

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA



Tese

Vitrificação de oócitos imaturos de eqüinos: Características morfológicas
ultra-estruturais e maturação nuclear *in vitro*

Bruna da Rosa Curcio

Pelotas, 2006

Bruna da Rosa Curcio

Vitrificação de oócitos imaturos de eqüinos: Características morfológicas ultra-estruturais e maturação nuclear *in vitro*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (Área do conhecimento: Reprodução Animal).

Orientador: João Carlos Deschamps

Pelotas, 2006

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

C975v Curcio, Bruna da Rosa

Vitrificação de oócitos imaturos de eqüinos :
características morfológicas ultra-estruturais e maturação
nuclear *in vitro* / Bruna da Rosa Curcio ; orientador João
Carlos Deschamps. – Pelotas, 2006. – 63f. : il. pb. – Tese
(Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Agrícola. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de
Pelotas. Pelotas, 2006.

1.Biotecnologia. 2.Eqüinos. 3.Oócitos. 4.Vitrificação.
5.MIV. 6.Ultra-estrutura. I.Deschamps, João Carlos. II.Título.

CDD: 636.1

Banca examinadora:

Dra. Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro

Prof^a. Dra. Maria Gabriela Tavares Rheingantz

Prof. Dr. Carlos Eduardo Wayne Nogueira

Prof. PhD. João Carlos Deschamps
Orientador

Dedicatória

*Dedico esse trabalho aos inteligentes, sensíveis e maravilhosos CAVALOS,
em especial aqueles que fizeram parte da minha vida até agora!*

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia pela oportunidade de realizar o doutorado.

A CAPES pela bolsa de estudos oferecida durante o curso.

Ao meu orientador João Carlos Deschamps pelo tempo dedicado aos trabalhos.

Ao matadouro Miramar, por permitir a coleta do material necessário para os experimentos.

Ao laboratório de microscopia eletrônica da Faculdade de Veterinária-UFPEL por proporcionar a execução das análises ultra-estruturais, em especial a Dr^a Ana Lúcia Schild e a técnica de laboratório Simone.

A Dr^a Lígia Pegoraro pelo grande conhecimento transmitido e amizade durante essa etapa.

Prof Severo S. Barros pelo auxílio na avaliação ultra-estrutural dos oócitos e pelo grande conhecimento transmitido.

Aos graduandos de medicina veterinária pelo enorme auxílio durante a execução dos trabalhos, em especial a André Boff, Carine Corcine, Denise Leite, Gissele Rambo e Luis Pedro Albuquerque.

As minhas amigas Alegani Monteiro e Carina Moraes pela companhia, amizade e principalmente o grande auxílio durante a fase final do curso.

A minha família pelo apoio, carinho e compreensão.

E aos meus sempre companheiros Rodrigo e Olga, sempre presentes em todos os momentos de minha vida.

*“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil – e,
no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.”*

Albert Einstein

Resumo

CURCIO, Bruna da Rosa. **Vitrificação de oócitos imaturos de eqüinos: Características morfológicas ultra-estruturais e maturação nuclear *in vitro***. 2006. 62f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Os objetivos do presente estudo foram: 1) analisar características morfológicas ultra-estruturais em oócitos eqüinos submetidos à vitrificação; 2) avaliar a maturação nuclear *in vitro* (MIV) de oócitos eqüinos vitrificados em soluções contendo bloqueadores sintéticos da formação de gelo (SIB); 3) considerar a influência das características das células do *cumulus-oophorus* no momento da coleta sobre a maturação nuclear *in vitro*. Foram utilizados complexos *cumulus*-oócito obtidos de ovários provenientes de éguas de abatedouro. No primeiro experimento 30 oócitos foram divididos em 3 grupos: Grupo controle (**G1**, n=10); Grupo 2 (**G2**, n=10), vitrificados após exposição de 3min em VS-1 e 1min em VS-2; Grupo 3 (**G3**, n=10), exposição por 1,5min à VS-1 e 30s à VS-2. A vitrificação foi realizada em palhetas abertas estiradas (OPS). As características ultra-estruturais foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão, sendo os oócitos classificados em três categorias: I) Oócitos sem alterações; II) oócitos com alterações intermediárias e III) oócitos com alterações severas. No segundo experimento, oócitos *cumulus* compacto (**Ccp**; n=248) e *cumulus* expandido (**Cex**; n=264) foram divididos em três grupos: Controle, Tratamento-1 (**T1** - Etilenoglicol-EG + Dimetilsulfóxido-DMSO + SIB) e Tratamento-2 (**T2** - formamida + EG + DMSO + Polivinilpirrolidona + SIB). O grupo controle foi MIV imediatamente após a coleta, o restante foi vitrificado imaturo em OPS e submetido a MIV após o reaquecimento. O estágio de maturação após incubação foi avaliado em microscópio de fluorescência (Hoechst 33342). Na avaliação de ultra-estrutura foram classificados no score I 80% oócitos **G1**, 30% do **G2** e 60% do **G3**; Classificação II: 0% dos oócitos **G1**, 20% do **G2** e 30% do **G3**; e Classificação III: 20% dos **G1**; 50% do **G2** e 10% do **G3**. Na avaliação da maturação, o índice de oócitos que atingiram MII foi 41% Controle, 38,3% **T1** e 33,3% **T2** ($P>0,05$). Nos oócitos do grupo controle, o índice de MII foi superior em oócitos **Cex** (53,2%) do que oócitos **Ccp** (29,3%; $P<0,05$). A avaliação da influência das características das células do *cumulus* na vitrificação não detectou diferença ($P>0,05$). Contudo oócitos

Cex obtiveram maiores índices de MII do que oócitos **Ccp** em T1 (50% vs 27,3%) e T2 (45,7% vs 21,6%). Pode-se concluir que a diminuição do período de exposição às soluções de vitrificação resultou em melhor preservação das características ultra-estruturais de oócitos eqüinos submetidos à vitrificação. Oócitos eqüinos imaturos podem ser MIV após vitrificação/reaquecimento, obtendo índices satisfatórios de MII. As características das células do *cumulus*, no momento da coleta, não interferem no índice de maturação nuclear *in vitro* de oócitos eqüinos após vitrificação.

Palavras-chave: Oócitos, eqüinos, vitrificação, MIV, ultra estrutura.

Abstract

CURCIO, Bruna da Rosa. **Vitrification of immature equine oocytes: ultrastructural morphologic characteristics and nuclear *in vitro* maturation.** 2006. 62f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The aim of the study was to investigate: 1) the ultrastructural morphologic characteristics in equine oocytes subjected to different times of exposure to cryoprotectant solutions and 2) the effect of initial *cumulus* morphology and cryoprotectants in the nuclear *in vitro* maturation (IVM) of the vitrified immature equine oocytes. The oocytes were obtained from ovaries from a slaughterhouse. In the first study 30 oocytes were divided in three groups: Control group (**G1**, n=10); Group 2 (**G2**, n=10), the oocytes were vitrified for exposure to VS-1 for 3min and VS-2 for 1min; Group 3 (**G3**, n=10), exposure to VS1 for 1.5min and VS-2 for 30sec. The oocytes were vitrified in *open-pulled-straws* (OPS). The ultrastructural characteristics were observed using a transmission electron microscope. The oocytes were classified as: I) oocytes morphologically normal; II) oocytes which presented intermediate damage **but had** completed organelles, and III) oocytes with severe morphological abnormalities. In the second study, compact (**Ccp**; n=248) and expanded (**Cex**; n=264) cumulus oocyte complexes were divided in three groups: Control, Treatment-1 (**T1** - Ethylene glycol-EG + Dimethyl sulfoxide-DMSO + SIB) and Treatment-2 (**T2** - Formamide + EG + DMSO + Polyvinylpyrrolidone + SIB). The control group was immediately matured *in vitro*, the other immature oocytes were vitrified in OPS and then matured *in vitro*. The maturation stage was observed under a fluorescence microscope (Hoechst 33342). The results of ultrastructural morphology were rated as Class I: 80% oocytes of **G1**, 30% of **G2** and 60% of **G3**; Class II: 0% oocytes of **G1**, 20% of **G2** and 30% of **G3** 30%, and Class III: 20% oocytes of **G1**, 50% of **G2** and 10% of **G3**. The maturation rates (metaphase II - MII) were: 41% Control group, 38,3% **T1** and 33,3% **T2** ($P>0,05$). In the control group, the MII rates were higher in **Cex** oocytes (53,2%) than those **Cco** oocytes (29,3%; $P<0,05$). The initial cumulus morphology didn't significantly affect MII rates after vitrification ($P>0,05$). However, **Cex** oocytes

had higher MII rates than **Ccp** oocytes in **T1** (50% vs 27,3%) and **T2** (45,7% vs 21,6%). It can be concluded that the reduction in time of exposure to cryoprotectant solutions resulted in better preservation of ultrastructural characteristics of equine oocytes submitted to vitrification. Immature equine oocytes can be IVM after vitrification/re-warming, and satisfactory MII rates can be obtained. The initial cumulus morphology did not affect nuclear *in vitro* maturation of equine oocytes after vitrification.

Keywords: Oocytes, equine, vitrification, IVM, ultra structure.

Lista de figuras

Artigo 1

Figura 1	Características ultra-estruturais de oócitos frescos (controle) e vitrificados classificados no escore.....	33
Figura 2	Características morfológicas ultra-estruturais em oócitos após a vitrificação	34
Figura 3	Oócitos classificação III, antes e após a vitrificação.....	35

Artigo 2:

Figura 1	Oócitos eqüinos imediatamente após a coleta.....	55
Figura 2	Oócitos frescos (grupo controle - Cex) em metáfase II, após incubação de 40h.....	56
Figura 3	Oócitos imaturos após vitrificação/reaquecimento.....	57
Figura 4	Oócitos vitificados/reaquecidos em estágio de Metáfase II, após 40h de incubação.....	58

Lista de tabelas

Artigo 1

Tabela 1	Classificação dos oócitos Grupo 1, 2 e 3 de acordo com as características morfológicas ultra-estruturais avaliadas.....	32
----------	---	----

Artigo 2:

Tabela 1	Comparação dos índices de maturação de oócitos frescos e vitrificados (tratamentos 1 e 2), cultivados sob atmosfera de mistura de gás.....	51
Tabela 2	Comparação dos índices de maturação de oócitos eqüinos frescos, cultivados sob atmosfera de mistura de gás.....	52
Tabela 3	Descrição dos índices de maturação de oócitos eqüinos submetidos à vitrificação (Vit 1 e Vit 2), de acordo com as características das células do <i>cumulus</i>	53
Tabela 4	Modelo de regressão logística para comparação dos índices de maturação dos oócitos, avaliando a interação entre os tratamentos de vitrificação e as características das células do <i>cumulus</i>	54

Lista de abreviaturas

BSA – Albumina sérica bovina
C – Citoesqueleto
Cco – Complexo *cumulus*-oócito
Cco – Complexos *cumulus-oophorus*
Ccp – *Cumulus* compacto
Cex – *Cumulus* expandido
DMSO – Dimetilsulfóxido
EG – Etilenoglicol
eGH – Hormônio do crescimento eqüino
EP – Espaço perivitelino
FIV – Fertilização *in vitro*
G – Complexo de Golgi
GC – Grânulo cortical
ICSI – Injeção intracitoplasmática de espermatozóide
IGF-I – Hormônio semelhante à insulina I
M – Mitocôndria
M II – Metáfase II
MIV – Maturação *in vitro*
Mv – Microvilosidades
OPS – Open pulled straw (palhetas abertas estiradas)
Ov – Ovoplasma
PBS – Solução salina fosfatada tamponada
SFB – soro fetal bovino
SIB – Synthetic ice blocker (bloqueador da formação de gelo)
TCM – Tissue culture medium (meio de cultivo de tecidos)
TO – Transferência de oócito
VG – Vesícula Germinativa
VS-1 – Solução de vitrificação 1
VS-2 – Solução de vitrificação 2
ZP – Zona pelúcida

SUMÁRIO

Resumo.....	06
Abstract.....	08
Lista de figuras.....	10
Lista de tabelas.....	11
Lista de abreviaturas.....	12
Sumário.....	13
Introdução Geral.....	14
Artigo 1: Características morfológicas ultra-estruturais em oócitos equinos submetidos a diferentes tempos de exposição às soluções de vitrificação.....	18
Resumo.....	19
Abstract.....	19
Introdução.....	20
Material e Métodos.....	21
Resultados.....	23
Discussão.....	25
Referências Bibliográficas.....	28
Artigo 2: Influência das características das células do <i>cumulus oophorus</i> e dos crioprotetores sobre a maturação <i>in vitro</i> de oócitos equinos vitrificados imaturos.....	36
Resumo.....	37
Abstract.....	37
Introdução.....	38
Material e Métodos.....	40
Resultados.....	43
Discussão.....	43
Referências Bibliográficas.....	46
Conclusões gerais.....	59
Referências bibliográficas.....	61

Introdução Geral

O histórico da reprodução assistida em eqüinos inicia no século 19, quando Walter Heape, em 1898, obteve a primeira prenhez a partir de inseminação artificial (GALLI et al., 2006). O progresso das biotécnicas reprodutivas na espécie eqüina ocorreram de forma muito irregular, quando comparado com outras espécies de produção (FARIN et al., 2006). A utilização da inseminação artificial realmente difundiu-se na indústria do cavalo (SQUIRES, 2005), contudo outras tecnologias baseadas na produção de embriões *in vivo* e *in vitro* emergiram apenas nos últimos anos (GALLI et al., 2006). Essa situação contrasta com o rápido desenvolvimento e aplicação de tecnologias reprodutivas em outras espécies, como bovinos, ovinos e suínos, nas quais a aplicação dessas é um dos pontos importantes no sucesso na exploração comercial (GALLI et al., 2006).

