

Avaliação da morfologia de oócitos imaturos de bovinos criopreservados em diferentes concentrações de 1,2 propanediol

Morphological evaluation of immature bovine oocytes cryopreserved with 1,2 propanediol

Wanderlei Ferreira de Sá,* Luiz Sérgio de Almeida Camargo,** Ademir de Moraes Ferreira,* Flamarion Tenório Albuquerque,*** Luiz Altamiro Garcia Nogueira****

Resumo

O objetivo deste trabalho foi estudar a morfologia de oócitos imaturos de bovinos abatidos em matadouro, frente à criopreservação clássica com dois gradientes de concentração diferentes de crioprotetor. No tratamento 1, utilizou-se 1,6M de 1,2 propanediol, onde os oócitos foram desidratados em 3 etapas crescentes (0,53; 1,06 e 1,6M), à temperatura ambiente e congelados utilizando-se o método clássico. A descongelação foi realizada em banho Maria a 37°C por 30" e reidratação em três etapas decrescentes (1,6; 1,06 e 0,53M), acrescidos de 0,25M de sacarose cada. No tratamento 2 foi utilizado 2,0M de 1,2 propanediol, de maneira semelhante ao tratamento 1, com desidratação contendo 0,7; 1,4 e 2,0M e reidratação 2,0; 1,4 e 0,7M. Após a reidratação os oócitos foram lavados em meio TCM 199 e levados para maturação *in vitro*. O grupo controle foi constituído de oócitos recém-colhidos, colocados para maturação por 24h em meio TCM 199 com 10% de SVC e FSH em co-cultura, com 5% CO₂ no ar a 39°C. Os resultados foram semelhantes (P>0.05) para as duas concentrações de propanediol utilizadas, após a descongelação e reidratação sendo que 69,5% (n=308) dos oócitos apresentaram morfologia considerada normal, 5,2% (n=308) de desnudos e 25,3% (n=308) de degenerados. Entretanto, após maturação *in vitro*, 19,15 % (n=308) oócitos apresentaram rompimento da "zona pelúcida".

Palavras-chave: bovinos; oócitos; criopreservação; morfologia.

Introdução

A fecundação *in vitro* (FIV) é uma técnica que permite o aproveitamento de um número maior de oócitos do que a transferência de embriões por superovulação, favorecendo o melhoramento genético através do aumento da intensidade de seleção e diminuição do intervalo entre gerações, além de propiciar estudos relacionados com a interação de gametas e engenharia genética.

O aproveitamento de gametas femininos para a FIV implica também a necessidade do desenvolvimento de técnicas para a conservação dos mesmos. Com a criopreservação de oócitos, pode-se formar bancos de gametas femininos, para serem utilizados em pesquisa ou em aplicações comerciais e para a preservação de espécies em extinção, contribuindo, juntamente com a FIV, para o melhoramento genético e para o desenvolvimento de técnicas relacionadas à clonagem e engenharia genética. Dessa maneira estudos têm sido realizados para a criopreservação de oócitos.

Procedimentos para a criopreservação de oócitos não têm-se desenvolvido na mesma extensão que ocorreu com os embriões. No entanto, com o estabelecimento das técnicas de FIV, houve um incremento nestes estudos.

Um ponto importante na criopreservação de oócitos imaturos é a manutenção da sua capacidade de desenvolvimento após a descongelação. Em oócitos imaturos recém-aspirados, existe uma relação entre a sua morfologia e a capacidade de maturar *in vitro* (Sirard et al., 1992), tornando importante esta avaliação morfológica para a seleção dos oócitos. Outro aspecto na congelação de oócitos imaturos é a manutenção das células do *cumulus*. Essas células podem intermediar ou produzir diversos fatores que interferem na maturação e subsequente desenvolvimento do zigoto (Brackett e Zuelke, 1993 ; Thibault et al., 1987). As células do *cumulus* podem propiciar um acúmulo de energia suficiente para permitir a fecundação e desenvolvimento embrionário inicial, até que o genoma embrionário torne-se ativo (Sirard et al., 1992). Desse modo, a presença das células do *cumulus* após a descongelação é importante para o posterior desenvolvimento do gameta.

