

VIABILIDADE DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS BOVINOS VITRIFICADOS EM SUPORTE PLÁSTICO

[*Viability of vitrified bovine preantral follicles in plastic straws*]

Viviane Bento Silva¹, Hélder Silva Luna^{2,*}

¹Departamento de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

²Departamento de Ciências Naturais, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

RESUMO - Este trabalho teve por objetivo verificar a viabilidade de folículos pré-antrais após vitrificação em suporte plástico. Os ovários foram coletados em abatedouro e transportados para o laboratório onde foram isolados. O líquido contendo os folículos isolados foi dividido em três grupos: grupo controle (G1), imediatamente analisado, sem vitrificação; grupo toxicidade (G2), apenas expostos aos crioprotetores; grupo vitrificado (G3), envasados em palhetas plásticas (0,25 mL) e imersas em nitrogênio líquido. O crioprotetor utilizado no teste de toxicidade e para a vitrificação foi uma solução composta por 20 % de etileno-glicol e 20 % de dimetilsulfóxido em 0,5 M de sacarose. Na desvitrificação os folículos foram transferidos para uma solução de sacarose a 0,25 M, e em seguida para uma solução de sacarose a 0,15 M. Os folículos pré-antrais foram classificados em não viáveis ou viáveis quando foram corados ou não com o azul de tripan, respectivamente. O G1 (261/280; 93,2 %) apresentou diferenças significativas com G2 e G3 ($p < 0,05$) e o G2 (141/221; 63,8 %) apresentou diferença ($p < 0,05$) com o G3 (76/300; 25,3 %). Os resultados obtidos indicam que o suporte plástico utilizado não foi eficiente na preservação de folículos pré-antrais bovinos no processo de vitrificação.

Palavras-Chave: Vitrificação, folículos pré-antrais, ovário, bovinos.

ABSTRACT - This study aimed to verify the viability of pre-antral follicles after vitrification in plastic straw. The ovaries were collected in a slaughterhouse and transported to the laboratory where they were isolated. The liquid containing the isolated follicles were divided into three groups: control group (G1), analyzed immediately, without vitrification, group toxicity (G2), only exposed to the cryoprotectants; group vitrified (G3), filled in plastic straws (0.25 mL) and immersed in liquid nitrogen. The cryoprotectants used to test for toxicity and the vitrification was a solution composed of ethylene glycol by 20 % and 20 % of dimethylsulfoxide in 0.5 M sucrose. In devitrification follicles were transferred to a solution of sucrose at 0.25 M, and then to a solution of sucrose at 0.15 M. The preantral follicles were classified as nonviable/viable when they were stained/not stained with trypan blue, respectively. The G1 (261/280, 93.2 %) showed significant differences with G2 and G3 ($p < 0.05$) and the G2 (141/221; 66,3 %) showed difference ($p < 0.05$) with the G3 (76/300, 25.3 %). The results indicate that support the plastic used was not efficient in preservation of pre-antral follicles cattle in the process of vitrification.

Keywords: Vitrification, pre-antral follicles, ovarie, cattle.

INTRODUÇÃO

A criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais tem sido realizada em diferentes espécies, como bovinos (Celestino et al., 2007), humanos (Oktay et al, 1998), caprinos (Rodrigues, 2004), ovinos (Lucci et al, 2004), ratos (Carrol et al, 1990), camundongos (Choi et al., 2007) e felinos (Lima et al, 2006). Esta tecnologia apresenta-se como uma ferramenta de grande interesse e aplicabilidade em programas de

melhoramento genético animal ou conservação de espécies ameaçadas de extinção (Holt, 1997).

A vitrificação, entre outros métodos de criopreservação, é um procedimento simples, rápido e de baixo custo, entretanto, expõe os gametas a altas concentrações de crioprotetores que podem levar a lesões nas células por choques osmóticos ou efeitos tóxicos (Galninski et al., 2003). Diferentes técnicas de vitrificação tem sido desenvolvidas, como:

* Autor para correspondência. E-mail: hluna@ceua.ufms.br.

microgotas (Landa e Tepla, 1990); *cryoloop* (Lane et al., 1999); *OPS - Open Pulled Straw* (Vajta et al., 1997); grades de microscopia eletrônica (MARTINO et al., 1996); *solid-surface vitrification* (Begin et al., 2003); nylon mesh (Matsumoto et al., 2001) e capilares de vidro (Mezzalira et al., 1999; Hochi et al., 2001).