Uma das causas do atraso nas pesquisas e utilizações das biotécnicas da reprodução em eqüinos são as restrições administrativas das associações de raça (PIMENTEL et al., 1998; GALLI et al., 2006), as quais durante muitos anos negavam a disseminação da reprodução assistida. Ainda hoje associações de raça importantes como do Puro-sangue inglês e Crioulo impõem uma série de restrições.

O escasso número de abatedouros de eqüinos existentes no mundo também é outro fator negativo, pois dificulta a obtenção de material, principalmente para pesquisas básicas (SQUIRES et al., 2003).

Além desses fatores, o índice de recuperação oocitária é muito inferior quando comparado com outras espécies, sendo necessário o emprego de técnicas especiais, como o *slicing* dos ovários (CHOI et al., 1993) e o *scraping* dos folículos (HINRICHS et al., 1993; CURCIO et al., 2006). Essas técnicas utilizadas são delicadas e demoradas em sua execução, tornando-se uma importante limitante nos trabalhos. Uma comparação realizada por pesquisadores italianos exemplifica claramente essa condição; para coletar 100 oócitos eqüinos são necessários 4 técnicos trabalhando por 3 a 4 horas, enquanto para a obtenção do mesmo número de oócitos bovinos são necessários apenas 2 técnicos trabalhando durante 30 a 40 minutos (GALLI et al., 2006).

Entretanto, métodos de coleta e transferência de oócitos (TO) em eqüinos estão sendo desenvolvidos com crescente avanço dos resultados (CARNEVALE, 2004). O que possibilita a evolução de novas alternativas clínicas e de pesquisa na reprodução assistida em eqüinos. Programas comerciais de punção folicular e TO no Colorado/EUA descrevem índice de recuperação oocitária de 98% por ciclo e 76% por folículo (CARNEVALE et al., 2003). Esses resultados estimulam pesquisas principalmente na área de fertilização *in vitro* (FIV), Injeção intra-citoplasmática de espermatozóide (ICSI) e criopreservação de oócitos para utilização comercial.

A criopreservação de oócitos tem demonstrado importante valor na reprodução assistida em humanos, devido ao fato de ultrapassar barreiras éticas, morais e religiosas encontradas na conservação de embriões nessa espécie (FABBRI et al., 2000). Em eqüinos pode-se estabelecer um paralelo com a situação em humanos, não devido a fatores sociais, mas sim devido à dificuldade na criopreservação dos embriões. O embrião eqüino é envolto por uma cápsula glicoproteica acelular que impede a penetração de crioprotetores, dificultando o congelamento (ELDRIDGE-PANUSKA et al., 2005).

Oócitos são células de difícil criopreservação, as alterações provocadas pelo resfriamento reduzem a competência meiótica após o reaquecimento. O estágio de maturação e a técnica de criopreservação utilizada afetam diretamente a qualidade e competência no desenvolvimento de oócitos após o reaquecimento (HOCHI et al., 1998).

A proporção de oócitos eqüinos criopreservados no estágio de vesícula germinativa (VG) que atingem a metáfase II, subsequente à maturação *in vitro* (MIV), é evidentemente reduzida quando comparada com oócitos não congelados (HOCHI et al. 1996; HURTT et al., 2000; MACLELLAN et al., 2001; THARASANIT et al., 2006). Oócitos em VG são descritos como mais resistentes a criopreservação, por estarem com a cromatina protegida no interior de vesícula delimitada por membrana e ainda não ter ocorrido a formação do fuso mitótico. O congelamento de oócitos em estágios mais avançados de maturação é mais sensível, devido à desorganização do fuso quando os oócitos estão em MII (SATHANANTHAN et al., 1988) e aumento da poliploidia na fertilização (CARROLL et al., 1989; GLENISTER et al., 1987).

A vitrificação é uma técnica de criopreservação que vem sendo utilizada com sucesso em oócitos e embriões de mamíferos (VATJA, 2002). Previne a ocorrência de alterações provocadas pela formação de cristais de gelo intracelular, comum no congelamento convencional (RALL & FAHY, 1985). Contudo, os resultados na criopreservação de oócitos eqüinos ainda são inferiores aos descritos para as outras espécies (SQUIRES 2003; THARASANIT et al., 2006).

No processo de vitrificação podem ocorrer alterações em função da osmolaridade, concentração e do tempo de exposição dos oócitos e embriões aos crioprotetores. Portanto, o sucesso da técnica depende, principalmente, da determinação da concentração ideal e do tempo de exposição às soluções de crioprotetores (RALL & FAHY, 1985). A utilização da velocidade máxima de resfriamento, associada à concentração aceitável de crioprotetores, minimiza as alterações decorrentes do processo (LIEBERMAN et al., 2002).

As macromoléculas dos bloqueadores sintéticos da formação de gelo (SIB) protegem as membranas celulares durante o congelamento, prevenindo a ocorrência do endurecimento da zona pelúcida devido à liberação prematura dos grânulos corticais (ASADA et al., 2002). E em baixas concentrações, reduzem a formação de cristais de gelo nas soluções aquosas (WOWK et al, 2000). A primeira citação de adição de SIB, nas soluções de vitrificação de oócitos eqüinos, foi de CURCIO et al. (2005), que demonstraram ser viável a utilização dessa substância em oócitos eqüinos após maturação *in vitro*. A associação de vários polímeros sintéticos foi descrita por FAHY et al. (2004), para a vitrificação de oócitos e embriões de camundongos, demonstrando excelentes resultados.

Os protocolos de vitrificação propostos no presente estudo foram alvos de estudos preliminares; de onde surgiram adaptações no processo para utilização na criopreservação de oócitos para a espécie eqüina.

Os objetivos do presente estudo foram: 1) analisar características morfológicas ultra-estruturais em oócitos imaturos de eqüinos submetidos a diferentes tempos de exposição às soluções de vitrificação contendo bloqueador sintético da formação de gelo (SIB); 2) avaliar a maturação nuclear *in vitro* de oócitos eqüinos vitrificados em soluções contendo bloqueadores sintéticos da formação de gelo; 3) considerar a influência das características

das células do *cumulus-oophorus* no momento da coleta sobre a maturação nuclear *in vitro*.

ARTIGO 1**Características morfológicas ultra-estruturais em oócitos imaturos de equinos submetidos a diferentes tempos de exposição às soluções de vitrificação**

B.R. Curcio*¹; A.L.N Boff¹; S. S. Barros²; C.E.W. Nogueira²; J.C. Deschamps¹

Centro de Biotecnologia¹, Faculdade de Veterinária², Universidade Federal de Pelotas-96010-900 - Pelotas-RS, Brasil.

(Artigo escrito segundo as normas da revista Theriogenology)

Resumo

O objetivo do presente estudo foi identificar as características morfológicas ultra-estruturais em oócitos imaturos de eqüinos submetidos a diferentes tempos de exposição às soluções de vitrificação contendo bloqueador sintético da formação de gelo (SIB). Complexos *cumulus-oócito*, obtidos de ovários de éguas de abatedouro, foram divididos em 3 grupos. Grupo controle (**G1**), os oócitos (n=10) foram fixados em solução de Karnovsky imediatamente após a coleta. No grupo 2 (**G2**), os oócitos (n=10) foram vitrificados após exposição de 3 min na solução VS-1 (1,4 M de DMSO + 1,8 M de EG + 1% SIB) e de 1 min na solução VS-2 (2,8 M de DMSO + 3,6 M de EG + 0,6M Sacarose + 1% SIB). No grupo 3 (**G3**) os oócitos (n=10) foram expostos por 1,5 min nas soluções VS-1 e 30 seg VS-2 antes de serem vitrificados. A vitrificação foi realizada em palhetas abertas estendidas (OPS) e o reaquecimento em soluções de sacarose. As características ultra-estruturais foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão, sendo os oócitos classificados em três categorias: I) Oócitos sem alterações (**G1** 80%, **G2** 30%, **G3** 60%); II) oócitos com alterações intermediárias os quais apresentavam organelas íntegras, com redução das microvilosidades e descontinuidade nas junções tipo desmosomo. (**G1** 0%, **G2** 20%, **G3** 30%), e III) oócitos com alterações severas nos quais foram observadas vesículas coalescentes, membrana plasmática irregular, extrusão dos grânulos corticais e degeneração de organelas. (**G1** 20%, **G2** 50%, **G3** 10%). Pode-se concluir que a diminuição do período de exposição às soluções de vitrificação resultou em melhor preservação das características ultra-estruturais de oócitos imaturos de eqüinos submetidos à vitrificação.

Palavras-chave: oócitos, eqüinos, vitrificação, bloqueadores de gelo, ultra-estrutura.

Abstract

The objective of the following study was to identify possible ultra-structural injuries in equine oocytes submitted to different exposure times to cryoprotectant solutions with synthetic ice blockers (SIB). Oocytes obtained from ovaries of slaughterhouse mares were divided in 3 groups: In control group (**G1**), oocytes (n=10) were immediately fixed after collection in a Karnovsky solution. In group 2 (**G2**), the oocytes (n=10) were vitrified after being exposed

to VS-1 (1.4M DMSO+1.8M EG+1% SIB) for 3min and VS-2 (2.8M DMSO+3.6M EG+0.6M Sucrose+1% SIB) for 1min. In group 3 (G3), oocytes (n=10) were exposed to VS for 1.5min and VS-2 for 30sec before vitrification. The oocytes were vitrified in *open-pulled-straws* (OPS) and re-warmed in a sucrose solution. The ultrastructural characteristics were observed under a transmission electron microscope. The oocytes were classified in: I) Oocytes morphologically normal (G1 80%, G2 30%, G3 60%); II) Oocytes with intermediate damage which presented complete organelles, with reduction of microvilli and discontinuity of junctions of desmosome type. (G1 0%, G2 20%, G3 30%); and III) Oocytes with severe morphological abnormalities (G1 20%, G2 50%, G3 10%) such as adherent vesicles, irregular plasma membrane, extrusion of cortical granules and swelling of mitochondria with reduced matrix density. It can be concluded that the reduction of exposure time to the cryoprotectant solutions resulted in better preservation of ultrastructural characteristics of immature equine oocytes submitted to vitrification.

Keywords: oocytes, equine, vitrification, synthetic ice blockers and ultrastructure.

1. Introdução

A vitrificação é uma técnica utilizada para criopreservar oócitos e embriões de mamíferos, a qual previne a ocorrência de alterações provocadas pela formação de cristais de gelo intracelular, comum no congelamento convencional [1]. Alterações também podem ocorrer em função da osmolaridade, concentração e do tempo de exposição dos oócitos e embriões aos crioprotetores, antes do processo de vitrificação. Portanto, o sucesso da vitrificação de oócitos depende principalmente, da determinação da concentração ideal e do tempo de exposição às soluções de crioprotetores [1]. A utilização da velocidade máxima de resfriamento, associada à concentração aceitável de crioprotetores, minimiza as alterações decorrentes do processo de vitrificação [2].

Macromoléculas, tais como açúcares e soro fetal bovino (SFB), reduzem a toxicidade das soluções crioprotetoras [3]. Polímeros sintéticos podem ser utilizados como substituto do SFB na criopreservação [4,5]. Os bloqueadores sintéticos da formação de gelo, utilizados em baixas

concentrações, inibem a formação de cristais de gelo em soluções de congelamento [6]. Os mesmos têm sido utilizados em soluções de vitrificação de células bacterianas [7], oócitos de camundongos [8], eqüinos [9] e suínos [10].

