APERFEIÇOAMENTO DE UM PROTOCOLO DE CRIOPRESERVAÇÃO DE FOLÍCULOS OVARIANOS CAPRINOS ISOLADOS VISANDO UM MELHOR DESENVOLVIMENTO IN VITRO

Ruth Shely De Castro Queirós Pelúcio[1]
Ana Paula Ribeiro Rodrigues[2]
José Ricardo De Figueredo4 [3]
Éverton Pimentel Ferreira Lopes[4]
Rebeca Magalhães Pedrosa Rocha[5]

RESUMO

A criopreservação de folículos ovarianos tem como objetivo preservar a fertilidade feminina. Entretanto, há ainda muitas variáveis que necessitam de investigações mais aprofundadas. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a eficiência de dois protocolos de vitrificação para foliculos secundários e antrais iniciais isolados do córtex ovariano caprino, sendo eles, protocolo I (Dimetilsulfóxido + Etilenoglicol + Polimeros sintéticos) vs protocolo II (Dimetilsulfóxido + Etilenoglicol + Proteínas anticongelantes tipo III). Após a vitrificação, os folículos foram cultivados por 6 dias a uma temperatura de 38,5ºC em 7,5% de CO2. Após esse período, os folículos foram avaliados quanto a morfologia, formação do antro (secundário) e viabilidade. Quanto aos resultados de morfologia e formação de antro de folículos secundários, não houve diferença significativa entre os tratamentos e em comparação dos mesmos com o grupo controle. Quanto à viabilidade folicular, independentemente da categoria folicular, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. De acordo com os resultados, concluímos que os folículos secundários isolados do cortex ovário e criopreservados podem se desenvolver in vitro por um curto período.

Palavras-chave: Criopreservação; Cultivo in vitro; foliculos ovarianos.

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências da Saúde, Discente, ruthshely@aluno.unilab.edu.br[1]
Universidade Estadual do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Docente, anapaula.ribeirorodrigues@gmail.com[2]
Universidade Estadual do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Docente, figueiredo.lamofopa@gmail.com[3]
Universidade Estadual do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Discente, evertton_pimentel@hotmail.com[4]
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências da Saúde, Docente, rebecarocha@unilab.edu.br[5]

ISSN: 2447-6161

INTRODUÇÃO

A criopreservação visa a conservação de materiais biológicos em baixas temperaturas, -196°C (nitrogênio líquido) ou -150°C (vapor de nitrogênio líquido), por tempo indeterminado. Dois métodos podem ser utilizados para criopreservar as estruturas ovarianas, a congelação lenta e a vitrificação. Na congelação lenta, o material biológico é submetido a baixas concentrações de crioprotetores e a um decréscimo gradual da temperatura para o congelamento (KIM et al., 2011). Já na vitrificação, a concentração de crioprotetores é alta e o congelamento não é feito de forma gradual, fazendo com que a solução, na qual está contida o material biológico, passa do estado sólido para um estado vítreo, um estado amorfo (FULLER et al., 2004).
Os agentes crioprotetores (ACPs) são substâncias químicas orgânicas que são adicionadas às soluções de vitrificação ou de congelação lenta para redução dos efeitos danosos causados por baixas temperaturas (SANTOS et al., 2008). Os ACPs de baixo peso molecular são permeáveis, denominados de intracelulares, e adentrando a célula, substituem o conteúdo de água intracelular, aumentando assim a viscosidade e reduzindo o ponto de congelamento do meio. Já os de alto peso molecular não são permeáveis, sendo assim denominados de crioprotetores extracelulares, e estes atuam aumentando a osmolaridade do meio extracelular, o qual tem efeito direto sobre a saída de água e formação de gelo no ambiente intracelular (AGUIAR et al., 2012).

