

TAXAS DE MATURAÇÃO DE OÓCITOS CONGELADOS LENTAMENTE DE CAPRINOS

(Slowly frozen caprine oocyte maturation rate)

Marlene Sipaúba de OLIVEIRA; Clarissa de Castro e BRAGA; Leticia Soares de Araújo
TEIXEIRA; Leonardo Lopes FURTADO; Janaína de Fátima Saraiva CARDOSO;
Ana Lys Bezerra Barradas MINEIRO; Ney Rômulo de Oliveira PAULA

Residência Multiprofissional, Universidade Federal do Piauí (UFPI). Campus Universitário
Ministro Petrônio Portella, Ininga, Teresina/PI. CEP: 64.049-550.

*E-mail: peessoasipauba@yahoo.com.br

ABSTRACT

The objective was to evaluate the maturation rates of goat oocytes submitted to slow freezing in conventional medium for IVF. For this purpose, cumulus-oocyte complexes aspirated from pubic goat ovaries were classified morphologically and slowly frozen with 1.5 M ethylene glycol. After thawing the cryopreserved oocytes, those classified as viable were matured in conventional in vitro maturation medium. Evaluating the maturation rate, the percentage of matured oocytes in the group that underwent the cryopreservation process is significantly lower (17.6%) when compared to the control group (69.2%), also showing a high percentage of immature oocytes. Several oocyte injuries were found, caused by the studied cryopreservation method, interfering with their oocyte competence. Even with nuclear maturation rates, observed through the extrusion of the first polar corpuscle, the morphologies were altered in most oocytes, and further studies using new techniques and / or other cryoprotectants are necessary.

Key words: Oocytes, MIV, slow freezing, goat

INTRODUÇÃO

A congelação lenta foi a primeira técnica conhecida e desenvolvida durante o início dos anos de 1970 com embrião humano, onde o germoplasma é exposto de forma lenta a baixas concentrações de crioprotetores (WILMUT, 1972; GUAITOLINI, 2012). Contudo, apesar de muitas pesquisas nos últimos 20 anos, não há uma técnica de criopreservação que possa garantir ótimas taxas de sobrevivência e desenvolvimento após o congelamento e descongelamento, independente das espécies estudadas (VAN DE ELST, 2003).

Diante da relevância da criopreservação de oócitos proporcionados para biotécnicas de reprodução e com intuito de desenvolver novos protocolos de congelamento ideal que se mantenha a viabilidade oocitária após descongelamento, o objetivo do presente trabalho foi avaliar as taxas de maturação de oócitos caprinos submetidos a congelamento lento em meio convencional para MIV.

MATERIAL E MÉTODOS

Local da pesquisa

A pesquisa foi desenvolvida no Setor de Reprodução Reprodução Animal, localizado no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, *Campus* da Socopo, Teresina, Piauí, Brasil e no Laboratório de Biologia Molecular e Desenvolvimento (LBMD),

localizado no Núcleo de Biologia Experimental (NUBEX) da Universidade de Fortaleza (UNIFOR) Fortaleza- CE. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, sob o nº 386/17.

Origem e obtenção dos oócitos

Os complexos *cúmulos*-oócitos provenientes de ovários de cabras púberes sem padrão raciais definidos (SRD), oriundos de abatedouros locais. Após o abate, os ovários colhidos foram transportados imediatamente ao laboratório em garrafa térmica contendo solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) aquecida a 37 °C acrescida de 40mg/mL de sulfato de gentamicina em um período máximo de duas horas.

No laboratório os ovários foram lavados com solução fisiológica e alocados em banho-maria por 37 °C durante todo período de aspiração em recipiente com Dulbecco phosphate buffered saline (DPBS) com Fetal Bovine Serum (BSA) 0,4%; IMV Technologies, Campinas, SP, Brasil). As aspirações foram realizadas com o uso de bomba a vácuo (Aspirador Cirúrgico AspiraMax[®] – NS, MA520-60, São Paulo, Brasil), ajustada a pressão para 50 mmHg, utilizando-se agulha de calibre 21G.

Recuperação e classificação dos oócitos

Os aspirados foram colocados diretamente em tubos tipo *Falcon* de 15mL e após 15 minutos em decantação, com uma pipeta o sedimento foi retirado e depositado em placas de Petri 100 x 10mm com solução de DPBS com BSA 0,4% (IMV Technologies, Campinas, SP, Brasil) aquecidas previamente em placa aquecedora com temperatura de 37 °C. Para seleção das estruturas oocitárias e classificação foi seguido os critérios morfológicos e avaliação de acordo com STRINGFELLOW e GIVENS (2010). A qualidade variou de I a IV, sendo selecionado aqueles que apresentavam qualidade I e II.