Neste sentido, muitos estudos são desenvolvidos na tentativa de se obter melhores resultados após desvitrificação de gametas femininos, sendo uma das formas a escolha adequada de materiais de suporte para envase das estruturas vitrificadas (Bunn, 2007). O objetivo do presente estudo foi verificar o efeito da vitrificação com uso de suporte plástico na viabilidade de folículos pré-antrais bovinos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os ovários foram coletados em abatedouro e transportados até o laboratório em bolsas plásticas à temperatura ambiente contendo solução salina de NaCl a 0,9 %. Os ovários foram lavados em álcool a 70 % por 10 segundos e em seguida em solução salina.

Para o isolamento, os ovários foram fragmentados com uso do mixer (Nuttinck et al., 1993). Após a fragmentação, o conteúdo obtido foi ressuscitado em solução de NaCl a 0,9 % e então filtrada em membranas de nylon com poros de 300 µm e 100 µm, respectivamente. O filtrado foi dividido em duas partes, uma parte destinada ao controle, que foi imediatamente submetido ao teste de viabilidade, e a outra destinada à vitrificação ou ao teste de toxicidade.

O conteúdo obtido com isolamento dos folículos pré-antrais foi centrifugado por aproximadamente 2 minutos, após este procedimento o sobrenadante foi retirado para que restasse apenas um concentrado de folículos. Este conteúdo foi então exposto à solução crioprotetora composta de 20 % de etilenoglicol e 20 % de DMSO a 0,5 M de sacarose, por 1 minuto e envasados em palhetas de plástico (0,25 mL), as quais foram imediatamente imersas em nitrogênio líquido sem fechamento das extremidades ou seja de forma aberta, onde ficaram estocadas por um período mínimo 24 horas. Para teste de toxicidade, os folículos foram expostos à solução crioprotetora e em seguida centrifugado por 3 minutos, para a remoção do crioprotetor e respectiva lavagem dos folículos. Este procedimento de lavagem foi repetido por duas vezes.

Na desvitrificação, os folículos foram transferidos para uma solução de sacarose a 0,25 M, onde permaneceram por 2 minutos e, em seguida, transferidos para uma solução de sacarose a 0,15 M por mais 2 minutos.

Para o teste de viabilidade, foi utilizado o corante azul de trypan na concentração de 0,4%. As análises foram realizadas em microscópio óptico com aumento de 100x, onde foram considerados viáveis os folículos que permaneceram não corados e inviáveis os corados (Gupta et al., 2002).

Para comparações entre os grupos, foi realizado o teste ANOVA e Tukey. Foram considerados valores significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Realizou-se no presente estudo, o teste de toxicidade ou seja apenas exposto a solução crioprotetora e a vitrificação de folículos pré-antrais bovinos isolado em palhetas plásticas de 0,25 mL, diretamente imersas em nitrogênio líquido. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Viabilidade dos folículos pré-antrais no grupo 1 (controle), grupo 2 (exposto à solução crioprotetora) e no grupo 3 (vitrificados).

Grupos	Número de folículos analisados	Número de folículos viáveis(%)
Grupo 1	280	261 (93,2) ^{a*}
Grupo 2	221	141 (63,8) ^b
Grupo 3	300	76 (25,3) ^c

*^{a-c}Sobrescritos diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

O sucesso da vitrificação está ancorado em três fatores: viscosidade da solução de vitrificação, velocidade de resfriamento e reaquecimento e volume da amostra a ser vitrificada (Yavin & Arav, 2007). Diferentes formas de vitrificação de ovócitos tem sido propostas com objetivo de se alcançar protocolos eficientes (Landa & Tepla, 1990; Martino et al., 1996; Vajta et al., 1997; Mezzalira et al., 1999; Lane et al., 1999).

Segundo Bunn (2007) o emprego de nitrogênio líquido associado ao uso de materiais de maior condutividade térmica, proporciona aumento da velocidade de resfriamento, melhorando as condições para a obtenção da vitrificação e por

consequência aumentando a viabilidade de ovócitos após o reaquecimento.