Embora Fabbri et al. [11] não tenham observado diferença no índice de sobrevivência de oócitos congelados com as células do *cumulus* intactas, parcialmente removidas ou ausentes, Gook et al. [12] demonstraram que oócitos com *cumulus* completo, tiveram uma redução significativa na taxa de sobrevivência (48%), comparada com oócitos desnudos antes do congelamento (69%).

A presença das células do *cumulus* pode interferir no rápido influxo e efluxo de crioprotetor durante os procedimentos de equilíbrio e remoção do crioprotetor, pré e pós-descongelamento [11]. A utilização de soluções de vitrificação contendo bloqueador sintético da formação de gelo, demonstrou ser eficiente na criopreservação de oócitos eqüinos em metáfase II, após remoção das células do *cumulus* [9]. Entretanto, a vitrificação de oócitos eqüinos na presença de células do *cumulus*, deve ser avaliada para definição da viabilidade dos oócitos pós-descongelamento, quando são utilizados bloqueadores sintéticos da formação de gelo no meio de criopreservação. O efeito do tempo de equilíbrio em soluções crioprotetoras antes do processo de vitrificação, sobre a morfologia ultra-estrutural de oócitos eqüinos imaturos, contendo células do *cumulus*, ainda não foi descrito.

O objetivo do presente trabalho foi identificar as características morfológicas ultra-estruturais em oócitos imaturos de eqüinos vitrificados, na presença de células do *cumulus*, submetidos a diferentes tempos de equilíbrio às soluções de criopreservação contendo bloqueador sintético da formação de gelo.

2. Materiais e Métodos

Os produtos utilizados foram obtidos de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Com exceção dos seguintes itens: Meio de Cultivo de tecidos (Tissue Culture Medium 199 – TCM 199 / Gibco-Invitrogen – Grand Island, N.Y, USA); soro fetal bovino-SFB (Cultilab Mat.Cult Cel – Campinas, SP, Brazil); Solução salina fosfatada tamponada – PBS (Nutricel – Campinas, SP, Brazil);

SuperCool-X1000™- bloqueador formação de gelo (21st Century Medicine; Cucamonga Ranch, California, USA).

2.1. Obtenção dos oócitos

Os complexos *cumulus-oócito* foram obtidos de ovários provenientes de éguas após o abate. Os ovários foram coletados aleatoriamente na linha de abate, não sendo possível a identificação da idade, fase do ciclo estral e condição clínica/nutricional das éguas. As coletas foram realizadas no mês de março de 2005. Os ovários foram transportados para o laboratório em solução salina aquecida a temperatura de 25-30 °C, contendo 1000 UI/mL de penicilina e 500 µg/mL de estreptomicina. Realizou-se a dissecação da túnica albugínea e de todos os folículos entre 10-35 mm, os quais foram abertos e tiveram as paredes raspadas com auxílio de cureta [13]. O conteúdo folicular foi transferido para placas de Petri de 100 mm e examinado em estereomicroscópio para identificação e classificação dos complexos *cumulus-oócito* (**Cco**). Os **Cco** recuperados foram classificados segundo o revestimento celular, em: células do *cumulus* compacto (**Cp**), células do *cumulus* expandido (**Cex**) ou degenerado (**D**; com *cumulus* parcial ou presença de corona radiata). No presente trabalho foram utilizados somente oócitos com no mínimo três camadas de células do *cumulus* compacto. O período de manipulação máximo foi de 5 horas, desde a coleta dos ovários até fixação/vitrificação dos oócitos.

2.2. Vitrificação e reaquecimento

Oócitos **Cp**, foram divididos em três grupos homogêneos. Um grupo de oócitos **Cp** (n=10) foi fixado imediatamente após a coleta (**G1**), o qual foi utilizado como controle. Os grupos de oócitos **Cp** 2 (**G2**; n=10) e 3 (**G3**; n=10), foram submetidos ao processo de vitrificação.

A solução de vitrificação 1 (VS-1) consistiu de 1,4 M de dimetilsulfóxido (DMSO), 1,8 M de etilenoglicol (EG) e 1% de bloqueador sintético da formação de gelo (20% vinil acetato + 80% vinil álcool – SuperCool X-1000™⁽¹⁾) e a solução 2 (VS-2) de 2,8 M de DMSO + 3,6 M de EG + 0,6 M de sacarose + 1% de bloqueador sintético da formação de gelo.

O procedimento de vitrificação consistiu no equilíbrio em VS-1 durante 3 min e em VS-2 por 1 min, no grupo **G2**. Sendo 1,5 min em VS-1 e 30 seg em VS-2 para oócitos do grupo **G3**. Em ambos os grupos, oócitos imersos em VS-2 foram envasados por capilaridade em palhetas abertas estiradas (*open pulled straw-OPS*), segundo o descrito por Vatja et al. [14]. As palhetas, contendo os oócitos, foram submetidas ao vapor de nitrogênio por 3 seg e imersas em nitrogênio líquido.

O reaquecimento foi realizado pela exposição das palhetas ao ar por 5 seg, e imersão da extremidade que continha os oócitos em solução de 0,5 M de sacarose por 5 min. Na sequência, os oócitos passaram por gotas de soluções de 0,5 M, 0,25 M, 0,125 M de sacarose e solução salina tamponada (PBS) acrescido de 0,4% de albumina sérica bovina (BSA), permanecendo 5 min em cada uma. Tanto as soluções de vitrificação quanto às de reaquecimento encontravam-se a 38°C no momento de uso.

2.3. Fixação e avaliação ultra-estrutural

Após o reaquecimento, os oócitos foram mantidos durante 1-2 h em estufa à temperatura de 38,5 °C e 5% CO₂, para estabilização das estruturas. Subseqüente, os oócitos foram fixados em Solução de Karnovsky (1 h a 4° C); sofreram fixação ósmica (tetróxido de ósmio 1%) a 4 °C por 2 h; foram lavados e desidratados em concentrações crescentes de etanol e acetona e incluídos em resina. Os blocos foram cortados com espessura de 50 nm, coletados em grades de cobre de 200 mesh e contrastados por acetato de uranila e citrato de chumbo. Esses cortes foram observados e fotografados em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss-EM109). Com base nas características morfológicas ultra-estruturais observadas, os oócitos foram classificados em três categorias: I) Oócitos sem alterações ultra-estruturais; II) oócitos com alterações intermediárias, apresentando organelas citoplasmáticas íntegras, porém com redução das microvilosidades da membrana plasmática oocitária, descontinuidade nas junções tipo desmossomo e células do *cumulus* dispersas; e III) oócitos com alterações severas, sendo observadas vesículas coalescentes, membrana plasmática com perda da integridade, extrusão dos grânulos corticais e degeneração de organelas.

3. Resultados

Foram avaliados 30 oócitos eqüinos com *cumulus-oophorus* compacto, sendo 10 em cada grupo experimental. Na Tabela 1, pode-se observar a distribuição dos oócitos dos diferentes grupos experimentais, de acordo com as categorias de alterações ultra-estruturais estabelecidas.

Oócitos com classificação I apresentaram a membrana plasmática íntegra com longas microvilosidades, as quais se projetam para o interior da zona pelúcida. As mitocôndrias apresentavam-se em formato oval ou alongado, com as criptas evidentes. Essas estavam distribuídas por todo citoplasma, com tendência a formação de grupos (Figura 1a) e associação a gotas lipídicas e retículo endoplasmático liso. Os grânulos corticais apresentaram-se delimitados por membrana, com conteúdo eletrôn-denso no seu interior. Foram identificados de forma dispersa no ooplasma e próximos à membrana (Figura 1a). O retículo endoplasmático liso foi observado na região cortical e sub-cortical do ovoplasma, geralmente associado às mitocôndrias (Figura 1a). O complexo de Golgi apresentou-se bem desenvolvido, formado por várias cisternas sobrepostas e circundado por vesículas esféricas recobertas (Figura 1b). As vesículas recobertas possuem conteúdo de eletrôn-densidade média, e algumas aparecem fundindo-se à face cis do Golgi. Em alguns casos, foram observados restos membranosos no interior de vesículas, associados às mitocôndrias, provavelmente em processo de metabolização. O espaço perivitelínico apresentou-se estreito e atravessado por microvilosidades (Figura 1c). No interior da zona pelúcida, os prolongamentos das células do *cumulus* fazem contato com a membrana vitelínica do ovócito ou com seus prolongamentos (Figura 1c), sendo que em alguns pontos foi observada a presença de complexos juncionais entre eles (Figuras 1d). Os complexos juncionais identificados demonstravam características de junções tipo desmossomo (Figura 2a). Foram observadas gotas lipídicas (GL) esféricas, sem membrana delimitante, medianamente eletrôn-densas e, algumas vezes, circundadas por halo eletrolúcido.

Os oócitos classificados no escore II apresentaram a maioria das organelas íntegras. Porém, demonstraram algumas mitocôndrias intumescidas e células do *cumulus* mais dispersas, em relação aos oócitos com classificação

I. Pode-se observar redução do número e da extensão das microvilosidades na membrana vitelínica e descontinuidade nas junções comunicantes. O citoesqueleto permaneceu íntegro nesses oócitos (Figura 2b).

Oócitos com classificação III demonstraram lesões severas. Foram observadas vesículas coalescentes, que em alguns oócitos estavam predominando no ooplasma. A membrana plasmática apresentou-se irregular, com ausência de microvilosidades. As organelas apresentaram-se degeneradas, com exceção das gotas lipídicas e grânulos corticais, presentes em todos os oócitos. Em alguns oócitos pode-se observar extrusão dos grânulos corticais e restos celulares para o espaço perivitelínico (Figura 3a). As mitocôndrias não foram identificadas em algumas células. Quando encontradas, apresentaram perda da densidade da matriz, dilatação acentuada e, em alguns casos, edema da câmara externa (Figura 3b).

4. Discussão

No presente estudo, foram observadas mitocôndrias com criptas evidentes, em associação com gotas lipídicas e retículo endoplasmático liso, o que caracteriza a formação das unidades metabólicas descritas por Kruip et al. [15], encontradas em oócitos eqüinos imaturos [16]. A abundância de gotas lipídicas associadas a essas “unidades metabólicas” indica que o processo de maturação demanda a metabolização do conteúdo destas gotas.

A localização periférica do complexo de Golgi, com evidente desenvolvimento, também caracteriza imaturidade citoplasmática dos oócitos do presente estudo. Complexos de Golgi de oócitos imaturos apresentam-se mais desenvolvidos, constituídos por inúmeras lamelas dilatadas associadas a vesículas membranosas de elétrons de densidade variável, tanto na face cis como trans. As da face cis são vesículas recobertas e podem ser vesículas picnóticas que migram da superfície do oócito em direção ao Golgi [16]. Estes achados estão de acordo com o observado por Hyttel et al. [17] que observaram complexos de Golgi menos desenvolvidos em oócitos bovinos maduros, quando comparado com os imaturos.

Os Grânulos corticais foram encontrados dispersos no citoplasma e em reduzida quantidade, sendo também esse achado característico da ultra-estrutura de oócitos eqüinos imaturos [16, 18, 19].

Nos oócitos estudados foi observado um reduzido espaço perivitelínico, preenchido por microvilosidades e regiões onde as células do *cumulus* se encontravam aderidas à membrana do oócito, através de junções comunicantes. Estes achados estão de acordo com o observado por Hyttel et al. [17] em oócitos bovinos imaturos.

Oócitos classificados no escore I não demonstraram alterações morfológicas. As características ultra-estruturais encontradas permitem definir que esses se encontravam imaturos no momento da coleta e, portanto, durante o processo de vitrificação.

Na avaliação do Grupo controle (oócitos frescos), dois oócitos apresentaram organelas degeneradas, tumefação da matriz mitocondrial (Figura 3c) e das cisternas do complexo de Golgi. As células do *cumulus* estavam dispersas, com núcleo picnótico e sinais de apoptose. Essas características são compatíveis com a ocorrência de degeneração celular. A coleta de oócitos degenerados pode ter ocorrido devido à escolha aleatória dos ovários no abatedouro, independente da idade das éguas. Sendo importante ressaltar que a coleta dos ovários foi realizada no mês de março, considerado o início do período transicional na América do Sul para a espécie eqüina.

Poucos trabalhos avaliam alterações ultra-estruturais após a vitrificação de oócitos eqüinos [19, 20]. As lesões encontradas foram similares às descritas por Hochi et al. [20] na espécie eqüina e Wu et al. [21] em suínos.