Foram selecionados oócitos com citoplasma uniforme, levemente granulado e coloração homogênea em estereomicroscópio, sob aumento de 45x, que em seguidas foram transferidos para outra placa com gotas de DPBS.

Congelação lenta e descongelção

Os oócitos com células do *cumulus* aderidas foram colocados em microtubos e levados ao vórtex por dois minutos para serem desnudos. Foram estabilizados em três gotas de 200µL de etilenoglicol (EG, IMV Technologies, Campinas, SP, Brasil) a 0,5; 1,0 e 1,5M por cinco minutos respectivamente.

Os oócitos foram envasados em grupos de cinco a 10 por palhetas de 0,25mL (IMV Technologies, Campinas, SP, Brasil) com EG a 1,5M. A criopreservação dos oócitos foi realizada pelo método de congelação lenta, utilizando máquina de congelação programável (TK 3000[®], TK Tec. Congel. LTDA, Uberaba, MG, Brasil), com curva de criopreservação iniciando no primeiro patamar a -6 °C, após dois minutos realizou-se a etapa de cristalização, em seguida inicio-se a rampa de congelação por dez minutos com queda de temperatura de 0,5 °C por minuto. Posteriormente, o segundo patamar a -32 °C foi atingido em torno de 60 minutos. As palhetas foram armazenadas em botijão criogênico (-195 °C).

Na descongelção procedeu-se a sequência inversa ao equilíbrio da congelação. Em seguida os oócitos foram lavados em meio de manutenção HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis,

MO, EUA), avaliados em estereomicroscópio no aumento de 45x, para análise morfológica. Oócitos com forma esférica e simétrica contendo citoplasma homogêneo e não contraído, foram consideradas viáveis e direcionados à maturação *in vitro* (MIV).

Os oócitos do grupo controle (oócitos fresco), após a classificação foram lavados em meio de manutenção Hepes e em meio para MIV.

Maturação oocitária *in vitro*

O total de oócitos selecionados foi dividido em dois grupos para maturação, um grupo controle (oócitos frescos) e outro com os oócitos criopreservados, onde os diferentes grupos foram imersos em meio de maturação *in vitro* convencional composto de TCM-199, suplementado com 10% de soro de cabra em estro, tratados pelo calor, sais de Earle, L-glutamina e 25mM de Hepes. Os oócitos foram dispostos em placa de 35 x 10mm em gotas de 100µL e cobertas por óleo mineral e incubados em uma atmosfera umidificada com 38,5 °C, 5% CO₂ por 24h. Ao final do processo, para avaliação da MIV os oócitos foram classificados como maturados quando presente o 1º corpúsculo polar (CP). Em seguida foram destinados à partenogênese aqueles avaliados como maduros (expulsão do 1º corpúsculo polar) e os com boa qualidade morfológica.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o Software SAS (Software Statistical Analysis System for Windows SAS®), os resultados foram avaliados por meio do teste não paramétrico X² para observar as possíveis diferenças entre as frequências observadas e esperadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliando a taxa de maturação em meio convencional para MIV (Tab. 01), o percentual de oócitos maturados do grupo que passou pelo processo de criopreservação é significativamente menor quando comparado com o grupo controle, apresentando também elevado percentual de oócito imaturos.

Tabela 01: Maturação oocitária em meio convencional dos oócitos caprinos do grupo controle (frescos) e grupo criopreservados.

Parâmetros	Controle n (%)	Criopreservados n (%)
Oócitos viáveis em MIV	65 (100,0)	51 (100,0)
Oócitos maturados	45 (69,2) ^b	9 (17,6) ^a
Oócitos imaturos	20 (30,8) ^b	42 (82,4) ^a

O Meio de maturação *in vitro* utilizado em nosso experimento é um meio convencional que vem apresentando boas taxas de maturação *in vitro* de oócitos caprinos, mas quando quando utilizado em oócito que passaram pelo processo de criopreservação com

etilenoglicol (EG a 1,5M) e utilizando máquina de congelação programável (TK 3000®) não foram obtidos bons resultados.