No presente estudo realizou-se a vitrificação de folículos pré-antrais envasados em palhetas de plástico de 0,25 mL, suporte este que comporta grandes volumes de solução contendo grande quantidade de folículos pré-antrais quando comparada com outras técnicas como o método OPS (*Open Pulled Straw*) descrito por Vajta et al. (1997). Este maior volume poderia ser considerada uma vantagem na execução e armazenamento de material genético – uma vez reduzir o número de suportes de estoque no botijão de nitrogênio assim como tornar mais rápido e prático o procedimento de vitrificação. Entretanto, os dados obtidos no presente estudo indicam que o suporte plástico utilizado não foi adequado para preservação da viabilidade dos folículos bovinos, uma vez preservar apenas 25% de sua viabilidade. De acordo com Yavin & Arav (2007) este aumento de volume, diminui a probabilidade de ocorrer a vitrificação, aumentando os riscos de ocorrer cristalização, fenômeno este altamente deletério aos folículos criopreservados. Outro fator importante a ser citado, no presente estudo, foi a exposição imediata dos folículos à altas concentrações de crioprotetores, composta por 20 % de etilenoglicol e 20 % de dimetilsulfóxido acrescido de 0,5 M de sacarose, sem prévia exposição em soluções de menores concentrações (solução de equilíbrio), que segundo Liu et al. (2001) aumenta o potencial tóxico dos crioprotetores.

Além da forma de vitrificação, observou-se um efeito deletério dos crioprotetores, em função da exposição à altas concentrações, que têm características tóxicas. Diferentes alternativas foram propostas para reduzir os efeitos tóxicos. A associação de diferentes crioprotetores, associação com sacarose e redução do tempo de exposição à solução crioprotetora são algumas delas (Arav et al., 1993; Fahy, 1984; Rall, 1989; Rall, 1987; Dhali et al., 2000). O tempo de manipulação dos folículos pré-antrais após o isolamento, no presente trabalho foi de aproximadamente 3 minutos, tempo este que pode ter contribuído na redução da viabilidade dos folículos vitrificados. Neste sentido a redução do tempo de manipulação poderia diminuir os efeitos tóxicos.

Outro importante aspecto a ser discutido é o uso de meios ricos em proteínas, como o soro fetal bovino, no processo de vitrificação (Amorim et al., 2003). No presente estudo a solução usada na diluição dos crioprotetores foi composta de NaCl a 0,9 %, que apesar de reduzir significativamente o custo e apresentar facilidades em sua elaboração, pode

também ter influenciado na redução da viabilidade dos folículos.

CONCLUSÃO

Conclui-se que o protocolo usado com uso de suporte plástico com grandes volumes, afeta a viabilidade dos folículos pré-antrais bovinos. Aperfeiçoamentos da técnica de vitrificação devem ser implementadas em função do grande potencial desta biotecnologia na conservação de recursos genéticos animal.

AGRADECIMENTOS

À UFMS/PROPP e à FUNDECT pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- Amorim C.A., Rodrigues A.P.R., Rondina D., Figueiredo J.R., Gonçalves P.B.D., & Giogetti A. 2003. Cryopreservation of ovine primordial follicles using dimethyl sulfoxide. *Fertil. Steril.* 79:682-686.
- Arav A., Rubinsky B., Fletcher G. & Seren E. 1993. Cryogenic protection of oocytes with antifreeze proteins. *Mol. Reprod. Dev.* 36:488-493.
- Begin I., Bhatia B., Baldassarre H., Dinnyes A. & Keefer, C.L. 2003. Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2- to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods. *Theriogenology* 59:1839-1850.
- Bunn S., Bertolini M., Cruz F.B., Vieira A.D., Pedrazzi C., Cesaro M.P., Ribeiro E.S., Mezzalira J.C. & Mezzalira, A. 2006. Uso de distintos containers para obter alta taxa de resfriamento na vitrificação e oócitos bovinos imaturos. In: Reunião Anual da SBTE, 13, resumos, Araxá, MG, 2006.
- Bunn S. 2007. Velocidade de resfriamento como estratégia para reduzir a concentração de crioprotetores e aumentar a eficiência na vitrificação de oócitos bovinos imaturos. Dissertação de mestrado, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 102p.
- Carroll J, Whittingham D.G, Wood M.J., Telfer E. & Gosden R.G. 1990. Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. *J. Reprod. Fertil.* 90:321-327.
- Celestino J.J.H., Santos R.R., Lopes C.A.P., Martins F.S., Matos M.H.T., Melo M.A.P., Bão S.N., Rodrigues A.P.R., Silva J.R.V. & Figueiredo, J.R. 2008. Preservation of bovine preantral follicle viability and ultra-structure after cooling and freezing of ovarian tissue. *Anim. Reprod. Sc.* 108:309-318.
- Choi W.J., Yeo H.J., Lee S.A., Lee J.H. & PAIK W.Y. 2007. Effect of vitrification method on survivability, follicular growth and ovulation of preantral follicles in mice. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, 33:128-133.
- Dhali A., Manik R.S., Das S.K., Singla S.K. & Palta P. 2000.