* Embrapa - Gado de Leite. Rua Eugênio do Nascimento,610, 36038-330 Dom Bosco - Juiz de Fora/MG, Brasil .

** Médico Veterinário, bolsista CAPES, Embrapa - Gado de Leite.

*** Departamento de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Rod. Antiga Rio-São Paulo, Km 47, Seropédica, RJ, Brasil.

**** Faculdade de Veterinária, DS, Universidade Federal Fluminense (UFF), Rua Vital Brazil Filho 64, 24230-340 Niterói/RJ, Brasil.

Um dos métodos mais utilizados para a criopreservação, tanto para embriões como para oócitos bovinos, é o clássico, que possui uma curva de congelamento lenta. Entre os crioprotetores, os mais utilizados têm sido o glicerol, propanediol (PROH) e o dimetil sulfóxido (DMSO). A utilização desses crioprotetores tem produzido resultados inconsistentes quando utilizados na FIV (Fuku et al., 1992; Schellander et al., 1994; Yang et al., 1994). Quando compararam diversos crioprotetores, Suzuki e Nishikata (1992) citaram que o PROH pode ser um crioprotetor mais apropriado para a congelamento de oócitos imaturos de bovinos. No entanto, Schellander et al. (1994) não observaram diferenças nas taxas de clivagem quando utilizaram glicerol, PROH e DMSO. Os crioprotetores também possuem toxicidade química, que pode causar danos ao citoesqueleto das células (Parks e Ruffing, 1992).

Desse modo, este trabalho tem o objetivo de estudar o efeito de duas concentrações de PROH pela congelamento clássica, sobre a morfologia de oócitos imaturos de bovinos.

Material e métodos

Os oócitos foram aspirados de ovários de fêmeas bovinas mestiças, colhidos em matadouro distante 35km do laboratório. Os ovários foram transportados acondicionados em frascos com solução fisiológica (0,9% NaCl) contendo antibióticos (0,1 g/l de sulfato de estreptomicina), em temperatura entre 30 e 34°C, por um período de 3 horas após a coleta. O experimento foi conduzido de janeiro a julho de 1995, no Laboratório de Reprodução Animal da EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite, Coronel Pacheco, MG.

Dos ovários colhidos, foram puncionados folículos de diâmetro acima de 1,5mm e o conteúdo foi depositado em um cálice cônico contendo meio Talp Hepes (Bavister et al., 1983), previamente aquecido a 37°C. Após um período de decantação de 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi lavado com meio Talp Hepes e depositado em uma placa de Petri mantida em placa aquecedora a 38°C, para a manipulação dos oócitos. Os oócitos foram lavados por duas vezes em meio Talp Hepes e, em seguida, avaliados morfologicamente. Os oócitos contendo células do *cumulus oophorus* compacto, com no mínimo 3 camadas (complexo oócito-*cumulus*; COC) e citoplasma homogêneo foram classificados como viáveis e selecionados para o experimento.

Os oócitos viáveis foram divididos em dois tratamentos e um grupo controle. Todos os oócitos foram congelados com suas respectivas células do *cumulus*.

O meio utilizado para congelar e descongelar foi o TCM 199, acrescido de 0,4 % de albumina sérica bovina. Os tratamentos utilizados para este experimento foram os seguintes:

Tratamento 1

Foram avaliados 136 COC, congelados em 1,6 M de PROH pelo método clássico (Rodrigues, 1992). Logo após a lavagem dos COC em Talp Hepes, estes foram desidratados em três banhos (etapas), com quantidades crescentes do crioprotetor, em dez minutos cada etapa, em temperatura ambiente (aproximadamente 25°C), conforme segue:

- 1ª etapa: 0,53 M de PROH
- 2ª etapa: 1,06 M de PROH
- 3ª etapa: 1,6 M de PROH

Antes de completar a terceira etapa, os COC foram envasados em palhetas de 0,25ml. Ao término desta etapa foram levados à máquina de congelamento (BIO-COOL™, FTS Systems Inc., modelo BC-70-4A), previamente resfriada a -7°C, onde permaneceram por dez minutos para a estabilização, realizando-se logo em seguida o *seeding*, seguido de mais cinco minutos para nova estabilização. Após este período, a temperatura desceu de -7 para -32°C a uma velocidade de 0,5°C/min, atingindo -32°C, as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido (-196°C). Estas palhetas foram conservadas em nitrogênio líquido por, no mínimo, uma semana.