Foram descritas alterações ultra-estruturais em 70% dos oócitos avaliados do Grupo 2 e 40% dos oócitos do Grupo 3, sendo que esses índices são inferiores ao descrito anteriormente na vitrificação de oócitos eqüinos [20]. Esses autores utilizaram uma concentração de 40% (v/v) de Etilenoglicol (90% oócitos com lesões), enquanto no presente estudo foi utilizado 20% (v/v) de Etilenoglicol com a adição de bloqueadores sintéticos da formação de gelo nas soluções crioprotetoras.

Oócitos suínos possuem alta concentração de lipídeos [24], de forma similar aos eqüinos. Sendo considerado esse o principal motivo da baixa resistência a criopreservação dos oócitos suínos [23]. Os lipídeos oocitários estão relacionados ao armazenamento de energia, na constituição das organelas citoplasmáticas e membrana citoplasmática, assim como para a constituição das membranas do futuro embrião [21, 22]. No presente estudo,

não foram identificadas alterações nas gotas lipídicas, independente do protocolo de vitrificação utilizado, esses achados são semelhantes ao descrito por Hochi et al. [20] e Wu et al. [21]. A manutenção da integridade dos lipídeos citoplasmáticos é importante para a manutenção dos complexos metabólicos “mitocôndria – gotas lipídicas – retículo endoplasmático liso” íntegros para a sobrevivência celular.

Em oócitos imaturos, a zona pelúcida e as células do *cumulus* formam uma unidade funcional [21]. As células foliculares intermediam a maturação oocitária induzida por gonadotrofinas, através da passagem de moléculas das células da granulosa para o oócito pelas junções comunicantes [24]. A manutenção da integridade desses complexos juncionais é indispensável para o controle do processo de maturação [17, 20], fertilização e desenvolvimento embrionário inicial [17]. Frequentemente, o congelamento causa a ruptura da zona pelúcida, separação das células do *cumulus* e interrupção das junções comunicantes, o que influencia diretamente no desenvolvimento oocitário subsequente [11]. Essas alterações ultra-estruturais são atribuídas à severa desidratação resultante da ação dos crioprotetores. Para evitar a formação de cristais de gelo no interior das células, durante o processo de vitrificação, é essencial que ocorra uma efetiva desidratação [11]. Portanto, o processo de vitrificação não exclui a ocorrência de danos osmóticos às células. A descontinuidade das junções comunicantes, encontrada nos oócitos classificação III do presente estudo, reduzem a viabilidade dessas células frente ao processo de maturação.

As lesões encontradas envolvendo dilatação de mitocôndrias e presença de grandes vesículas coalescentes são compatíveis com alterações osmóticas. A ocorrência de redução da densidade da matriz mitocondrial já foi descrita após a vitrificação de oócitos imaturos [20, 21]. Contudo, a influência dessa alteração no desenvolvimento oocitário é incerta [21].

A ocorrência da degeneração de organelas, observada em oócitos classificação III, é provavelmente proveniente do efeito citotóxico dos crioprotetores utilizados. A toxicidade dos crioprotetores é o principal limitante para a utilização do processo de vitrificação [8]. O mecanismo de toxicidade das soluções de vitrificação ainda não está elucidado [25]. Sendo uma das razões a dificuldade em se estabelecer individualmente a toxicidade de cada

crioprotetor utilizado nessas soluções [8]. A utilização de bloqueadores da formação de gelo permite a redução da concentração de crioprotetores utilizados [8] e, com isso, redução da toxicidade das soluções de vitrificação.

Foi observado aumento no índice de oócitos sem alterações pós-vitrificação (Classificação I: 30% vs 60%), com a redução do tempo de exposição às soluções crioprotetoras. Isto indica que, mesmo com a presença do complexo *cumulus-oophorus* íntegro, o período reduzido de permanência das estruturas nas soluções de vitrificação, foi suficiente para garantir a desidratação celular e entrada dos crioprotetores. O que reduziu as lesões provocadas pela exposição acentuada aos crioprotetores.

Pode-se concluir que a diminuição do período de exposição às soluções crioprotetoras contendo bloqueadores sintéticos da formação de gelo, resultou em melhor preservação das características morfológicas ultra-estruturais de oócitos imaturos de eqüinos submetidos à vitrificação.

Agradecimentos

Ao laboratório de microscopia eletrônica da Faculdade de Veterinária-UFPEL, a técnica de laboratório Simone e à Dr^a Ana Lúcia Schild. Ao Prof. Dr. Severo Salles de Barros (Faculdade de veterinária/UFSM) pelas avaliações ultra-estruturais. A Dr^a Lígia Pegoraro (EMBRAPA – Pelotas) e à Prof^a Dr^a Fernanda Landim-Alvarenga (FMVZ – Unesp Botucatu) pela experiência transmitida na interpretação das avaliações ultra-estruturais.

Referências Bibliográficas

- [1] Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 1985;313:573-575.
- [2] Liebermann J, Nawroth F, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, Tucker MJ. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol Reprod* 2002;67:1671-1680.
- [3] Karow AM. Chemical cryoprotection of metazoan cells. *BioScience* 1991;41:155-160.

- [4] Naitana S, Ledda S, Loi P, Leoni G, Bogliolo L, Dattena M, Cappai P. Polyvinyl alcohol as a defined substitute for serum in vitrification and warming solutions to cryopreserve ovine embryos at different stages of development. *Anim Reprod Sci* 1997;48:247-256.
- [5] Sommerfeld V, Niemann H. Cryopreservation of bovine *in vitro* produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology* 1999;38:95-105.
- [6] Wowk B, Leiti E, Rasch CM, Karimi NB, Harris SB, Grefory MF. Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. *Cryobiology* 2000;40:228-236.
- [7] Wowk B, Fahy GM. Inhibition of bacterial ice nucleation by polyglycerol polymers. *Cryobiology* 2002;44:14-23.
- [8] Fahy GM, Wowk B, Wu J, Paynter S. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. *Cryobiology* 2004;48:22-35.
- [9] Curcio BR, Deschamps JC, Nogueira CEW, Pereira GR, Macedo Jr MC, Boff ALN, Rambo G, Lucia Jr T. Maturação e vitrificação de oócitos eqüinos cultivados na presença de hormônio do crescimento eqüino e fator de crescimento semelhante à insulina-I. *Acta Scientiae Veterinariae* 2005; 33(Suppl): 171 (Abstract).
- [10] Macedo Jr M, Deschamps JC, Lucia Jr T, Bordignon J, Serret CG, Rambo G, Pivato I, Schmitt E. In vitro penetration of fresh and vitrified swine oocytes by homologous spermatozoa using different incubation systems. *Anim Reprod Sci* 2006;92:334-348.
- [11] Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Primavera MR, Rocchetta G, Ciotti PM, Magrini O, Seracchiol R, Venturoli S, Flamigni C. Technical aspects of oocyte cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol* 2000;169:39-42.
- [12] Gook D, Osborn S, Johnston W. Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2 propanediol and the configuration of meiotic spindle. *Hum Reprod* 1993;8:1101-1109.
- [13] Curcio BR, Frey Jr F, Boff ALN, De Leon PM, Lins LA, Albuquerque LP, Rambo G, Nogueira CEW, Deschamps JC. Taxa de recuperação de oócitos eqüinos com *cumulus oophorus* compacto por curetagem da parede folicular. *Ciência Animal Brasileira*, 2006, No prelo.

- [14] Vatja G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 1998;51:53-58.
- [15] Kruip TAM, Cran DG, Van Beneden TH, Dieleman SJ. Structural changes in bovine oocytes during final maturation *in vivo*. *Gamete Research* 1983; 8:29-47.
- [16] Fernandes CB, Peres KR, Alvarenga MA, Landim-Alvarenga FC. The use of transmission electron microscopy and oocyte transfer to evaluate *in vitro* maturation of equine oocytes in different culture conditions. *J Equine Vet Sci* 2006;26:159-167.
- [17] Hyttel P, Greeve T, Callesen H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. *J Reprod Fert* 1989;38:35-47.
- [18] Hurtt AE, Landim-Alvarenga GE, Seidel Jr, Squires EL. Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, Ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. *Theriogenology* 2000;54:119-128.
- [19] Tharasanit T, Colenbrander B, Stout TAE. Effect of maturation stage at cryopreservation on post-thaw cytoskeleton quality and fertilizability of equine oocytes. *Mol Reprod Dev* 2006;73:627-637.
- [20] Hochi S, Kozawa M, Fujimoto T, Hondo E, Yamada J, Oguri N. *In vitro* maturation and transmission electron microscopic observation of horse oocytes after vitrification. *Cryobiology* 1996;33:300-310.
- [21] Wu C, Rui R, Dai J, Zhang C, Ju S, Xie B, Lu X, Zheng X. Effects of cryopreservation on the developmental competence, ultrastructure and cytoskeletal structure of porcine oocytes. *Mol Reprod Dev* 2006;73:1454-1462.
- [22] Isachenko V, Soler C, Isachenko E, Perz-Sanchez F, Grishchenko V. Vitrification of immature porcine oocytes: Effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant. *Cryobiology* 1998;36:250-258.
- [23] Genicot G, Leroy JL, Soom AV, Donnay I. The use of a fluorescent dye, Nile red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes. *Theriogenology* 2005;63:1183-1194.
- [24] Browder LW Oogenesis. In: *Developmental Biology*. Ed. Saunders College Publishing, 248-323, 1984.

- [25] Fahy GM, Lilley TH, Linsdell H, St M, Douglas J, Meryman HT. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. *Cryobiology* 1990;27:247-268.

Tabela

Tabela 1 – Classificação dos oócitos Grupo 1, 2 e 3 de acordo com as características morfológicas ultra-estruturais avaliadas.

Classificação	Descrição	Grupo 1 n (%)	Grupo 2 n (%)	Grupo 3 n (%)
I	Sem alterações	8 (80)	3 (30)	6 (60)
II	Alterações intermediárias	0 (0)	2 (20)	3 (30)
III	Alterações severas	2 (20)	5 (50)	1 (10)
Total		10 (100)	10 (100)	10 (100)

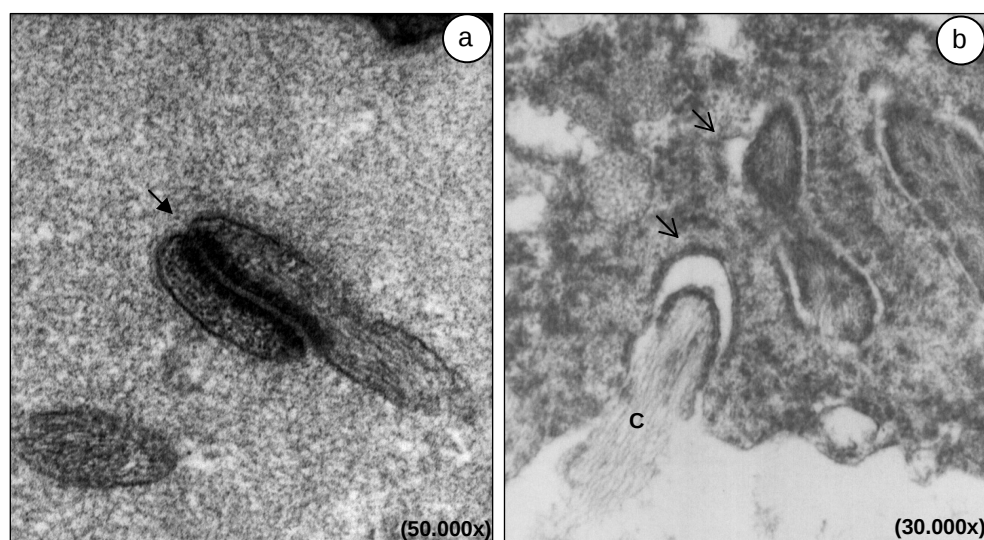


Figura 2 - Características morfológicas ultra-estruturais em oócitos após a vitrificação. **a.** Oócito grupo 3 (Classificação I) Complexo juncional caracterizando junção tipo desmosomo ($\rightarrow$). **b.** Oócito grupo 2 (Classificação II) descontinuidade nas junções comunicantes ($\rightarrow$), porém apresentando integridade do citoesqueleto (C).