METODOLOGIA

Um total de 72 ovários foram fragmentados com auxílio de uma lâmina de bisturi para obtenção de fragmentos de 1-2 mm de espessura. Posteriormente, os folículos secundários (SEC- 250 µm de diâmetro) e antrais iniciais (AI- 350 µm de diâmetro) presentes nos fragmentos de córtex ovariano foram selecionados, considerando a morfologia e o diâmetro e então microdissecados com auxílio de agulhas de insulina (26 G) sob um estereomicroscópio Os folículos SEC e folículos AI foram imediatamente cultivados in vitro por 6 dias, enquanto os demais folículos foram vitrificados e armazenados em nitrogênio líquido por 7 dias.
Após a microdissecção, os folículos SEC e AI (n=36 e 41), respectivamente, foram imediatamente cultivados in vitro por 6 dias, enquanto os demais folículos (SEC=129 e AI=139), foram aleatoriamente distribuídos nos demais tratamentos. Os folículos destinados à vitrificação, imediatamente após o procedimento, foram armazenados em nitrogênio líquido por 7 dias. Após aquecimento, estes também foram cultivados in vitro por igual período.
Folículos SEC e AI frescos ou vitrificados/aquecidos foram cultivados individualmente em gotas de 250 µL de meio de cultivo em placas de 96 poços (Corning Incorporated, Corning, EUA).
O meio de cultivo para os folículos SEC foi constituído de α-MEM (Sigma - M5650, pH 7,2 - 7,4) suplementado com 3 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), 10 µg/mL de insulina recombinante humana, 5,5 µg/mL de transferrina, 5 ng/mL de selênio, 2 mM de glutamina 2 mM de hipoxantina, 0,911 mMol/L de piruvato na ausência ou presença de ALA 100 µM (FERREIRA et al., 2018, modificado). Já os folículos AI foram cultivados em α-MEM (Sigma – 5650, pH 7,2 - 7,4) suplementado com 3 mg/mL de BSA, 5,5 µg/mL de transferrina, 5 ng/mL de selênio, 2 mM de glutamina, 2 mM de hipoxantina, 10 ng/mL de insulina, 0,911 mMol/L de piruvato, 50 ng/mL de hormônio do crescimento bovino, na ausência ou presença de ALA 100 µM (Cadenas et al., 2017, modificado).
Para ambas as categorias foliculares, o cultivo in vitro foi realizado sob condições de 38,5 °C em 7,5% de CO2 por 6 dias. Meio fresco foi preparado e pré-equilibrado por pelo menos 4 h antes do uso, com 150 µL de meio sendo substituído em cada gota a cada 2 dias. O experimento foi replicado seis vezes, e

ISSN: 2447-6161

aproximadamente 80 folículos foram utilizados por tratamento.

Os folículos (SEC e AI) frescos ou vitrificados foram classificados como normais (membrana basal íntegra e sem extrusão do oócito, células da granulosa brilhantes e homogêneas e citoplasma do oócito homogêneo) ou degenerados (membrana basal rompida, oócito e células da granulosa enegrecidas associados ao diâmetro folicular reduzido, ao final do cultivo).

Para a avaliação do crescimento, o diâmetro folicular foi mensurado com o auxílio de uma ocular micrométrica acoplada ao estereomicroscópio nos dias 0 e 6 de cultivo. A formação do antro será definida pela presença de uma cavidade translúcida visível entre as camadas das células da granulosa somente nos folículos secundários. Foi realizada a análise no 6º dia de cultivo para avaliar a viabilidade folicular, onde foi utilizado o azul de Trypan em uma diluição a 0,4%. Os folículos viáveis não foram corados de azul, enquanto os não viáveis foram corados com a cor azul (GOMES et al., 2021)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação à morfologia de folículos SEC normais, foi possível observar que não houve diferença significativa entre nenhum dos tratamentos e quando comparados ao grupo controle. No entanto, o T1 SEC-PXZ apresentou uma diminuição numérica da porcentagem de folículos morfologicamente normais, comparado aos demais tratamentos. Com relação aos folículos AI, somente o tratamento T3 AI-IBP1K (1000 ng/mL), diferiu dos demais tratamentos, mantendo uma taxa de folículos morfologicamente normais superior.

Com relação ao crescimento folicular, no dia 1 de cultivo in vitro (CIV), os resultados obtidos em todos os tratamentos na categoria SEC não diferiram do grupo controle. No entanto, com relação aos dias de CIV, observou-se uma diminuição de diâmetro no SEC-IBP, após 6 dias de CIV. No que diz respeito aos folículos AI, observou-se que, no dia 1 de CIV, todos os tratamentos vitrificados diferiram do grupo controle. Além disso, os tratamentos AI-IBP e AI-IBP1K (1000 ng/mL) foram semelhantes, do mesmo modo que AI-PXZ e AI-IBP100K (100.000 ng/mL). Após 6 dias de cultivo, os tratamentos AI-IBP, AI- IBP1K (1000 ng/mL) e AI–IBP100K (100.000 ng/mL) diferiram do grupo controle, mas não diferiram entre si. Adicionalmente, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos AI-PXZ, AI- IBP1K (1000 ng/mL) e AI-IBP100K (100.000 ng/mL).

