

TOXICIDADE DAS SOLUÇÕES DE VITRIFICAÇÃO ADICIONADAS DE BLOQUEADOR SINTÉTICO DE GELO EM OÓCITOS EQUINOS

**LEON, P. M. M.¹; CORCINI, C. D.²; SANTOS, E. C. S.²; RAMBO, G.¹;
BRUM, V.^{1*}; LUCIA Jr., T.¹; DESCHAMPS, J. C.¹**

*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 criopreservação tem como objetivo manter o metabolismo celular em estado de quiescência, tornando possível a conservação de células e tecidos por tempo indeterminado (Green, 2005). Em muitas espécies de mamíferos, incluindo camundongos (Fahy *et al.*, 2004), bovinos (Dinnyes *et al.*, 2000) e humanos (Quinn *et al.*, 1986), a criopreservação teve sucesso. Porém, oócitos eqüinos possuem baixa resistência à criopreservação e são extremamente sensíveis ao estresse oxidativo, tendo como principal causa sua característica grande quantidade de lipídio associado às mitocôndrias e o retículo endoplasmático liso (Fernandes, 2004; Somfai *et al.*, 2007), além da falta de conhecimento em relação à permeabilidade de membrana (Hochi *et al.*, 1996).

A vitrificação surge como alternativa ao congelamento lento, por envolver 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 aos crioprotetores durante o processo de vitrificação, as altas concentrações de crioprotetores podem causar danos às células devido a sua toxicidade química (Vajta *et al.*, 1998; Fahy *et al.*, 2004). Macromoléculas, como açúcares, soro fetal bovino (SFB) e polímeros sintéticos, são utilizadas com a finalidade de redução da toxicidade de 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 objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade das soluções crioprotetoras utilizadas nos métodos de vitrificação em palhetas abertas estendidas (OPS - Open Pulled Straw) e em superfície sólida (SSV - Solid Surface Vitrification) adicionadas de bloqueador sintético de gelo, Supercool X-1000™, em oócitos eqüinos, através da taxa de maturação *in vitro* e a viabilidade de membrana.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 168 ovários de éguas, coletados aleatoriamente em abatedouro de Pelotas/RS no período de novembro a dezembro 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 entre 10 a 30 mm de diâmetro.

Os 356 CCOs coletados foram submetidos a um teste de toxicidade, ou seja, foram expostos a soluções de vitrificação por tempo determinado, porém, não foram vitrificados. Os CCOs foram divididos aleatoriamente entre as soluções e protocolos utilizados nos métodos de vitrificação em palhetas abertas estendidas (OPS - Open Pulled Straw), conforme o citado por Macedo *et al.* (2006), e de vitrificação em superfície sólida (SSV - Solid Surface Vitrification), adaptado do protocolo utilizado por Dinnyes *et al.* (2005). Dentro de cada método, os CCOs foram subdivididos de acordo ao tratamento das soluções de vitrificação, acrescidas do bloqueador sintético de gelo, Supercool X-1000™, na concentração de 0,1% e 1%, e controle, ou seja sem a presença do bloqueador sintético de gelo. Após a exposição dos CCOs às soluções de vitrificação, estes foram re-hidratados com as soluções de desvitrificação dos respectivos protocolos de vitrificação.

No método OPS, os CCOs foram colocados na solução de vitrificação 1 [SV1: 1,4M de Dimetilsulfóxido (DMSO) (P.A.- Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro), 1,8M de Etilenoglicol (P.A – LABSYNTH, São Paulo), 8ml de TCM199 Hank's (Nutricell®, Brasil), suplementada com 0,1%, 1% ou sem o Supercool X-1000™], a 37°C durante 1 minuto e 30 segundos. Logo em seguida, os CCOs foram transferidos para a solução de vitrificação 2 [SV2: 2,8M de DMSO, 3,6M de Etilenoglicol, 0,6M de Sacarose (P.A. – LABSYNTH, São Paulo) e 4ml de TCM199, suplementada com 0,1%, 1% ou sem o Supercool X-1000™] durante 30 segundos. Para re-hidratação foram utilizadas três soluções de sacarose, a 0,5M, 0,25M e 0,125M, respectivamente, a 37°C, durante 5 minutos em cada solução.