Vários estudos com oócitos criopreservados vem demonstrando resultados negativos, alguns acreditam que sejam por falhas na técnica utilizada ou até mesmo o crioprotetor de escolha. QUAN *et al.* (2014), obteve resultados próximos aos encontrado em nosso estudo, taxa de maturação de 32,65 % em oócitos de caprinos. Baixas taxas de maturação de oócitos criopreservados estão associados há várias lesões nos oócitos: fratura da zona pelúcida que é um dano frequente, compromete a sua capacidade de desenvolvimento posterior. Com o aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular causado pela exposição aos crioprotetores simula o pico que acontece durante o processo de fertilização, ocorrendo o endurecimento prematuro da zona pelúcida desencadeado da exocitose dos grânulos corticais, que é um processo dependente de Ca^{2+} , interferido a posterior penetração do espermatozoide e a fertilização (KOHAYA *et al.*, 2011); perda da integridade da membrana devido ao tempo de exposição a baixas temperaturas durante a criopreservação, que resultam em perdas de viabilidade e função (ZERON *et al.*, 1999).

A ação dos crioprotetores deixa a membrana mais sensível e facilita a transição do estado líquido para gel, causando vários prejuízos no desenvolvimento. Os movimentos de retração e distensão do oócito, resultantes do choque osmótico causado pelo o método de vitrificação, podem romper a membrana plasmática e conduzir à morte do oócito (MUKAIDA e OKA, 2012).

O processo de maturação oocitária é uma complexa sequência de acontecimentos nucleares e citoplasmáticos (FISSORE *et al.*, 2002) e necessita de um sistema *in vitro* ideal para o desenvolvimento oocitário, que seria aquele em que oócitos isolados atingissem o crescimento e a competência para maturação em um meio definido sem a unidade folicular (TELFER, 1998).

Nos resultados encontrados observamos que mais de 80% dos oócitos criopreservados estavam imaturos. Entretanto poderiam não estar estágio que antecede MII, precisassem de mais tempo para ocorrer à maturação ou alguns já estivessem maturados e seu corpúsculo não estivessem mais presente no momento da observação com 24h.

Notoriamente, foram encontradas várias injúrias nos oócitos, causadas pelo método de criopreservação estudado, interferindo na competência oocitária dos mesmos. Mesmo apresentando taxas de maturação nuclear, observadas por meio da extrusão do primeiro corpúsculo polar, a morfologias estavam alterada na maioria dos oócitos, sendo necessários novos estudos empregando novas técnicas e ou outros crioprotetores.

REFERÊNCIAS

- FISSORE, R.A.; KUROKAWA, M.; KNOTT, J.; ZHANG, M.; SMYTH, J. Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. *Reproduction*, v.124, p.745-754, 2002.
- GUAITOLINI, C.R.F.; TAFFAREL, M.O.; TEIXEIRA, N. S.; SUDANO, M.J.; FREITAS, P.M.C.; LOPES, M.D.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; DE OLIVEIRA, C.A.; LUZ, M.R.

Post-thaw viability of in vivo-produced canine blastocysts cryopreserved by slow freezing. *Theriogenology*, v.78, p.576-582, 2012.

KOHAYA, N.; FUJIWARA, K.; ITO, J.; KASHIWAZAKI, N. High Developmental Rates of Mouse Oocytes Cryopreserved by an Optimized Vitrification Protocol: The Effects of Cryoprotectants, Calcium and Cumulus Cells. *Journal of Reproduction and Development*, v.57, p.675–680, 2011.

MUKAIDA, T.; OKA, C. Vitrification of oocytes, embryos and blastocysts. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, v.26, p.789–803, 2012.

QUAN, G.B.; LI, W.J.; LAN, Z.G.; WU, S.S.; SHAO, Q.Y.; HONG, Q.H. The effects of meiotic stage on viability and developmental capability of goat oocytes vitrified by the Cryoloop method. *Small Ruminant Research*, v.116, p.32-36, 2014.

TELFER, E.E. In vitro models for oocyte development. *Theriogenology*, v.49, p.451-460, 1998.

VAN DER ELST, J. Oocyte freezing: here to stay?. *Human Reproduction Update*, v.9, p.463–470, 2003.

WILMUT, I. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Science II*, v.11, p.1071-1079, 1972.

ZERON, Y.; PEARL, M.; BOROCHOV, A.; ARAV, A. Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes. *Cryobiology*, v.38, p.35–42, 1999.