A descongelamento foi realizada em água a 37°C por trinta segundos, e a reidratação em temperatura ambiente, em três banhos (etapas) com quantidades decrescentes do crioprotetor, adicionados de 0,25 M de sacarose, com 7 minutos de duração para cada etapa, conforme indicado a seguir:

- 1ª etapa: 1,6 M de PROH + 0,25 M de sacarose
- 2ª etapa: 1,06 M de PROH + 0,25 M de sacarose,
- 3ª etapa: 0,53 M de PROH + 0,25 M de sacarose

Tratamento 2

Foram avaliados 172 COC congelados em 2,0 M de PROH, pelo método clássico (RODRIGUES, 1992). A desidratamento foi realizada da mesma maneira do tratamento 1, contendo apenas concentrações diferentes do crioprotetor, que foram as seguintes:

- 1ª etapa: 0,7 M de PROH
- 2ª etapa: 1,4 M de PROH
- 3ª etapa: 2,0 M de PROH

A curva de congelamento foi a mesma do tratamento 1, assim como a descongelamento e reidratação, com as seguintes concentrações do crioprotetor:

- 1ª etapa: 2,0 M de PROH + 0,25 M de sacarose
- 2ª etapa: 1,4 M de PROH + 0,25 M de sacarose
- 3ª etapa: 0,7 M de PROH + 0,25 M de sacarose

Logo após a reidratação, os COC, de ambos os tratamentos, foram lavados duas vezes em meio TCM 199 (COSTA et al., 1994). Após as lavagens, todos os COC foram colocados para maturar *in vitro*.

Controle

Constituído de 131 COC não congelados (frescos), que foram levados para a maturação *in vitro* logo após a seleção.

A maturação *in vitro*, para os tratamentos e controle, foram realizados em placas de Petri de 35mm de diâmetro, contendo 3ml de TCM 199, conforme Costa (1994), para se avaliar as alterações morfológicas provocadas pela congelamento, após esse procedimento. Os cultivos foram realizados em estufa incubadora (NAPCO, modelo 6100) a 39°C, em atmosfera de 5% de CO₂, 95% de ar atmosférico e 95% de umidade por 24 horas.

A avaliação da morfologia dos oócitos foi realizada após descongelamento/reidratação e maturação *in vitro*, baseando-se nas condições das células do *cumulus* e a aparência do citoplasma. Na avaliação após a descongelamento/reidratação, os COC foram classificados em COC normais (com células do *cumulus* aderidas, compactas e homogêneas e oócitos com citoplasma homogêneo e sem fragmentação), oócitos desnudos (sem a presença das células do *cumulus*); degenerados ou com rompimento da zona pelúcida. A avaliação após a maturação *in vitro* considerou a expansão e aderência das células do *cumulus*, e integridade da zona pelúcida (após desnudamento realizado com uma pipeta de 100µl).

Foram realizadas três repetições para cada tratamento. Os dados obtidos foram analisados pelo teste do Qui Quadrado (Gomes, 1977).

Resultados e discussão

Os resultados da congelamento, descongelamento e reidratação sobre a morfologia dos COC estão apresentados na Tabela 1. A porcentagem de oócitos com morfologia normal foi semelhante entre os dois tratamentos, assim como a de oócitos desnudos ($p > 0,05$). Os oócitos considerados degenerados apresentaram o citoplasma menos denso e com textura irregular, e alguns ainda apresentavam o espaço perivitelino aumentado (Figura 1). Não foi observado rompimento da zona pelúcida (ZP) após o descongelamento e reidratação.