No método SSV, os CCOs foram colocados em solução de vitrificação 1 [SSV1: 400µl de Etilenoglicol, 2ml de SFB inativado (Nutricell®, Brasil) e 7,5ml de TCM199, suplementada com 0,1%, 1% ou sem o Supercool X-1000™], a 37°C durante 10 a 15 minutos, e transferidos para a segunda solução de vitrificação [SSV2: 3,5ml de Etilenoglicol, 2ml de SFB inativado, 0,5g de Polivinilpirrolidona (PVP) (Sigma® - Aldrich, Alemanha), 1,37g de Sacarose, 7ml de TCM199, suplementada com 0,1%, 1% ou sem o Supercool X-1000™], em três tempos de 30 segundos cada. Neste método os CCOs foram re-hidratados em solução de trealose 0,3M (Sigma® - Aldrich, Alemanha) a 37°C durante 3 minutos.

Os CCOs já re-hidratados foram maturados *in vitro* conforme citado por Leon *et al.*, (2007), ao fim das 40 horas de incubação da maturação *in vitro* (MIV), as células do *cumulus oophorus* foram retiradas por pipetagem em solução de 80UI 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

Os resultados do teste de toxicidade das soluções de vitrificação do método OPS e SSV de acordo com a adição do bloqueador sintético de gelo, em relação à taxa de MIV e a viabilidade de membrana estão representados na tabela 1.

Em relação ao grupo OPS, a adição de 0,1% de X-1000 mostrou melhores resultados de viabilidade de membrana (71,4%, $P = 0,0548$; $OR = 2,27$; $IC\ 95\% = 0,98 - 5,25$) em relação ao grupo com 1% de X-1000 (52,4%). Quanto à taxa de MIV, não foi observado diferença entre os tratamentos das soluções de vitrificação com o bloqueador sintético de gelo.

No método de vitrificação SSV, a adição de 0,1% de X-1000 mostrou tendência a melhores resultados de taxa de MIV (61,4%; $P = 0,0644$; $OR = 0,46$; $IC\ 95\% = 0,20 - 1,05$) em relação ao grupo sem a adição de X-1000 (42,3%). Quanto à viabilidade de membrana, a adição de 0,1% de X-1000 resultou em melhores taxas (86,4%; $P = 0,0353$; $OR = 0,32$; $IC\ 95\% = 0,11 - 0,92$) em relação ao grupo com 1% de X-1000 (66,7%).

Tabela 1 – Maturação nuclear e viabilidade de membrana no teste de toxicidade dos grupos OPS e SSV de acordo com o tratamento das soluções de vitrificação, sem a adição e com a adição do Supercool X-1000™ nas concentrações de 0,1% e 1%.

Teste de Toxicidade	Supercool X-1000™ (%)	Maturação Nuclear			Viabilidade de Membrana		
		Imaturos (%)	Maturos (%)	Total	Inviáveis (%)	Viáveis (%)	Total
OPS	0	29 (63,0)	17 (37,0)	46	14 (30,4)	32 (69,6)	46
	0,1	31 (55,4)	25 (44,6)	56	16 (28,6)	40 (71,4)	56
	1	21 (50,0)	21 (50,0)	42	20 (47,6)	22 (52,4)	42
SSV	0	30 (57,7)	22 (42,3)	52	15 (28,8)	37 (71,2)	52
	0,1	17 (38,6)	27 (61,4)	44	6 (13,6)	38 (86,4)	44
	1	21 (50,0)	21 (50,0)	42	14 (33,3)	28 (66,7)	42
Total		149	133	282	85	197	282

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).

Quando tomado como referência o grupo SSV com adição de 0,1% de X-1000, foi observado maior taxa de MIV (61,4%; P = 0,0219; OR = 0,37; IC 95% = 0,16 – 0,87), e maior viabilidade de membrana (86,4%; P = 0,0607; OR = 0,36; IC 95% = 0,12 – 1,05) em relação ao grupo OPS sem o X-1000 (37,0%; 69,6%). Assim como, maior viabilidade de membrana (86,4%; P = 0,0011; OR = 0,17; IC 95% = 0,06 – 0,50) em relação ao grupo OPS com 1% de X-1000 (52,4%).

