZAWA, M.; KIKUCHI, K.; NIEMANN, H. Development to the blastocyst stage of parthenogenetically activated in vitro matured porcine oocytes after Solid Surface Vitrification (SSV). **Theriogenology**, v. 66, p. 415-422, 2006.

SOMFAI, T.; OZAWA, M.; NOGUCHI, J.; KANEKO, H.; WAYAN, N.; KARJA, K.; FARHUDIN, M.; DINNYÉS, A.; NAGAI, T.; KIKUCHI, K. Developmental competence of in vitro-fertilized porcine oocytes after in vitro maturation and solid surface vitrification: effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage. **Cryobiology**, 2007, doi: 10.1016/j.cryobiol.2007.06.008.

STATISTIX®. **Statistix 8.0 Analytical Software**, Tallahassee FL, 2003.

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P.J.; et al. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.51, p. 53-58, 1998a.

VAJTA G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 357–64, 2000.

WOWK, B.; LEITL, E.; RASCH, C. M.; MESBAH-KARIMI, N.; HARRIS, S. B.; FAHY, G. M. Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. **Cryobiology**, v. 40, p. 228–236, 2000.