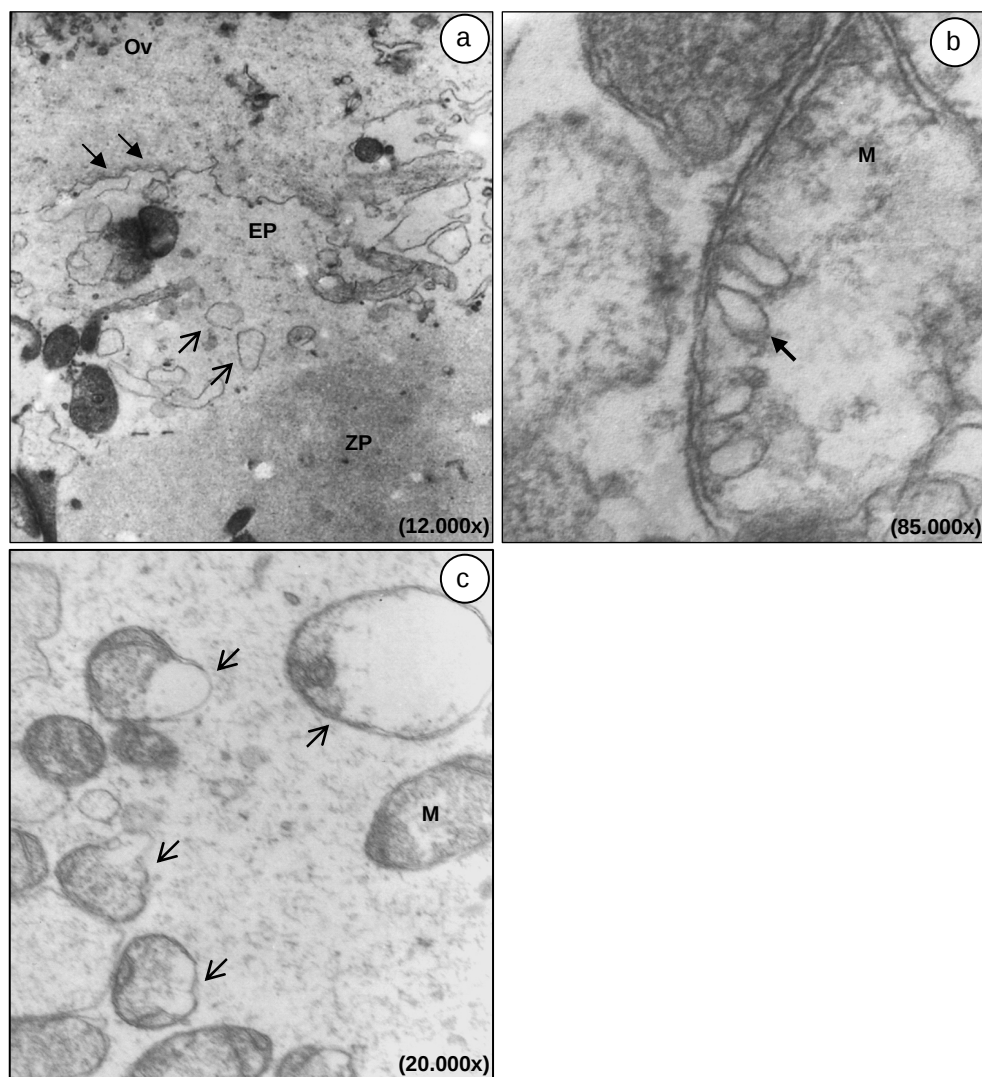


Figura 3 – Oócitos classificação III, antes e após a vitrificação. **a.** Oócito grupo 3: Ruptura da membrana plasmática (→), presença de restos celulares (→) no espaço perivitelínico (EP). **b.** Oócito grupo 2: Mitocôndrias (M) com diminuição da densidade da matriz mitocondrial, dilatação e edema na câmara externa (→). **c.** Oócito grupo 1: presença de algumas mitocôndrias integras (M), tumefação da matriz e rompimento de membrana mitocondrial (→).

ARTIGO 2

**Influência das características das células do *cumulus oophorus* e dos
crioprotetores sobre a maturação nuclear *in vitro* de oócitos eqüinos
vitrificados imaturos**

B.R. Curcio^{*1}; A.L.N Boff¹; G. Rambo¹; C.E.W. Nogueira²; T. Lucia Jr¹; J.C.
Deschamps¹

Centro de Biotecnologia¹, Faculdade de Veterinária², Universidade Federal de
Pelotas - 96010-900 - Pelotas-RS, Brasil.

(Artigo escrito segundo as normas da revista Theriogenology)

Resumo

O presente estudo avaliou a maturação nuclear *in vitro* (MIV) de oócitos eqüinos vitrificados imaturos em soluções contendo bloqueadores sintéticos da formação de gelo (SIB), de acordo com as características das células do *cumulus oophorus*. Oócitos *cumulus* compacto (Ccp; n=248) e *cumulus* expandido (Cex; n=264) foram divididos aleatoriamente em 3 grupos: Controle, Tratamento-1 (T1 - Etilenoglicol-EG + Dimetilsulfóxido-DMSO + SIB) e Tratamento-2 (T2 - formamida + EG + DMSO + Polivinilpirrolidona + SIB). O grupo controle foi MIV imediatamente após a coleta, o restante foi vitrificado imaturo em OPS e submetido a MIV após o reaquecimento. O estágio de maturação após incubação foi avaliado em microscópio de fluorescência (Hoechst 33342). O índice de oócitos que atingiram metáfase II (MII) foi 41% no Controle, 38,3% no T1 e 33,3% no T2 ($P>0,05$). Nos oócitos do grupo Controle, o índice de MII foi superior em oócitos Cex (53,2%) do que oócitos Ccp (29,3%; $P<0,05$). A avaliação da influência das características das células do *cumulus* na vitrificação não detectou diferença ($P>0,05$). Entretanto, oócitos Cex obtiveram maiores índices de MII do que oócitos Ccp em T1 (50% vs 27,3%) e T2 (45,7% vs 21,6%). Pode-se concluir que oócitos imaturos de eqüinos podem ser MIV após vitrificação/reaquecimento, obtendo índices satisfatórios de MII. As características das células do *cumulus oophorus*, no momento da coleta, não interferem na maturação nuclear de oócitos eqüinos vitrificados imaturos.

Palavras-chave: oócitos, eqüinos, vitrificação, etilenoglicol, formamida, maturação *in vitro*.

Abstract

The study investigated the *in vitro* maturation (IVM) of equine oocytes vitrified with syntetic ice blockers (SIB). This study investigated whether the morphology of the cumulus complex surrounding the equine oocyte affects its cryopreservability. Compact (**Ccp**; n=248) and expanded (**Cex**; n=264) cumulus oocyte complexes were divided in three groups: Control, Treatment-1 (**T1** - Ethylene glycol-EG + Dimetyl sulfoxide-DMSO + SIB) and Treatment-2 (**T2** - Formamide + EG + DMSO + Polyvinylpyrrolidone + SIB). The control group was immediately matured *in vitro*, the other immature oocytes were vitrified in *open-pulled-straws* (OPS) and then matured *in vitro*. The maturation stage was

observed under a fluorescence microscope (Hoechst 33342). The maturation rates (metaphase II - MII) were 41% for the Control group, 38,3% for treatment **T1** and 33,3% for treatment **T2** ($P>0,05$). In the control group, the MII rates were higher in Cex oocytes (53,2%) than in the Ccp oocytes (29,3%; $P<0,05$). The initial cumulus morphology did not significantly affect MII rates after vitrification ($P>0,05$). However, Cex oocytes had higher MII rates than those of Ccp oocytes in **T1** (50% vs 27,3%) and **T2** (45,7% vs 21,6%). It is concluded that immature equine oocytes can be IVM after vitrification/re-warming, with satisfactory MII rates. In addition, the initial cumulus morphology did not affect vitrification.

Key-Words: oocytes, equine, vitrification, ethylene glycol, formamide, *in vitro* maturation.

1. Introdução

A criopreservação de oócitos é uma técnica valiosa na preservação de gametas femininos para subsequente utilização em reprodução assistida. Entretanto, os oócitos são células de difícil criopreservação, pois as alterações provocadas pelo resfriamento reduzem a competência meiótica após o descongelamento. Essa redução pode ser decorrente de uma série de alterações, como: no citoesqueleto e cromossomos [1,2], endurecimento da zona pelúcida [3], lesões nas mitocôndrias [4,5] e destruição de enzimas necessárias para a progressão da meiose [6]. O estágio de maturação e a técnica de criopreservação utilizada afetam diretamente a qualidade e competência no desenvolvimento de oócitos após o reaquecimento [7].

A proporção de oócitos eqüinos criopreservados no estágio de vesícula germinativa (VG), que atingem a metáfase II (MII), subsequente à maturação *in vitro* (MIV), é reduzida quando comparada com oócitos não congelados [4,8,9]. Oócitos em VG são descritos como mais resistentes a criopreservação, por estarem com a cromatina protegida no interior de vesícula delimitada por membrana e, ainda, por não ter ocorrido a formação do fuso mitótico. Oócitos em estágios mais avançados de maturação são mais sensível ao congelamento, devido à desorganização do fuso quando os oócitos estão em MII [10] e aumento da poliploidia na fertilização [11,12]. Em eqüinos existem poucos trabalhos sobre criopreservação de oócitos [9,13] e avaliando-

se a vitrificação de oócitos eqüinos imaturos, os índices de maturação descritos ainda são reduzidos em relação à oócitos frescos. O melhor resultado descrito até o presente momento foi de 28% de MII [9]. Os crioprotetores descritos para vitrificação desses oócitos imaturos estão limitados à utilização de etilenoglicol, ficoll, sacarose e trealose [4,8,9,14].

Os bloqueadores sintéticos da formação de gelo (*Syntetic ice blocker - SIB*), em baixas concentrações, inibem a formação de gelo em soluções de congelamento [15]. Além da grande capacidade de inibir a formação de cristais de gelo, uso de SIB possui a vantagem de excluir a utilização de substâncias de origem animal nas soluções de vitrificação [16]. Os resultados obtidos na vitrificação de oócitos utilizando SIB nas soluções crioprotetoras são promissores. Fahy et al. [17], obtiveram um índice de 80% de formação de blastocistos a partir de oócitos vitrificados de camundongo. Além disso, soluções crioprotetoras contendo SIB apresentaram resultados promissores na vitrificação de oócitos de eqüinos [18] e suínos [19].

Outro aspecto relevante, que pode ter influência na viabilidade de oócitos vitrificados, são a presença e as características das células do *cumulus oophorus*. A viabilidade de oócitos eqüinos com *cumulus oophorus* expandido (Cex) no momento da coleta foi descrita inicialmente por Hinrichs & Williams [20], os quais comprovaram que, oócitos Cex, proveniente de folículos atrésicos, possuem cromatina compacta e demonstram maior competência meiótica em relação à oócitos com *cumulus oophorus* compacto (Ccp). Oócitos Cex são colhidos em grande proporção (45%) de ovários de éguas abatidas [21] e são utilizados rotineiramente em estudos de MIV em eqüinos [22,23,24,25,26]. A presença das células do *cumulus oophorus* pode interferir no rápido influxo e efluxo de crioprotetores, durante os procedimentos de pré e pós-descongelamento [27].

Métodos de coleta e transferência de oócitos (TO) em eqüinos estão sendo desenvolvidos com crescente avanço dos resultados [28]. Isto possibilita a evolução de novas alternativas clínicas e de pesquisa na reprodução assistida em eqüinos. Programas comerciais de punção folicular e TO no Colorado/EUA descrevem índice de recuperação oocitária de 98% por ciclo e 76% por folículo [29]. Esses resultados estimulam pesquisas principalmente na área de fertilização *in vitro* (FIV) e Injeção intra-

citoplasmática de espermatozóide (ICSI) e criopreservação de oócitos para utilização comercial.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito das características das células do *cumulus oophorus* e de crioprotetores sobre a maturação nuclear *in vitro* de oócitos eqüinos vitrificados imaturos.

2. Material e Métodos

Todos os produtos utilizados foram obtidos do Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA); com exceção do meio de cultivo de tecidos 199 (tissue culture media – TCM 199) (Gibco-Invitrogen, Grand Island, N.Y, USA); SFB (Cultilab Mat Cult Cel, Campinas, SP, Brasil); Solução salina fosfatada tamponada – PBS (Nutricel, Campinas, SP, Brasil); Placas de 4 poços (Nunc, Inter Med, German); SuperCool-X1000™ (21st Century Medicine, Rancho Cucamonga, California, USA).

2.1. Obtenção de oócitos:

Oócitos imaturos (n=535), em estágio de vesícula germinativa (VG), foram obtidos de ovários (n=214) provenientes de éguas de matadouro. As coletas foram realizadas no período de setembro/2004 a fevereiro/2005. Os ovários foram transportados para o laboratório em solução salina aquecida a temperatura de 25-30°C, contendo 1000 UI/mL de penicilina e 500 µg/mL de estreptomicina. Realizou-se a dissecação da túnica albugínea e de todos os folículos entre 10-35 mm, os quais foram abertos e tiveram as paredes raspadas com auxílio de cureta. O conteúdo folicular foi examinado em estéreo-microscópio para identificação e classificação dos complexos *cumulus-oophorus* (Cco). Os Cco recuperados foram classificados segundo o revestimento celular, sendo utilizado no estudo oócitos *cumulus* compacto (Ccp; n=248; Figura 1a) e *cumulus* expandido (Cex; n=264; Figura 1b). Oócitos degenerados, com *cumulus* parcial ou corona radiata foram descartados (D; n=23).

