



## **IV ENCONTRO INTERNACIONAL DE BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE HUMANA E ANIMAL:**

AVANÇOS E TENDÊNCIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA SAÚDE HUMANA E ANIMAL

### **ANÁLISE DA CONFIGURAÇÃO DA CROMATINA E DAS PROJEÇÕES TRANSZONAIS (TZPs) EM OÓCITOS BOVINOS IMATUROS APÓS VITRIFICAÇÃO UTILIZANDO POLÍMEROS SINTÉTICOS OU PROTEÍNAS ANTICONGELANTES**

Gustavo Bezerra Nobre do Vale<sup>1</sup>, Éverton Pimentel Ferreira Lopes<sup>1</sup>, Lucy Vanessa Sulca Ñaupas<sup>1</sup>  
Kamila Gomes Cardoso<sup>1</sup>, Maria Bianca de Almeida Silva<sup>2</sup>, Vicente José de Figueiredo Freitas<sup>3</sup>,  
José Ricardo de Figueiredo<sup>1</sup>, Gildas Mbemya Tetaping<sup>1</sup>, Ana Paula Ribeiro Rodrigues<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Faculty of Veterinary Medicine, Laboratory of Manipulation of Oocytes and Preantral Follicles (LAMOFOPA), State University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil*

<sup>2</sup>*Graduando em Farmácia pela Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB), Redenção-CE;*

<sup>3</sup>*Faculty of Veterinary Medicine, Laboratory of Physiology and Reproduction Control (LFCR), State University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil*

*Gustavo.vale@aluno.uece.br*

#### **RESUMO**

A criopreservação de oócitos é uma importante ferramenta de auxílio para a preservação do material genético reprodutivo em animais e/ou humanos. Durante o processo de vitrificação pode ocorrer danos estruturais e no material genético dessas estruturas. No intuito de evitar esses possíveis inconvenientes, pesquisadores relataram o benefício da adição de macromoléculas que conferem proteção aos oócitos durante a vitrificação e aquecimento. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o status da cromatina e a integridade das projeções transzonais (TZPs) após vitrificação utilizando dois bloqueadores de gelo seguida de maturação *in vitro* de CCOs bovinos. Para isso, CCOs bovinos foram aspirados de folículos antrais (3-6 mm) e selecionados para vitrificação utilizando polímeros sintéticos (PS) ou proteínas anticongelantes (PAC III). Após vitrificação e aquecimento, os CCOs foram destinados à MIV por 24h. Nossos dados mostraram que a vitrificação utilizando PS apresentou maior porcentagem de oócitos em metáfase II (MII) em relação ao protocolo de vitrificação utilizando PAC III. Além disso, vale destacar que o protocolo PXZ aparentemente manteve melhor a integridade das TZPs em relação ao protocolo PAC III. Mediante ao exposto, o protocolo utilizando polímeros sintéticos (PXZ) parece ser mais eficaz para progressão da meiose, bem como, manter a integridade das TPZs em CCOs bovinos vitrificados.

**PALAVRAS-CHAVES:** Criopreservação; CCOs bovinos; Crioprotetores

#### **1. INTRODUÇÃO**

Nos últimos anos, a vitrificação surgiu como um método promissor para a criopreservação de oócitos, desempenhando um papel crucial nas tecnologias de reprodução assistida, tanto em mulheres quanto em espécies pecuárias (THARASANIT e THUWANUT, 2021). No entanto, as taxas de sucesso em termos de desenvolvimento, sobrevivência e competência oocitária têm sido geralmente