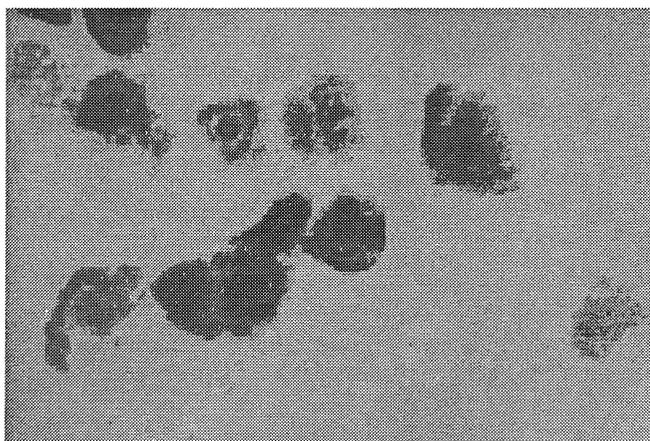


Figura 1: Oócitos imaturos bovinos logo após a descongelamento e reidratação, apresentando morfologia considerada anormal (40x)

Não se observou diferença entre as congelamentos realizadas com 1,6 M ou com 2,0 M de PROH na morfologia dos COC, produzindo um total de 69,5% de COC com aparência morfológica normal. Essa taxa é superior aos 33,3% de COC imaturos normais de bovinos encontrados por Lim et al. (1992) e aos 30,7% de COC verificados por Fuku et al. (1992).

Entretanto, os resultados são inferiores aos 78,1% obtidos por De Bem et al. (1993), e aos 80,9% observados por Yang et al. (1994), ambos utilizando PROH. Schellander et al. (1994) observaram 95% de aparência morfológica normal em COC imaturos congelados pelo método clássico com glicerol, PROH e DMSO, mas após a maturação *in vitro* apenas 38% permaneceram intactos.

Após a maturação *in vitro*, houve a expansão de todas as células do *cumulus* que estavam presentes nos oócitos, semelhante ao grupo controle. Isto indica que essas células mantiveram sua viabilidade após a criopreservação, confirmando Didion et al. (1990), que observaram que as células do *cumulus* de oócitos imaturos de suínos sobrevivem à congelamento, e Yang et al. (1994), que encontraram 60% de expansão das células do *cumulus* após a

Tabela 1: Efeito da criopreservação com PROH sobre a morfologia dos oócitos bovinos, logo após a descongelamento e reidratação

Tratamento	n	Número de COC com morfologia normal (%)	Número de oócitos desnudos (%)	Número de oócitos degenerados (%)
0,53 - 1,6 M PROH	136	97 (71,32)	11 (8,1)	28 (20,5)
0,70 - 2,0 M PROH	172	117 (68,0)	5 (2,9)	50 (29,1)
Total	308	214 (69,5)	16 (5,2)	78 (25,3)

As diferenças observadas entre os tratamentos não foram significativas ($p > 0,05$).

descongelamento, quando utilizaram COC de bovinos. Entretanto, apesar de poucos oócitos apresentarem-se desnudos durante a descongelamento e reidratação, as células do *cumulus* mostraram-se fracamente aderidas após a maturação *in vitro*, o que foi observado durante a manipulação e no processo de desnudamento, ao serem facilmente destacadas, ao contrário dos oócitos no grupo controle. Isto pode implicar insuficiente comunicação entre as células do *cumulus* e oócito, interrompendo o transporte de metabólitos entre essas duas células, alterando a atividade metabólica do oócito. Provavelmente, este fato pode prejudicar a maturação e principalmente, a fecundação *in vitro* e o futuro desenvolvimento da célula após a fecundação. Schroeder et al. (1990) postularam que lesões nas células do *cumulus* durante a congelamento podem tornar os oócitos deficientes para suportar a maturação *in vitro* e diminuir a sobrevivência pós-descongelamento.