Os oócitos selecionados eram pipetados cuidadosamente para retirada de células do *cumulus*, até a permanência de 8-10 camadas de células. Em cada dia de manipulação os oócitos eram divididos em 6 grupos: Controle Ccp

(n=82), Tratamento-1 Ccp (n=77), Tratamento-2 Ccp (n=74), Controle Cex (n=79), Tratamento-1 Cex (n=72) e Tratamento-2 Cex (n=70).

2.2. Grupo controle:

Um grupo de oócitos Ccp e Cex foi submetido ao processo de maturação *in vitro* imediatamente após a coleta, servindo como controle.

2.3. Tratamento 1 (T1):

No tratamento 1 foram utilizadas 2 soluções: a primeira solução (VS1) foi composta de 1,4 M de dimetilsulfóxido (DMSO), 1,8 M de etilenoglicol (EG), enquanto a segunda (VS2) foi composta de 2,8 M de DMSO, 3,6 M de EG e 0,6 M de sacarose. Em ambas as soluções, foi adicionado 1% de bloqueador sintético da formação de gelo (SIB) – X-1000 (20% vinil acetato e 80% vinil álcool; SuperCool X-1000, 21st Century Medicine).

Grupos de oócitos, previamente selecionados, foram equilibrados por 1,5 min em VS1 e 30 seg em VS2. A vitrificação foi realizada na solução VS2, em *open pulled straw* – OPS [30]. As palhetas, contendo os oócitos, foram submetidas ao vapor de nitrogênio por 3 seg e então imersas em nitrogênio líquido.

O reaquecimento foi realizado pela exposição das palhetas ao ar por 5 seg, e imersão da extremidade que continha os oócitos em solução de 0,5 M de sacarose por 5 min. Na seqüência, os oócitos passaram por gotas de soluções de 0,25 M e 0,125 M de sacarose em PBS acrescido de 0,4% de BSA, permanecendo 5 min em cada uma. Tanto as soluções de congelamento quanto às de descongelamento encontravam-se a 38°C no momento de uso.

2.4. Tratamento 2 (T2):

Os procedimentos de vitrificação e reaquecimento do tratamento 2 foram adaptados a partir do protocolo descrito por Fahy *et al.*, (2004), para criopreservação de oócitos de camundongo.

Foi utilizada uma solução base com 2,8 M de formamida, 2,7 M de EG, 2,8 M de DMSO, 7% de polivinilpirrolidona e 1% de X-1000. Foram realizadas três diluições da solução base: Solução 1 – 9,2% sol base; Solução 2 – 26% sol base e Solução 3 – 90% sol base.

Para a vitrificação, os oócitos foram mantido durante 3 min na Solução 1 e após por 1 min na Solução 2, ambos a temperatura de 38°C. Após, foram transferido para Solução 3, imediatamente envasados pelo sistema OPS e mantidos no vapor de nitrogênio durante 3 min, antes da imersão no nitrogênio líquido.

O reaquecimento foi realizado pela exposição das palhetas ao ar por 10 seg e imersão da extremidade da OPS com os oócitos em solução 1 M de sacarose a 20°C por 10 seg. Na seqüência, os oócitos permaneceram durante 5 min em sacarose 1 M e submetidos a 2 lavagem de 10 min em PBS com 0,4% de BSA, a temperatura de 38°C.

2.5. Maturação *in vitro*:

A maturação foi realizada em frascos de vidro, hermeticamente fechados e gaseificados, como o descrito por Macedo et al. [19], no meio TCM199 com adição de 400 ng/ml de hormônio do crescimento eqüinos (eGH) + 200 ng/ml de fator de crescimento semelhante a insulina - I (IGF-I), suplementado com 0,1% BSA, 100 UI/ml de penicilina e 50µg/ml de estreptomicina sob atmosfera contendo 5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂ (mistura de gás). Após a maturação de 40h, houve a retirada das células do *cumulus* por cuidadosa pipetagem. Os oócitos foram avaliados em microscópio invertido sob aumento de 400X e corados em Hoechst 33342 (10mg/ml) para avaliação em microscópio de fluorescência do estágio de maturação nuclear. Os oócitos foram considerados maduros (MII), quando foi observada a extrusão do primeiro corpúsculo polar e formação da placa metafásica.

2.4. Análise estatística:

A comparação dos índices de MII em oócitos frescos (oócitos Ccp e Cex) e a comparação das taxas de MII entre grupos controles e tratamentos de vitrificação foram realizadas pelo Teste de Qui-quadrado. O efeito da interação entre as características das células do *cumulus* e os tratamentos de vitrificação sobre o índice de MII foi avaliado pelo método de regressão logística. O risco de ocorrer à maturação oocitária (MII) foi estimado pela razão de chance (odds ratio – OR) e intervalo de confiança de 95%.

A análise de regressão logística foi realizada utilizando o CATMOD [31].

Em todos os casos, foi considerada diferença significativa entre os grupos quando $P < 0,05$.

3. Resultados

A vitrificação de oócitos imaturos de eqüinos não reduziu os índices de maturação em relação ao controle após MIV de 40 horas sob atmosfera de mistura de gás (Tabela 1). O índice de oócitos que atingiram estágio de MII submetidos à T1 (38,3%) e T2 (33,3) não diferiu do encontrado no grupo controle (41%; $P > 0,05$).

Avaliando-se a maturação dos oócitos frescos (grupo controle), de acordo com as características das células do *cumulus*, pode-se verificar que oócitos Cex (53,2%, Figura 2) obtiveram maior índice de maturação do que oócitos Ccp (29,3%), cultivados em meio contendo IGF-1 e eGH, sob atmosfera com mistura de gás ($P < 0,05$; Tabela 2).

Na Figura 3 (a, b) pode-se observar as características dos oócitos após o processo de vitrificação/reaquecimento. Na Tabela 3 estão demonstrados os índices de maturação (MII) dos oócitos após MIV, de acordo com o tratamento de vitrificação utilizado e a classificação do *cumulus* (Ccp e Cex).

A avaliação da influência das características do *cumulus* na vitrificação, realizada por regressão logística, não identificou diferença estatística na maturação dos oócitos (Tabela 4; Figura 4). Contudo oócitos Cex obtiveram maiores índices de MII do que oócitos Ccp em T1 (50% vs 27,3%) e T2 (45,7% vs 21,6%).

4. Discussão

Os protocolos de vitrificação descritos no presente estudo mostraram-se eficientes para a vitrificação de oócitos eqüinos imaturos na presença do *cumulus-oophorus*, já que não foi detectada diferença nos índices de maturação após a vitrificação/reaquecimento em relação ao grupo controle (38,3% T1, 33,3% T2 vs 41% controle). Sendo considerados altos índices de

maturação quando comparados com a vitrificação de oócitos eqüinos VG de estudos anteriores (17%, 30% e 28%) [4, 8, 9].

A vitrificação pelo Tratamento-1 foi descrita anteriormente para oócitos eqüinos em MII, e demonstrou resultados promissores [18]. Em oócitos VG os tempos de exposição aos crioprotetores foram reduzidos pela metade, com base na diminuição das lesões ultra-estruturais encontradas em estudos anteriores utilizando o protocolo T1 para Cco imaturos (dados não publicados). A presença das células do *cumulus* não interferiu no fluxo de crioprotetores para o interior dos oócitos, permitindo a vitrificação e o reaquecimento de Cco íntegros em ambos os protocolos de vitrificação.

A utilização de oócitos Cex na MIV em eqüinos foi descrita pela primeira vez por Alm & Hinrichs [32]. Esses são recuperados em grandes proporções na espécie eqüina, geralmente de folículos atrésicos. Possuem índices de MII em MIV [20, 25] e desenvolvimento embrionário após ICSI [22, 24] iguais ou melhores do que oócitos Ccp. No presente estudo, oócitos Cex demonstraram índices superiores de MII, quando maturados sob atmosfera de mistura de gás, concordando com os resultados descritos em estudos anteriores [20, 25].

As características das células do *cumulus*, no momento da coleta dos oócitos, não interferiram nos índices de MII após a vitrificação (27,3 e 21,6% CP vs 50 e 45,7% EX). Contudo, oócitos Cex demonstraram valores superiores de maturação em todos os tratamentos (Controle, T1 e T2). Esses achados corroboram com o descrito por Tharasanit et al. [33], porém oócitos Cex sofreram maior índice de lesão do fuso mitótico do que oócitos Ccp [33], provavelmente por encontrar-se em estágio mais avançado de maturação citoplasmática do que oócitos Ccp [32]. É possível que oócitos Cex já tenham sintetizado um maior número de proteínas necessárias para a formação do fuso mitótico e definição da meiose (Proteína ativadora da meiose – MAP), quando comparados com oócitos Ccp, estando mais susceptíveis às lesões promovidas pela criopreservação [33].

Além dos fatores já descritos, como estágio de maturação oocitária e protocolo de criopreservação utilizado, é importante considerar que o protocolo de maturação utilizado também influencia na sobrevivência e no potencial de desenvolvimento dos oócitos após a criopreservação [34]. O protocolo de MIV

utilizado no presente estudo, com adição de IGF-I e eGH, já foi descrito na maturação de oócitos eqüinos [18]. A utilização de IGF-I incrementa os índices de maturação nuclear e citoplasmática [35,36] e a capacidade do GH em acelerar a quebra da vesícula germinal (QVG) na retomada da meiose [37], fundamentam a associação de IGF-I e GH no cultivo de oócitos eqüinos.

Na espécie eqüina, o sistema de MIV utilizado torna-se ainda mais relevante quando se avaliam os índices de ativação, clivagem e fertilização após ICSI, os quais ainda são muito baixos na espécie [13]. Em oócitos criopreservados os índices de ativação (26%) e clivagem (8%) são ainda mais reduzidos [9]. Deve-se ressaltar que o único sucesso no nascimento de potros a termo, a partir de oócitos vitrificados, ocorreu a partir de oócitos maturados *in vivo*. Esses foram vitrificados no estágio de MII e fertilizados *in vivo*, após transferência para o oviduto de receptoras previamente inseminadas [38]. Esses fatos demonstram as deficiências que ainda existem em todo o processo de produção *in vitro* de embriões na espécie eqüina.

Pode-se concluir que oócitos eqüinos em estágio de VG podem ser maturados *in vitro* após vitrificação/reaquecimento, obtendo índices satisfatórios de MII. Sendo que as características das células do *cumulus oophorus*, no momento da coleta, não interferem na maturação nuclear de oócitos eqüinos vitrificados imaturos.

5. Referências Bibliográficas

- [1] Park SE, Son WY, Lee SH, Lee KA, Ko JJ, Cha KY. Chromosome and spindle configurations of human oocytes matured *in vitro* after cryopreservation at the germinal vesicle stage. *Fertility and Sterility* 1997;68:920–926.
- [2] Chen SU, Lien YR, Chao KH, Ho HN, Yang YS, Lee TY. Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing – a review article. *Mol Cell Endocrinol* 2003;202: 101–107.
- [3] Carrol J, Depypere H, Matthews C. Freeze-thaw induced changes in the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. *J Reprod Fertil* 1990;90:547-553.