baixas, devido, em parte, aos danos causados pela vitrificação, incluindo a perturbação das junções comunicantes célula-célula ou projeções transzonais (TZP) entre o oócito e as células do cumulus (TRAPPHOFF et al., 2010). Esses danos podem ser atribuídos a diversos fatores, como as altas taxas de resfriamento e a escolha do tipo e concentração de agentes crioprotetores (AMORIM et al., 2011). Assim, uma ampla gama de metodologias tem sido explorada para atenuar esses danos. A incorporação de proteínas anticongelantes (PACs) na solução de vitrificação surgiu como uma estratégia notável para proteger a integridade morfológica dos oócitos, devido a sua capacidade de inibir a formação de gelo e estabilizar a membrana plasmática, destacando-se especialmente a PAC Tipo III (CHAVES et al., 2016). Outra classe de macromoléculas são os polímeros sintéticos, como a polivinilpirrolidona (PVP K-12), Supercool X-1000 e o Supercool Z-1000, que apresentam origem análogas as PACs. Tais polímeros desempenham um papel crucial na redução da concentração necessária de crioprotetor penetrante para a vitrificação, ao mesmo tempo em que melhoram a estabilidade do estado amorfo das soluções de vitrificação, com baixa toxicidade associada (WOWK et al., 2000). Dessa forma, a utilização de bloqueadores de gelo como os polímeros sintéticos e as proteínas anticongelantes durante a vitrificação de oócitos torna-se fundamental para observar os possíveis efeitos dessas substâncias a fim de evitar danos celulares e estabelecer protocolos de vitrificação adequados para essas estruturas.

## **2. OBJETIVO**

Avaliar a configuração da cromatina e a integridade das TZPs em oócitos bovinos imaturos após vitrificação utilizando dois bloqueadores de gelo (PXZ e PAC III).

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

Complexos Cúmulos-Oócitos (CCOs) foram puncionados, selecionados e distribuídos aleatoriamente em dois grupos: frescos e vitrificados. Uma parte dos CCOs foram imediatamente destinados a MIV por 24h (controle fresco), enquanto os CCOs destinados à vitrificação, foram submetidos a dois protocolos: (1) utilizando polímeros sintéticos (PS) ou (2) proteínas anticongelantes (PAC III). No protocolo de PS, os CCOs foram expostos a três diferentes soluções de equilíbrio (SE) que tem como meio de base (MB) o MEM-HEPES suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB) e 100 µM de ALA, sendo diferenciada pela adição de 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) na SE 1; 15% de DMSO e etilenoglicol (EG) na SE 2; e 30% de ambos os ACPs na SE 3, onde os CCOs permaneceram por 5, 3 e 2 minutos respectivamente, em temperatura ambiente (TA). Em seguida, os CCOs foram transferidos para a solução de vitrificação (SV) composta por 50% da SE adicionada de 10% de PS (5% de Polivinilpirrolidona – PVP, 2.5% de Supercool X-1000 e 2.5% de Supercool Z-1000) por 10 segundos. No protocolo utilizando PAC III, os CCOs foram expostos à SE composta por MEM-HEPES suplementado com 20% (v/v) de SFB, 7,5% de DMSO e 7,5% de

EG por 5 min. Em seguida, os CCOs foram expostos à SV composta por MEM-HEPES suplementado com 20% de SFB, 16% de DMSO, 16 % de EG, 100 µM de ALA e 1M de sacarose por 20 segundos. Foram adicionadas em ambas as soluções (SE e SV) 1000 ng/mL de PAC III. Em ambos os protocolos para a vitrificação propriamente dita, grupos de 5-10 CCOs foram transferidos para palhetas de 0,25 mL (MINITUBE BRASIL) e envasadas com SV e seladas com PVA. Em seguida, as palhetas foram expostas ao vapor de nitrogênio líquido (NL<sub>2</sub>) por 2 minutos e então mergulhadas diretamente no NL<sub>2</sub> sendo criostocadas por uma semana.

Após esse período, os CCOs foram aquecidos e maturados em Tissue Culture Medium (TCM-199) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), piruvato de sódio 0,2 mM, L-glutamina 2 mM, gentamicina 50 mg/ml, 10 UI/ml, gonadotrofina coriônica equina (eCG) e 10 UI/mL de gonadotrofina coriônica humana (hCG) por 24 horas. Ao final da MIV, a configuração da cromatina e a integridade das projeções tranzonais (TZPs) foram avaliados.