Apesar de não ter sido observado rompimento da ZP na descongelamento e reidratação, esta ocorreu após a maturação

in vitro e procedimentos de manipulação para desnudamento, em ambos os tratamentos (Tabela 2). Nos oócitos do grupo controle não ocorreu rompimento da ZP. Grande parte desse rompimento pode ter ocorrido nos oócitos que se apresentaram degenerados após a descongelamento. Entretanto, não houve diferença entre os tratamentos. Este fato mostra um enfraquecimento da ZP ou alteração de seus constituintes durante a congelamento e descongelamento, mas que não foi suficiente para rompê-la durante essas fases. Estas lesões são confirmadas por Yang et al. (1994) e Schmidt et al. (1995) em oócitos criopreservados, através de microscopia eletrônica.

A taxa total de ZP rompida deste experimento (19,15%), encontrado após a maturação *in vitro* e desnudamento, foi inferior aos 27,8% obtidos por De Bem et al. (1993). Entretanto, esse rompimento ocorreu na descongelamento de oócitos imaturos desnudos de bovinos. Talvez a presença das células do *cumulus* possa ter um papel de proteção para a ZP durante a congelamento e descongelamento.

Tabela 2: Número de oócitos descongelados apresentando zona pelúcida intacta ou rompida, após a maturação *in vitro* e desnudamento

Tratamento	n	Número de oócitos com zona pelúcida intacta (%)	Número de oócitos com zona pelúcida rompida (%)
0,53 - 1,6 M PROH	136	109 (80,15)	27 (19,85)
0,70 - 2,0 M PROH	172	140 (81,40)	32 (18,60)
Total	308	249 (80,85)	59 (19,15)

As diferenças observadas entre os tratamentos não foram significativas ($p > 0,05$).

Conclusões

- 1 As diferenças observadas entre os tratamentos 1 e 2 não foram estatisticamente significativas, indicando não haver diferença entre os gradientes de concentração de PROH estudados sobre a morfologia de oócitos imaturos.
- 2 As diferentes concentrações de PROH estudadas não afetam a permanência das células do *cumulus*, porém diminuem o grau de aderência destas ao oócito.

- 3 A criopreservação das células do *cumulus* junto aos oócitos resultou em uma proteção maior à zona pelúcida, pois não foi observado rompimento desta após descongelamento. No entanto, suas propriedades físicas foram afetadas pois estavam mais susceptíveis a danos físicos, o que foi observado durante desnudamento, após a maturação *in vitro*.
- 4 Em virtude dos resultados observados quanto a morfologia dos COC imaturos criopreservados, estudos devem ser conduzidos para verificar a viabilidade desses após os processos de maturação e fecundação *in vitro*.

Abstract

A study was carried out to investigate the morphology of immature bovine cumulus-oocytes complexes following standard cryopreservation in two different levels of propanediol (PROH). Treatment 1 consisted of subjecting oocytes to a gradual 3-step, concentration-driven dehydration with PROH (0.53; 1.06 and 1.6M) at room temperature and subsequent freezing by the standard procedure. Oocytes were thawed in water at 37°C for 30" and subjected to a gradual 3-step, concentration-driven rehydration with PROH (1.6; 1.06 and 0.53M) in the presence of 0.25M sucrose. Treatment 2 was conducted the same way, but PROH concentrations for dehydration were 0.7; 1.4 and 2.0M and for rehydration were 2.0; 1.4 and

0.7M. After rehydration, oocytes of both treatments were washed in TCM 199 medium, followed by the *in vitro* maturation. The control consisted of nonfrozen oocytes. Oocytes were cultured in TCM 199 medium with 10% ECS, FSH, 5% CO₂ air in co-culture at 39°C, for 24 h. The following characteristics were similar for treatment 1 and 2 after thawing and rehydration: oocyte with normal morphology (69,48%, n=308), denuded (5,2%, n=308) and degenerate (25,3%; n=308). However, after *in vitro* maturation 19,15% (n=308) oocytes were with rupture of zona pelucida.

Keywords: bovine, oocyte, cryopreservation, morphology.