- [4] Hochi S, Kozawa M, Fujimoto T, Hondo E, Yamada J, Oguri N. *In vitro* maturation and transmission electron microscopic observation of horse oocytes after vitrification. *Cryobiology* 1996;33:300-310.
- [5] Jones A, Van Blerkom J, Davis P, Toledo AA. Cryopreservation of metaphase II human oocytes effects mitochondrial membrane potential: implications for developmental competence. *Hum Reprod* 2004;19:1861–1866.
- [6] Comizzoli P, Wildt DE, Pukazhenthi BS. Effect of 1,2- propanediol versus 1,2-ethanediol on subsequent oocyte maturation, spindle integrity, fertilization, and embryo development in vitro in the domestic cat. *Biol Reprod* 2004;71:598–604.
- [7] Hochi S, Ito K, Hirabayashi M, Ueda M, Kimura K, Hanada A. Effect of nuclear stages during IVM on the survival of vitrified-warmed bovine oocytes. *Theriogenology* 1998;49:787–796.
- [8] Hurtt AE, Landim-Alvarenga GE, Seidel Jr, Squires EL. Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, Ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. *Theriogenology* 2000;54:119-128.
- [9] Tharasanit T, Colenbrander B, Stout TAE. Effect of maturation stage at cryopreservation on post-thaw cytoskeleton quality and fertilizability of equine oocytes. *Mol Reprod Dev* 2006;73:627-637.
- [10] Sathananthan AH, Ng SC, Trounson AO, Bongso A, Ratnam SS, Ho J, et al. The effects of ultrarapid freezing on meiotic spindles of mouse oocytes and embryos. *Gamete Res* 1988;21:385-401.
- [11] Carroll J, Warnes GM, Matthews CD. Increase in digyny explains polyploidy after in vitro fertilization of frozen-thawed mouse oocytes. *J Reprod Fertil* 1989;85:489-94.
- [12] Glenister PH, Wood MJ, Kirby C, Whittingham DG. Incidence of chromosome anomalies in first-cleavage mouse embryos obtained from frozen-thawed oocytes fertilized in vitro. *Gamete Res* 1987;16:205-16.
- [13] Squires EL, Carnevale EM, McCue PM, Bruemmer JE. Embryo technologies in the horse. *Theriogenology* 2003;59:151-170.
- [14] Maclellan LJ, Lane M, Sims MM, Squires EL. Effects of sucrose or trehalose on vitrification of equine oocytes 12h or 24h after the onset of maturation. *Theriogenology* 2001;55:310 (Abstract).

- [15] Wowk B, Leiti E, Rasch CM, Karimi NB, Harris SB, Grefory MF. Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. *Cryobiology* 2000;40:228-236.
- [16] Wowk B, Leiti E, Rasch CM, Karimi NB, Harris SB, Grefory MF. Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. *Cryobiology* 2000;40:228-236.
- [17] Fahy GM, Wowk B, Wu J, Paynter S. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. *Cryobiology* 2004;48:22-35.
- [18] Curcio BR, Deschamps JC, Nogueira CEW, Pereira GR, Macedo Jr MC, Boff ALN, Rambo G, Lucia Jr T. Maturação e vitrificação de oócitos eqüinos cultivados na presença de hormônio do crescimento eqüino e fator de crescimento semelhante à insulina-I. *Acta Scientiae Veterinariae* 2005; 33(Suppl1): 171 (Abstract).
- [19] Macedo Jr M, Deschamps JC, Lucia Jr T, Bordignon J, Serret CG, Rambo G, Pivato I, Schmitt E. In vitro penetration of fresh and vitrified swine oocytes by homologous spermatozoa using different incubation systems. *Anim Reprod Sci* 2006;92:334-348.
- [20] Hinrichs K. Cumulus expansion, chromatin configuration and meiotic competence in horse oocytes: a new hypothesis. *Equine Vet J Suppl* 1997;43-46.
- [21] Hinrichs K, Williams KA. Relationships among oocyte-cumulus morphology, follicular atresia, initial chromatin configuration, and oocyte meiotic competence in the horse. *Biol Reprod* 1997;57:377-384.
- [22] Tremoleda JL, Van Haeften T, Stout TA, Colenbrander B, Bevers MM. Cytoskeleton and chromatin reorganization in horse oocytes following intracytoplasmic sperm injection: patterns associated with normal and defective fertilization. *Biol Reprod* 2003;69:186-194.
- [23] Tremoleda JL, Stout TA, Lagutina I, Lazzari G, Bevers MM, Colenbrander B & Galli C. Effects of in vitro production on horse embryo morphology, cytoskeletal characteristics, and blastocyst capsule formation. *Biol Reprod* 2003;69:895-1906.
- [24] Choi YH, Love LB, Varner DD, Hinrichs K. Factors affecting developmental competence of equine oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Reproduction* 2004;127:187-194.

- [25] Curcio BR, Leite DSP, Boff ALN, Velho J, Rambo G, Nogueira CEW, Deschamps JC. Maturação nuclear de oócitos eqüinos com cumulus compacto e expandido, em atmosfera de mistura de gás. *Acta Scientiae Veterinariae* 2006; 34(Suppl1): 459 (Abstract).
- [26] Fernandes CB, Lima-Neto, JF, Martins LR, Bonesi GL, Tsuribe PM, Melo CM, Leal LS, Dores CB, Blanco IDH, Derussi AAP, Pavão GD, Martin I, DeVitto LG, Landim-Alvarenga FC. Maturação nuclear in vitro de ovócitos eqüinos de acordo com a compactação das células do cumulus e da granulosa. *Acta Scientiae Veterinariae* 2006; 34(Suppl1): 443 (Abstract).
- [27] Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Primavera MR, Rocchetta G, Ciotti PM, Magrini O, Seracchiol R, Venturoli S, Flamigni C. Technical aspects of oocyte cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol* 2000;169:39-42.
- [28] Carnevale EM. Oocyte transfer and gamete intrafallopian transfer in the mare. *Anim Reprod Sci* 2004;82-83:617-624.
- [29] Carnevale EM, Coutinho da Silva MA, Squires EL. How to collect and transfer oocytes. In *Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, News Orleans, LA. 2003:293-294.
- [30] Vatja G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 1998;51:53-58.
- [31] SAS®, 1997. *SAS/STAT User's Guide*. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- [32] Alm H, Hinrichs K. Effect of cycloheximide on nuclear maturation of horse oocytes and its relation to initial cumulus morphology. *J Reprod Fertil* 1996;107: 215–220.
- [33] Tharasanit T, Colleoni S, Lazzari G, Colenbrander B, Galli C, Stout TAE. Effect of cumulus morphology and maturation stage on the cryopreservability of equine oocytes. *Reproduction* 2006;132:759-769.
- [34] Men H, Monson R, Rutledge J. Effects of meiotic stages and maturation protocols on bovine oocyte's resistance to criopreservation. *Theriogenology* 2002; 57:1095-1103.
- [35] Carneiro C, Lorenzo P, Pimentel C, Pegoraro L, Bertolini M, Ball B, Anderson G, Liu I. Influence of insulin-like growth factor-I and interaction with gonadotropins, estradiol, and fetal calf serum on in vitro maturation and parthenogenic development in equine oocytes. *Biol Reprod* 2001;65:899-905.

- [36] Li XI, Dai Y, Allen WR. Influence of insulin-like growth factor-I on cytoplasmic maturation of horse oocytes in vitro and organization of the first cell cycle following nuclear transfer and parthenogenesis. *Biol Reprod*, 2004;71:1391-1396.

- [37] Izadyar F, Colenbrander B, Bevers MM. In vitro maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. *Mol Reprod Dev* 1996;45:372-377.

- [38] Maclellan LJ, Carnevale EM, Coutinho Silva MA, Scoggin CF, Bruemmer JE, Squires EL. Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from super-stimulated and non-stimulated mares. *Theriogenology* 2002;58:911-919.

Tabelas

Tabela 1 - Comparação dos índices de maturação de oócitos frescos e vitrificados (tratamentos 1 e 2), cultivados sob atmosfera de mistura de gás

	Imaturos n (%)	MII n (%)	Total n (%)
Controle	95 ^a (59,0%)	66 ^a (41,0%)	161 (100%)
Tratamento 1	92 ^a (61,7%)	57 ^a (38,3%)	149 (100%)
Tratamento 2	96 ^a (66,7%)	48 ^a (33,3%)	144 (100%)
Total	283 (62,3%)	171 (37,7%)	454 (100%)

^a Letras iguais na mesma coluna indicam ausência de diferença significativa pelo teste de Qui-quadrado ($P > 0,05$)

Tabela 2 - Comparação dos índices de maturação de oócitos eqüinos frescos, cultivados sob atmosfera de mistura de gás.

	Imaturos n (%)	MII n (%)	Total n (%)
Oócitos Ccp	58 ^a (70,7%)	24 ^a (29,3%)	82 (100%)
Oócitos Cex	37 ^b (46,8%)	42 ^b (53,2%)	79 (100%)
Total	95 (59,0%)	66 (41,0%)	161 (100%)

Ccp: *Cumulus* compacto; Cex: *Cumulus* expandido; ^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Qui-quadrado ($P < 0,05$)

Tabela 3 – Descrição dos índices de maturação de oócitos eqüinos submetidos à vitrificação (Tratamento 1 e Tratamento 2), de acordo com as características das células do *cumulus oophorus*

	Oócitos Ccp				Oócitos Cex				Total de oócitos (Ccp+Cex)			
	Maturação				Maturação				Maturação			
	Imaturos		MII		Imaturos		MII		Imaturos		MII	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Controle	58	70,7	24	29,3	37	46,8	42	53,2	95	59,0	66	41,0
Tratamento 1	56	72,7	21	27,3	36	50,0	36	50,0	92	61,7	57	38,3
Tratamento 2	58	78,4	16	21,6	38	54,3	32	45,7	96	66,7	48	33,3

Ccp: *Cumulus* compacto; Cex: *Cumulus* expandido

Tabela 4 – Modelo de regressão logística para comparação dos índices de maturação dos oócitos, avaliando a interação entre os tratamentos de vitrificação e as características das células do *cumulus*

	Oócitos Ccp ^a			Oócitos Cex ^b			Oócitos (Ccp+Cex) ^c		
	OR	IC (95%)	P	OR	IC (95%)	P	OR	IC (95%)	P
Controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tratamento 1	0,91	0,45; 1,81	0,7800	0,88	0,46; 1,67	0,6976	0,89	0,57; 1,41	0,6224
Tratamento 2	0,67	0,32; 1,38	0,2758	0,74	0,39; 1,41	0,3644	0,72	0,45; 1,15	0,1679

^a Constante:-0,88; Desvio:266,65; Graus de liberdade:230; P=0,048.

^b Constante: 0,13; Desvio:305,54; Graus de liberdade:218; P=0,570.

^c Constante:-0,36; Desvio:599,52; Graus de liberdade:451; P=0,023.

Ccp: *Cumulus* compacto; Cex: *Cumulus* expandido

Figuras

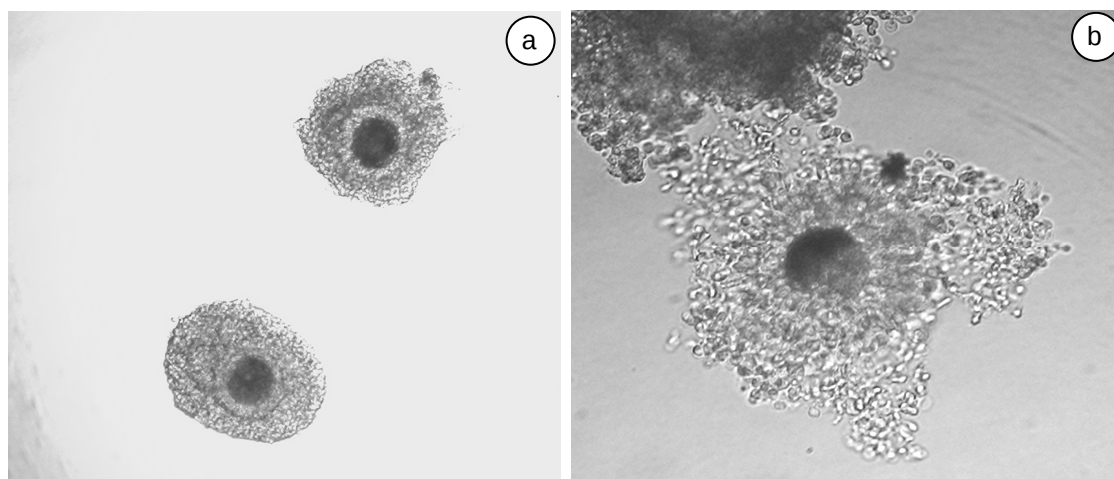


Figura 1 – Oócitos eqüinos imediatamente após a coleta. **a.** oócitos *cumulus* compacto. **b.** oócito *cumulus* expandido.

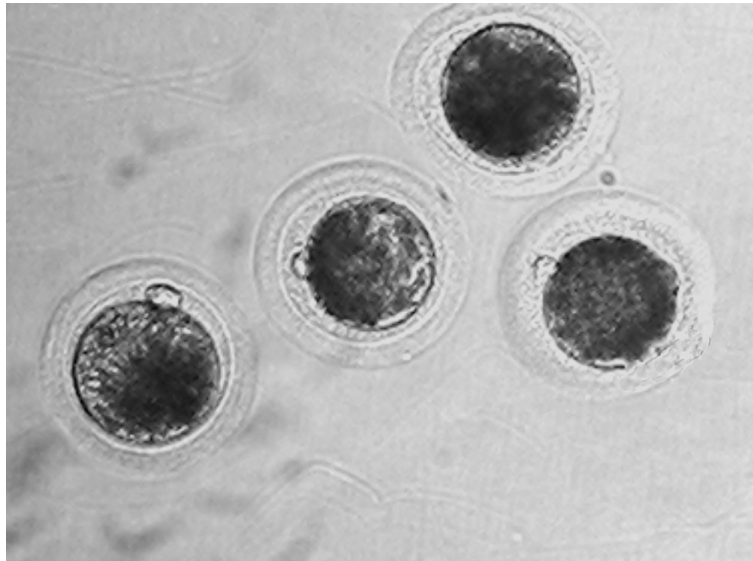


Figura 2 – Oócitos frescos (grupo controle - Cex) em metáfase II, após incubação de 40h.

