

## EFEITOS DO TRATAMENTO COM INIBIDOR DA ROCK DURANTE O ESTÁGIO DE PÓS-AQUECIMENTO DE OÓCITOS BOVINOS VITRIFICADOS SOBRE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

MARIA EDUARDA BICCA DODE; MARIANA HÄRTER REMIÃO; TONY SILVEIRA; WILLIAM BORGES DOMINGUES; ELIZA ROSSI KOMNINOU; JOÃO CARLOS DESCHAMPS

<sup>1</sup>Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese Animal, Biotecnologia/Centro de Desenvolvimento Tecnológico, UFPel

[dudadode@hotmail.com](mailto:dudadode@hotmail.com); [deschamp@ufpel.edu.br](mailto:deschamp@ufpel.edu.br)

### 1. INTRODUÇÃO

A criopreservação é uma biotecnologia que visa reduzir drasticamente o metabolismo celular mantendo-o em estado de quiescência, e teoricamente tornando possível a conservação de células e tecidos por tempo indeterminado (STOREY & STOREY, 1990). De acordo com BAKHACH (2009) a biotecnologia de criopreservação é definida como a manutenção de tecidos em nitrogênio líquido a temperaturas ultrabaixas (de -150 à -196°C) que promove a paralização das funções celulares vitais, mantendo assim o tecido criopreservado por tempo indeterminado.

A vitrificação pode ser definida como o processo de solidificação de um líquido não pela cristalização, mas pela extrema elevação da viscosidade durante o processo de resfriamento (FAHY, 1986). Os protocolos de vitrificação são baseados na desidratação da estrutura a ser criopreservada, através da sua breve exposição a soluções com altas concentrações de crioprotetores, seguida da imersão direta em nitrogênio líquido. Devido a estas altas concentrações de crioprotetores e à rápida curva de congelamento, o sistema se solidifica sem que ocorra cristalização (MARTINO et al., 1996).

A aplicação desta técnica para conservação de oócitos de bovinos é relativamente nova e permite acelerar o processo de criopreservação do gameta feminino, que invariavelmente está associado a danos nas membranas celulares. Através do congelamento ultrarrápido da amostra acondicionada em solução crioprotetora, não há a formação de cristais de gelo que prejudicariam a integridade dos compartimentos celulares e a viabilidade do gameta (VAJTA & KUWAYAMA, 2006).

As altas concentrações de crioprotetores utilizadas na vitrificação, provocam despolimerização dos microtubulos, induzindo aumento transitório do nível intracelular de cálcio livre, à excitotoxicidade e ao endurecimento da zona pelúcida. Estes e outros fatores, fazem com que as taxas de apoptose em oócitos vitrificados e reaquecidos sejam mais elevadas do que as de embriões *a fresco*. A utilização do Y-27632, um inibidor seletivo de quinases de proteínas específicas associadas com Rho (Rho-associated coiled-coil kinase - ROCK) durante um curto período de cultivo após o aquecimento de oócitos tem sido associado ao aumento do potencial de desenvolvimento de oócitos bovinos vitrificados e aquecidos. (KOHAYA et al, 2011).

Uma vez que um dos principais desafios para a biotecnologia da reprodução tem sido desenvolver um método eficiente de criopreservação de oócitos produzidos *in vitro*, o objetivo deste estudo foi avaliar e comparar as taxas de

clivagem e desenvolvimento embrionário obtidas a partir da fertilização *in vitro* de grupos de oócitos vitrificados utilizando técnica de OPS seguida de recuperação sob tratamento da molécula inibidora da ROCK.