#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Para observar os impactos da vitrificação sobre a maturação oocitária, o status da cromatina foi avaliado quanto ao estágio de vesícula germinativa (VG), rompimento da vesícula germinativa (RVG), metáfase I (MI), metáfase (II) e degenerado (DEG). Após a MIV, todos os CCOs frescos ou vitrificados retomaram a meiose. Oócitos vitrificados utilizando proteínas anticongelantes (PAC III) apresentaram taxa de MI maior (34%) em relação a oócitos vitrificados utilizando polímeros sintéticos (PXZ) (22%) e o controle fresco (13%). A taxa de MII em oócitos vitrificados com o protocolo PXZ apresentaram maiores taxas de MII (38%) em relação ao protocolo PAC III (10%). Em relação a taxa de degeneração, oócitos vitrificados utilizando o protocolo PAC III apresentaram uma taxa maior (55%) em relação ao PXZ (40%) e controle fresco (5%). Nossos dados parecem promissores no que diz respeito ao uso dos polímeros sintéticos durante a vitrificação de oócitos bovinos imaturos, uma vez que houve maiores taxas de MII e menores taxas de degeneração. Por outro lado, a utilização de proteínas anticongelantes apresentou menores taxas de oócitos em MII e maiores taxas de degeneração em relação aos demais tratamentos. Neste contexto, nossos resultados estão em consonância com o de CHAVES et al., 2016, que demonstrou que a PAC III não preservou a organização do fuso meiótico em oócitos imaturos bovinos vitrificados.

Considerando que as TZPs desempenham um papel fundamental na troca de substâncias (lipídios, proteínas, RNA, EVs) entre células da granulosa e oócito (MARCHAIS et al., 2022). Portanto, verificar a integridade destas estruturas após vitrificação/aquecimento e posterior maturação in vitro é de suma importância para avaliar a qualidade oocitária. Nossas imagens mostraram que as TZPs estavam presentes e intactas em CCOs frescos e vitrificados (Fig. 2). No entanto, o protocolo de CCOs vitrificados utilizando PAC III parecem apresentar uma retração citoplasmática maior do que o protocolo PXZ, reduzindo a quantidade de TZPs em todo o oócito e impedindo a comunicação

bidirecional entre oócito-células do cumulus. Os componentes que formam as TZPs, são muito sensíveis às mudanças de temperatura e estresse, deste modo, sendo suscetíveis a danos causados durante o processo de criopreservação (VANHOUTTE et al., 2004). Dessa forma, nós consideramos que o protocolo utilizando as proteínas anticongelantes tipo III pode não ter sido eficiente em evitar danos a estas estruturas durante a criopreservação.

## 5. CONCLUSÕES

Diante do exposto, acreditamos que a vitrificação utilizando o protocolo PXZ pode ser mais eficiente do que o protocolo PAC III em relação as taxas de metáfase II e integridade das TZPs durante a vitrificação de CCOs bovinos imaturos.

## REFERÊNCIAS

Amorim CA, Curaba M, Van Langendonck A, Dolmans MM, Donnez J, Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue, **Reprod. Biomed.** Online 2 (2011) 160–186.

Chaves DF, Campelo IS, Silva MMAS, Bhat MH, Teixeira DIA, Melo LM, Souza-Fabjan JMG, Mermillod P, Freitas VJF. The use of antifreeze protein type III for vitrification of in vitro matured bovine oocytes. **Cryobiology.** Dec;73(3):324-328, 2016.

Marchais, Mathilde et al. Mammalian cumulus-oocyte complex communication: a dialog through long and short distance messaging. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 39, n. 5, p. 1011-1025, 2022.

Tharasanit T, Thuwanut P. Oocyte Cryopreservation in Domestic Animals and Humans: Principles, Techniques and Updated Outcomes. **Animals (Basel)**. Oct 13;11(10):2949, 2021.

Trapphoff T, El Hajj N, Zechner U, Haaf T, Eichenlaub-Ritter U. DNA integrity, growth pattern, spindle formation, chromosomal constitution and imprinting patterns of mouse oocytes from vitrified pre-antral follicles. **Human Reproduction.** 25:3025–3042, 2010.

Vanhoutte, Leen; Cortvrindt, Rita; Nogueira, Daniela; Smitz, Johan. Effects of chilling on structural aspects of early preantral mouse follicles. **Biology of reproduction**, v. 70, n. 4, p. 1041-1048, 2004.

Wowk B, Leitl E, Rasch CM, Mesbah-Karimi N, Harris SB, Fahy GM. Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. **Cryobiology.**40:228–236,2000.