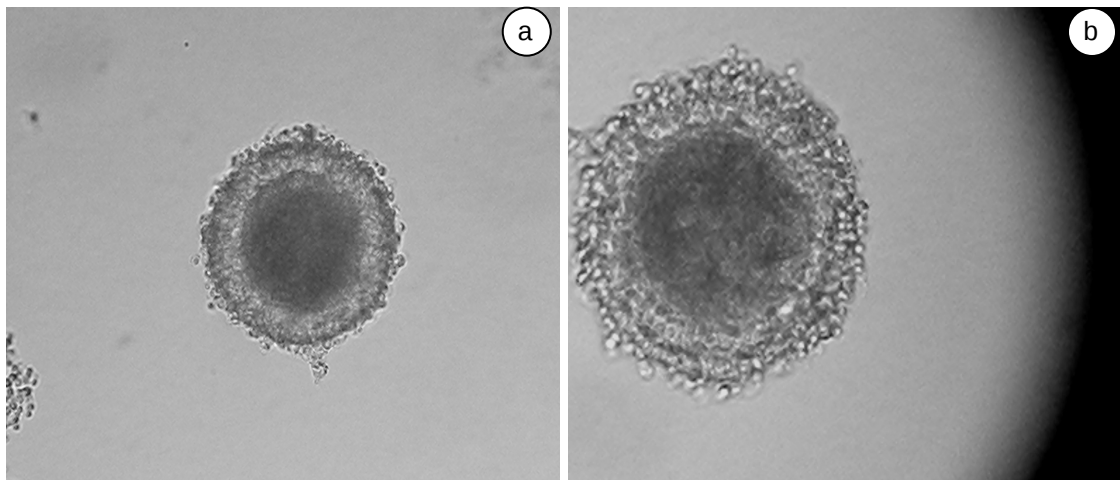


Figura 3 – Oócitos imaturos após vitrificação/reaquecimento. **a.** oócitos *cumulus* compacto após vitrificação pelo tratamento 2. **b.** oócitos *cumulus* compacto após vitrificação pelo tratamento 1.

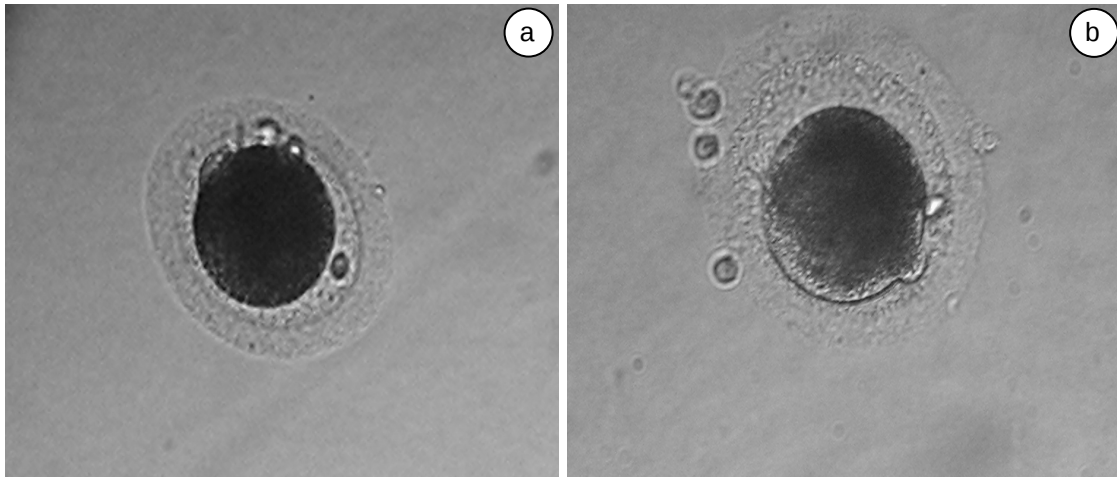


Figura 4 – Oócitos vitificados/reaquecidos em estágio de Metáfase II, após 40h de incubação. **a.** Oócitos Cex tratamento 2. **b.** Oócito Cex tratamento 1.

Conclusões Gerais

A utilização de bloqueadores sintéticos da formação de gelo mostrou-se viável para a vitrificação de complexos *cumulus-oophorus* imaturos de eqüinos.

A redução do período de equilíbrios nas soluções crioprotetoras resultou em melhor preservação das características morfológicas ultra-estruturais de complexos *cumulus-oophorus* eqüinos, submetidos à vitrificação. Demonstrando que a presença de células do *cumulus* não interferiu no influxo/efluxo de crioprotetores

Avaliando-se a maturação dos oócitos frescos, de acordo com as características das células do *cumulus*, pode-se verificar que oócitos *cumulus* expandido obtiveram maior índice de maturação nuclear do que oócitos *cumulus* compacto, em meio contendo IGF-I e eGH sob atmosfera com mistura de gás.

Oócitos eqüinos em estágio de VG podem ser maturados *in vitro* após vitrificação/reaquecimento, obtendo índices satisfatórios de MII. Sendo que as características das células do *cumulus-oophorus*, no momento da coleta, não interferem na maturação nuclear de oócitos eqüinos vitrificados imaturos.

Sugestões e trabalhos futuros

Mais estudos são necessários para a confirmação da viabilidade dos oócitos eqüinos vitrificados com os protocolos descritos. A realização de ICSI para acompanhamento da capacidade de fertilização e desenvolvimento embrionário inicial deve ser realizada para essa confirmação. Na seqüência, testes *in vivo* poderão responder sobre a capacidade de manutenção de prenhez e nascimento de potro a termo a partir de oócitos eqüinos vitrificados pelos métodos descritos.

Algumas adaptações, do sistema de vitrificação, também podem ser realizadas. Alternativas na utilização dos *containers* mais adequados no envase são o foco de pesquisas atuais sobre criopreservação de oócitos e embriões nas espécies de produção. Como na espécie eqüina o desenvolvimento dessas tecnologias é mais atrasado, ainda não foram descritos outros sistemas de vitrificação, diferente do OPS. A utilização dos meios descritos no presente estudo, em outros sistemas de vitrificação demonstram serem trabalhos promissores para o futuro.

Referências Bibliográficas

ASADA, M.; ISHIBASHI, S.; IKUMI, S.; FUKUI, Y. Effect of polyvinyl alcohol (PVA) concentration during vitrification of in vitro matured bovine oocytes. **Theriogenology**, v.58, p.1199-1208, 2002.

CARNEVALE, E.M. Oocyte transfer and gamete intrafallopian transfer in the mare. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.617-624, 2004.

CARNEVALE, E.M.; COUTINHO DA SILVA, M.A.; SQUIRES, E.L. How to collect and transfer oocytes. In **Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, News Orleans, LA., p.293-294, 2003.

CARROLL, J.; WARNES, G.M.; MATTHEWS, C.D. Increase in digyny explains polyploidy after in vitro fertilization of frozen-thawed mouse oocytes. **Journal Reproduction and Fertility**, v.85, p.489-94, 1989.

CHOI, Y.H., HOCHI, S., BRAUN, J., SATO, K., OGURI, N. *In vitro* maturation of equine oocytes collected by follicle aspiration and the slicing of ovaries. **Theriogenology**, v. 40, p. 959-966, 1993.

CURCIO, B.R.; DESCHAMPS, J.C.; NOGUEIRA, C.E.W.; PEREIRA, G.R.; MACEDO Jr, M.C.; BOFF, A.L.N.; RAMBO, G.; LUCIA Jr, T. Maturação e vitrificação de oócitos eqüinos cultivados na presença de hormônio do crescimento eqüino e fator de crescimento semelhante à insulina-I. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33(Suppl1), p.171, 2005.

CURCIO, B.R., FREY Jr, F.; BOFF, A.L.N.; DE LEON, P.M.; LINS, L.A.; ALBUQUERQUE, L.P.; RAMBO, G.; NOGUEIRA, C.E.W.; DESCHAMPS, J.C. Taxa de recuperação de oócitos eqüinos com *cumulus oophorus* compacto por curetagem da parede folicular. **Ciência Animal Brasileira**, No prelo, 2006.

ELDRIDGE-PANUSKA, W.D.; CARACCIOLO DI BRIENZA, V.; SEIDEL JR., G.E.; SQUIRES, E.L.; CARNEVALE, E.M. Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos **Theriogenology**, v.63, v.1308–1319, 2005.

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

FARIN, C.E.; RODRIGUEZ, K.F.; ALEXANDER, J.E.; HOCKNEY, J.E.; HERRICK, J.R.; KENNEDY- STOSKOPF, S., The role of transcription in EGF- and FSH-mediated oocyte maturation in vitro. **Animal Reproduction Science**, (in press). 2007.

GALLI, C.; COLLEONI, S.; DUCHI, R.; LAGUTINA, I.; Lazzari, G. Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by *in vitro* procedures ranging from *in vitro* maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. **Animal Reproduction Science**, doi:10.1016, 2006.

GLENISTER, P.H.; WOOD, M.J.; KIRBY, C.; WHITTINGHAM, D.G. Incidence of chromosome anomalies in first-cleavage mouse embryos obtained from frozen-thawed oocytes fertilized in vitro. **Gamete Research**, v.16, p.205-16, 1987.

HINRICHS K., SCHMIDT A. L., FRIEDMANN P. P., SELGRATH J. P., MARTIN, M. G. *In vitro* maturation of horse oocytes characterization of chromatin configuration using fluorescence microscopy. **Biology of Reproduction**, v.48, p.363-370, 1993.

HOCHI, S.; ITO, K.; HIRABAYASHI, M.; UEDA, M.; KIMURA, K.; HANADA, A. Effect of nuclear stages during IVM on the survival of vitrified-warmed bovine oocytes. **Theriogenology**, v.49, p.787–796, 1998.

HOCHI, S.; KOZAWA, M.; FUJIMOTO, T.; HONDO, E.; YAMADA, J.; OGURI, N. In vitro maturation and transmission electron microscopic observation of horse oocytes after vitrification. **Cryobiology**, v. 33, p. 300-310, 1996.

HURTT, A. E.; LANDIM-ALVARENGA, F.; SEIDEL, G. F.; SQUIRES, E. L. Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. **Theriogenology**, v.54, p.119-128, 2000.

LIEBERMANN, J.; NAWROTH, F.; ISACHENKO, V.; ISACHENKO, E.; RAHIMI, G.; TUCKER, M.J. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. **Biology of Reproduction**, v.67, p.1671-1680, 2002.

MACLELLAN, L. J.; LANE, M.; SIMS, M. M.; SQUIRES, E. L. Effect of sucrose or trehalose on vitrification of equine oocytes 12h or 24h after the onset of maturation. **Theriogenology**, v.55, p.310, 2001(abstr).

PIMENTEL, C. A.; RIBEIRO, D. B.; FERNANDES, C. E.; HAMMES, A. M.; MARTINS, C. F. & FIALA, S. M. E. Impacto da I. A. na equideocultura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.22, n.2, p.91-97, 1998.

RALL, W.F.; FAHY G.M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. **Nature**, v.313, p.573-575, 1985.

SATHANANTHAN, A.H.; TROUNSON, A.O.; BONGSO, A.; RATNAM, S.S.; HO, J. The effects of ultrarapid freezing on meiotic spindles of mouse oocytes and embryos. **Gamete Research**, v.21, p.385-401, 1988.

SQUIRES, E. L.; CARNEVALE, E. M.; McCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**, v.59, p.151-170, 2003.

SQUIRES, E.L.. Perspectivas para o uso de biotecnologias na reprodução eqüina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33 (supl 1), p.69-82, 2005.

THARASANIT, T.; COLENBRANDER, B.; STOUT, T.A.E. Effect of maturation stage at cryopreservation on post-thaw cytoskeleton quality and fertilizability of equine oocytes. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.73, p.627-637, 2006.

VATJA, G. Vitrification of oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v.60/61, p.357-364, 2000.

WOWK, B.; LEITI, E.; RASCH, C.M.; KARIMI, N.B.; HARRIS, S.B.; GREFORY M.F. Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. **Cryobiology**, v.40, p.228-236, 2000.