No grupo de oócitos expostos aos crioprotetores utilizados no método SSV, etilenoglicol, PVP e sacarose, e as macromoléculas, SFB inativado, adicionados de Supercool X-1000™ na concentração de 0,1%, foram observados resultados superiores em relação aos crioprotetores utilizados no método OPS, DMSO, etilenoglicol e sacarose. Tharasanit *et al.* (2006) observaram taxa de maturação semelhante a do presente estudo, pois, apenas a exposição dos oócitos eqüinos às soluções de vitrificação, com os crioprotetores etilenoglicol, DMSO e sacarose, sem a vitrificação resultou em 55% de maturação *in vitro*.

A adição do Supercool X-1000™ às soluções de vitrificação dos métodos OPS e SSV, pareceu diminuir a toxicidade e as injúrias osmóticas causadas pelas soluções crioprotetoras, já que foi observada uma maior taxa de oócitos maduros nestes grupos. O X-1000, adicionado em baixa concentração nas soluções de vitrificação, suprime significativamente a formação de gelo, por impedir a formação inicial do núcleo do cristal de gelo e se liga à membrana celular protegendo a célula (Wowk *et al.*, 2000; Fahy *et al.*, 2004). O Supercool X-1000™ foi utilizado na vitrificação oócitos de camundongos (Fahy *et al.*, 2004), de eqüinos (Curcio, 2005) e suínos (Macedo, 2006), mostrando resultados promissores.

A vitrificação é uma técnica de criopreservação promissora na reprodução assistida, sendo um procedimento simples, menos oneroso, e que requer um menor tempo despendido (Dobrinsky, 2002). Apesar da breve exposição dos oócitos aos crioprotetores, as altas concentrações de crioprotetores podem causar danos às células devido a injúrias osmóticas e citotóxicas (Niemann, 1991; Vajta *et al.*, 1998; Fabbri *et al.*, 2000), comprometendo a competência do oócito. Para o sucesso da vitrificação em oócitos eqüinos, maiores estudos devem ser desenvolvidos com o objetivo de determinar a concentração ideal dos crioprotetores das soluções de vitrificação; e o tempo ideal de exposição dos oócitos a estas soluções.

4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo, concluí-se que as soluções de vitrificação utilizados no método SSV, adicionadas do bloqueador sintético de gelo na concentração de 0,1%, mostraram menor toxicidade aos oócitos eqüinos. A adição do bloqueador sintético de gelo, Supercool X-1000™, diminuiu a toxicidade celular das soluções crioprotetoras, pois, sua presença nas soluções de vitrificação dos métodos OPS e SSV aumentou a taxa de maturação *in vitro* no teste de toxicidade, comparado às soluções de vitrificação sem o bloqueador sintético de gelo.

5. REFERÊNCIAS

- CURCIO, B. R. **Maturação e Vitrificação de Oócitos Equinos 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.; DAI, Y.; JIANG, S.; YANG, X. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 513-518, 2000.
- 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.
- DOBRINSKY, J.R. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. **Theriogenology**, v. 57, p. 285-302, 2002.
- FABBRI, R.; PORCU, E.; MARSELLA, T.; PRIMAVERA, M. R.; ROCCHETTA, G.; CIOTTI, P. M.; MAGRINI, O.; SERACCHIOL, R.; VENTUROLI, S.; FLAMIGNI, C. Technical aspects of oocyte cryopreservation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 169, p. 39-42, 2000.
- 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.
- GREEN, R. E. **Princípios e Técnicas da Vitrificação de Embriões dos Animais Domésticos**. Monografia apresentada a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica da UNESP- Botucatu, 21 p., 2005.
- 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.; CAPPALÀ, 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.

NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, v. 35, p. 109-124, 1991.

QUINN, P.; KERIN, J.; STONE, B.; WILSON, L. **Successful cryopreservation of human oocytes**. In: 42nd Ann Mtg Am. Fertil. Soc. an 18th Ann Mtg Canadian Fertil. Androl. Soc. 1986, p. 72 (abstract).

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.

THARASANIT, T.; COLLEONI, S.; LAZZARI, G.; COLENBRANDER, B.; GALLI, C.; STOUT, T.A.E. Developmental competence of equine oocytes vitrified at different stages of maturation. **Animal Reproduction Science**, doi:10.1016/j.anireprosci.2006.03.028.

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, 1998.

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.