- Vitrification of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. *Theriogenology* 53:1295-303.
- Fahy G.M., Mac Farlane D.R., Angell C.A., Meryman H.T. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21:407-426.
- Galbinski S., Bos-Mikich A. & Ferrari A.N. 2003. Viabilidade e Fertilização in vitro de oócitos bovinos após vitrificação. *RBGO* 25:553-559.
- Gupta P.S.P., Nandi S., Ravindranatha B.M. & Sarma P.V. 2002. In vitro culture of buffalo (*bubalus bubalis*) preantral follicles. *Theriogenology* 57:1839-1854.
- Hochi S., Akiyama M., Minagawa G., Kimura K. & Hanada A. 2001. Effects of cooling and warming rates during vitrification on fertilization of in vitro matured bovine oocytes. *Cryobiology* 42:69-73.
- Holt W.V. 1997. The roles of cryobiology and reproductive technology in the conservation of biodiversity. *Cryo-Letters* 40:47-55.
- Landa V. & Tepla O. 1990. Cryopreservation of mouse 8-cell embryos in microdops. *Folia Biol.* 36:153-158.
- Lane M., William B., Schoolcraft M.D. & Gardner D.K. 1999. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil. Steril.* 72:1073-1078.
- Lima A.K.F., Silva A.R., Santos R.R., Sales D.M., Evangelista A.F., Figueiredo J.R. & Silva L.D.M. 2006. Cryopreservation of preantral ovarian follicles in situ from domestic cats (*Felis catus*) using different cryoprotective agents. *Theriogenology* 66:1664-1666.
- Liu J., Van Der Elst J., Van Den Broecke R. & Dhont, M. 2001. Live offspring by in vitro fertilization of oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential in vivo transplantation and in vitro maturation. *Biol. Reprod.* 64:171-178.
- Lucci C.M., Kacinskis M., Lopes L.H.R., Rumpf R. & Báo S.N. 2004. Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. *Theriogenology* 61:1101-1114.
- Martino A., Songsasen N. & Leibo S.P. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol. Reprod.* 54:1059-1069.
- Matsumoto H., Jiang J.Y., Tanaka T., Sasada H. & Sato E. 2001. Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobiology* 42:139-144.
- Mezzalana A., Vieira A.D., Cruz F.B., Barbieri D.P. & Damiani J.C. 1999. Vitrificação de oócitos bovinos em micropipetas de vidro. *Arq. Fac. Vet. UFRGS* 27:262.
- Nuttinck F., Mermillod P., Massip A. & Dessy F. 1993. Characterization of in vitro growth of bovine preantral follicles: A preliminary study. *Theriogenology* 39:811-882.
- Oktay K., Newton H., Aubard Y., Salha O. & Gosden R.G. 1998. Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology. *Fertil. Steril.* 69:1-7.
- Rall W.F. 1987. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitritication. *Cryobiology* 24:387-402.
- Rall W.F. & Meyer T.K. 1989. Zona fracture damage and its avoidance during the cryopreservation of mammalian embryos. *Theriogenology* 31:683-692.
- Rodrigues A.R.P., Amorim C.A., Costa S.H.F., Matos M.H.T., Santos R.R., Lucci C.M., Báo S.N., Ohashi O.M. & Figueiredo J.R. 2004. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. *Theriogenology* 61:1009-1024.
- Vajta G., Booth P.J., Holm P., Greve T. & Callesen H. 1997. Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. *Cryo-Letters* 18:191-195.
- Yavin S. & Arav, A. 2007. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions *Theriogenology* 67:81-89.