## 2. METODOLOGIA

Ovários provenientes de um abatedouro bovino localizado na cidade de Pelotas/RS, foram coletados e transportados em um recipiente térmico até o laboratório de Embriologia Molecular/UFPel. Os ovários foram lavados com solução salina a 0,9% aquecida e mantidos à 35°C. Os folículos de 2 a 8mm foram puncionados manualmente com a utilização de agulha e seringa e o fluido folicular obtido foi submetido a lavagens com PBS (tampão salino fosfato) e a posterior filtragem em filtro coletor de embriões (Nutricell, Campinas, Brasil). O conteúdo do filtro foi transferido para uma placa de petri, onde foram selecionados os oócitos considerados viáveis e que apresentavam mais de três camadas de células do cumulus ecitoplasma com aspecto homogêneo, sendo então transferidos para uma placa de maturação *in vitro* contendo meio MIV (In Vitro Brasil, São Paulo, Brasil) e mantidos por cerca de 20 horas em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub>, 38,5 °C e 90% de umidade.

Após este período, metade dos oócitos foi submetida à fertilização *in vitro* (FIV), sendo este o grupo fresco, enquanto a outra metade foi vitrificada, sendo este o grupo vitrificado. No grupo fresco, metade dos oócitos foi submetido ao inibidor da ROCK quinase (Y-27632) a 10 µM por 3 horas antes da FIV e a outra metade não. Da mesma forma, os oócitos vitrificados, após o reaquecimento, foram divididos em grupos que ficaram em contato com o Y-27632 por 3 horas e outros que não ficaram em contato com a droga antes da FIV. Desta forma foram constituídos 4 grupos experimentais: Vitrificados + Y-27632 e vitrificados (controle); e grupos Fresco + Y-27632 e Fresco (controle).

Para proceder a vitrificação os oócitos foram equilibrados por 5 minutos em meio de manutenção HM (TCM 199 com 20% de soro fetal bovino) e incubados por 1 min à 39°C em HM contendo 10% etilenoglicol (EG) e 10% DMSO (Dimetilsulfóxido), sendo então transferidos para uma solução de vitrificação composta por HM contendo 20% de EG, 20% DMSO e 1M de sacarose por 20 segundos e imediatamente envasados e mergulhados em nitrogênio líquido. O aquecimento dos oócitos foi realizado em meio de manutenção (HM) contendo 0,25M de sacarose, na qual os embriões permaneceram por 5 minutos e em HM contendo 0,15M de sacarose, por mais 5 minutos.

A FIV se deu com a lavagem dos oócitos, que foram colocados em grupos de 20 em placas com 100 µL de meio FIV (In Vitro Brasil, São Paulo, Brasil). Palhetas de sêmen foram descongeladas em banho-maria por 30 segundos à 35°C e centrifugadas por 5 min em meio TL sêmen e 5 min em meio FIV. O pellet de células formado foi retirado, e as células espermáticas foram analisadas em relação à motilidade e concentração. A concentração de espermatozoides foi ajustada para  $1 \times 10^5$  por gota. Os oócitos permaneceram em meio FIV com os espermatozoides por 18 a 22 horas. Passado este período, os presumíveis zigotos foram transferidos para gotas de 100 µL de meio SOF (*Synthetic Oviduct Fluid* – In Vitro Brasil, SP, Brasil), em grupos de 20-25, sendo mantidos em estufa a 38,5°C, com 90% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub> durante 9 dias. A taxa de clivagem foi verificada no terceiro dia após a FIV e as taxas de blastocistos verificadas no sétimo (D7) e nono dia (D9) de cultivo.

A análise das taxas de clivagem e as de produção de blastocistos em D7 e em D9 foram comparadas entre os grupos, através do teste de Fisher onde o grau

de significância estatística em todas as análises foi definida em nível de probabilidade de  $P < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da taxa de clivagem demonstrou que o grupo Controle fresco + Y-2763, submetido a um período curto de incubação com inibidor da ROCK antes da FIV, apresentou uma taxa superior de clivagem quando comparado aos demais grupos ( $p < 0,05$ ). A elevada taxa de clivagem observada, foi também acompanhada por um número maior de blastocistos produzidos no D7 neste grupo, quando comparado aos demais ( $p < 0,05$ ). O número de blastocistos encontrado em D7 permaneceu inalterado até o D9.