Referências bibliográficas

- BAVISTER, B.D., LEIBFRIED, M.L., LIEBERMAN, G. Development of preimplantation embryos of the Golden hamster in a defined culture medium. *Biology of Reproduction*, Champaign, v. 28, p. 235-243, 1983.
- BRACKETT, B.G., ZUELKE, K.A. Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*, Stoneham, v. 39, p. 43-64, 1993.
- COSTA, E.P. *Aspectos morfológicos (citológicos e ultraestruturais) e desenvolvimento de ovócitos de bovinos in vitro*. 1994. 155 f. Tese (Doutorado)- Escola de Veterinária, UFMG, 1994.
- COSTA, E.P., VALE FILHO, V.R., NOGUEIRA, J.C. et al. Cultivo *in vitro* de ovócitos de bovinos em diferentes sistemas. I- Efeito na maturação nuclear. In: ENCONTRO DE PESQUISA DA ESCOLA DE VETERINÁRIA, 14., 1994, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte : UFMG, 1994. p. 70.
- De BEM, A.R., FREITAS, V.C., SOUSA, R.V. et al. Cryopreservation of immature oocyte of bovine using 1.2 propanediol and glycerol as cryoprotector. In: RÉUNION ASSOCIATION EUROPEENNE DE TRANSFERT EMBRYONNAIRE, 9., 1993, Lyon. *Anais...* Lyon : [s.n.], 1993. p. 184.
- DIDION, B.A., POMP, D., MARTIN, M.J. et al. Observations on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 68, p. 2803-2810, 1990.
- FUKU, E., KOJIMA, T., SHIOYA, Y. et al. *In vitro* fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes. *Cryobiology*, San Diego, v. 29, p. 485-492, 1992.
- GOMES, F.P. *Curso de estatística experimental*. 7. ed. Piracicaba : Nobel, 1977. 430 p.
- LIM, J.M., FUKUI, Y., ONO, H. Developmental competence of bovine oocytes frozen at various maturation stage followed by *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology*, Stoneham, v. 37, p. 351-361, 1992.
- PARKS, J.E., RUFFING, N.A. Factors affecting low temperature survival of mammalian oocytes. *Theriogenology*, Stoneham, v. 37, p. 59-73, 1992.
- RODRIGUES, J.L. Aspectos da congelação de embriões bovinos. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, 7., 1992, Jaboticabal. *Anais...* Jaboticabal : [s.n.], 1992. p. 55-79.
- SHELLANDER, K., PELI, J., SCHMOLL, F. et al. Effects of different cryoprotectants and carbohydrates on freezing of matured and unmaturing bovine oocytes. *Theriogenology*, Stoneham, v. 42, p. 909-915, 1994.
- SCHMIDT, M., HYTTEL, P., AVERY, B. et al. Ultrastructure of *in vitro* matured bovine oocytes after controlled freezing in 10% glycerol. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 37, p. 281-290, 1995.
- SCHROEDER, A.C., CHAMPLIN, A.K., MOBRAATEN, L.E. et al. Development capacity of mouse oocytes cryopreserved before and after maturation *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, Cambridge, v. 89, p. 43-50, 1990.
- SIRARD, M.A., COENEN, K., BILODEAU, S. Effect of fresh or cultured follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. *Theriogenology*, Stoneham, v. 37, p. 39-57, 1992.
- SUZUKI, T., NISHIKATA, Y. Fertilization and cleavage of frozen thawed bovine oocytes by one step dilution method *in vitro*. *Theriogenology*, Stoneham, v. 37, p. 306, 1992.
- THIBAUT, C., SZOLLOSI, D., GÉRARD, M. Mammalian oocyte maturation. *Reproduction Nutrition and Development*, Paris, v. 27, p. 865-896, 1987.
- YANG, Q.Z., SUN, Q.Y., LIU, G.Y. et al. Developmental competence and ultrastructure damage of cryopreserved G.V. stage bovine oocytes. *Theriogenology*, Stoneham, v. 41, p. 342, 1994.