O resultado de taxa de clivagem no grupo Vitrificado + Y-2763 não diferiu do grupo Controle fresco. As taxas encontradas para estes dois grupos foram superiores às encontradas no grupo Controle vitrificado, que não recebeu o tratamento com o inibidor da ROCK antes da FIV ( $p < 0,05$ ). Os resultados de produção de blastocistos em D7 para este grupo demonstram que o número de blastocistos produzidos foi semelhante aos dos grupos Controle vitrificado e Controle fresco ( $p < 0,05$ ) e inferiores ao do grupo Controle fresco + Y-2763 ( $p < 0,05$ ). Entretanto, neste grupo houve um aumento do número de blastocistos no D9 em relação ao D7, sendo em D9, similares entre os grupos Vitrificado + Y-2763, Controle + Y-2763 e Controle fresco ( $p < 0,05$ ) e superiores ao do grupo Vitrificado ( $p < 0,05$ ).

Os resultados demonstraram ainda, que o desenvolvimento até o estágio de blastocisto foi mais rápido no grupo Fresco + Y-2763 do que nos demais grupos.. Este resultado é interessante uma vez que a clivagem rápida de embriões *in vitro* está geralmente associada de produção de embriões com qualidade superior (ISOM et al., 2012).

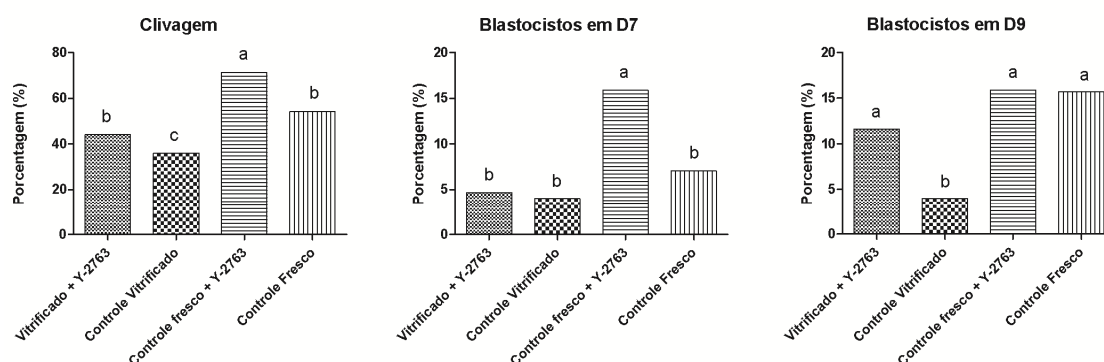


Figura 1 Dados de clivagem, blastocisto em D7 e blastocisto em D9 nos três tratamentos e no controle.

### 4. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi demonstrado que ócitos bovinos maturados e submetidos aos processos de vitrificação, aquecimento, e recuperação por curto período com inibidor da ROCK tiveram uma taxa mais elevada de sobrevivência e se desenvolveram até o estágio de blastocisto em maior número do que oócitos maturados e vitrificados que não foram submetidos à recuperação na presença do inibidor da ROCK.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKHACH, J. The cryopreservation of composite tissues: Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. **Organogenesis**, v. 5, p. 119-126, 2009.

FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. **Cryobiology**, v.23, p.1-13, 1986.

ISOM, SC;Rf, LI; KM, WHITWORTH; RS,PRATHER. Timing of first embryonic cleavage is a positive indicator of the in vitro developmental potential of porcine embryos derived from in vitro fertilization, somatic cell nuclear transfer and parthenogenesis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 79, p. 197-207, 2012.

KOHAYA, N.,FUJIWARA, K., ITO, J., KASHIWAZAKI, N. High developmental rates of mouse oocytes cryopreserved by an optimized vitrification protocol: the effects of cryoprotectants, calcium and cumulus cells. **J REPROD**, v. 57, p. 675–680, 2011.

MARTINO, A., SONGSASEN, N., LEIBO, S.P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biol. Reprod.**, v.54, p.1059-1069, 1996.

STOREY K.B., STOREY J.M. Frozen and Alive. **Sci. Am.**, December, p.62-67, 1990.

VAJTA G., KUWAYAMA M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**, v. 65, p. 236–244, 2006.