Embora o resultado dos polímeros sintéticos tenha sido diferente dos demais tratamentos, nos quais utilizou-se proteínas anticongelantes, é possível notar que este não diferiu do grupo controle, portanto, a vitrificação utilizando os polímeros sintéticos pode ser considerada eficaz para evitar a formação de cristais de gelo intracelular (GOMES et al., 2021; LOPES et al., 2020). Foi, ainda, observado que as proteínas anticongelantes mantiveram a morfologia folicular normal após 6 dias de CIV. A partir de um fenômeno chamado de histerese térmica, estas proteínas inibem a recristalização do gelo (SHAHSAVARI et al., 2019), o que é considerado de grande importância para a criopreservação de material biológico (LEE et al., 2015).

Quanto aos resultados acerca da taxa de crescimento folicular (TCF), foi observado que folículos secundários dos tratamentos SEC- PXZ, SEC-IBP e SEC-IBP1K (1000 ng/mL) não diferiram entre si, o mesmo ocorreu com os tratamentos SEC-IBP, SEC–IBP1K (1000 ng/mL) e SEC–IBP100K (100.000 ng/mL). Nos folículos AI todos os tratamentos vitrificados diferiram do grupo controle, ao apresentarem uma redução no diâmetro folicular. Além disso, observou-se uma semelhança entre os tratamentos AI-PXZ, AI-IBP1K (1000 ng/mL) e AI-IBP100K (100.000 ng/mL).

Com relação aos folículos degenerados, os dados estatísticos mostraram que não houve diferenças significativas entre os tratamentos e em comparação aos controles, demostrando que o desenvolvimento de protocolos de vitrificação estão sendo bem-sucedidos. Este fato é considerado um resultado positivo, pois a

ISSN: 2447-6161

vitrificação é um importante agente estressor podendo levar à degeneração folicular (SILVA et al., 2018).
No tocante aos resultados do diâmetro folicular, somente o grupo controle e os folículos pré-antrais vitrificados na presença de polímeros sintéticos apresentaram crescimento positivo.
Com relação aos resultados acerca da viabilidade folicular, utilizando o corante azul de trypan, foi possível observar que não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos.

CONCLUSÕES

A vitrificação utilizando os polímeros sintéticos pode ser considerada eficaz para evitar a formação de cristais de gelo. Independentemente da categoria folicular, foi observado que as proteínas anticongelantes mantiveram a morfologia folicular normal após 6 dias de CIV.

AGRADECIMENTOS

Quero agradescer primeiramente a Deus, em seguida quero agradescer a UNILAB por me proporcionar esse momento único de aprendizado, pela conquista em estudar em uma universidade pública federal de tamanha importância, quero agradescer também a UECE, em especial ao LAMOFOPA que foi onde a pesquisa e os estudos acontteceram, quero agradecer a BICT/FUNCAP por ter sido o meu suporte financeiro, agradecer a Professora Rebeca Magalhães pela oportunidade e a confiança na minha capacidade para concluir esse projeto, a professora Juliana Jales que me acompanhou por boa parte dessa pesquisa, agradecer em especial os alunos do 7º semestre de Farmácia da Unilab Bianca e Alesandro que foram os meu pilares, foram de extrema importância e sempre estiveram a disposição, agradecer ao Éverton Pimentel, agradecer a minha mãe, Syrlyane Queirós que também ja foi aluna da UNILAB e que sempre esteve ao meu lado, dando apoio, insentivo e direcionamento. Muito obrigada!

REFERÊNCIAS

AGUIAR, T. D. F; TEIXEIRA, M. F. S; TELES, C.H. A; MARTINS, G. M. R; JÚNIOR, R. Q. B; COSTA, E. C. Princípios básicos da criomicrobiologia: enfoque nos tipos de microorganismos e nos principais agentes crioprotetores. Acta Veterinaria Brasilica, [S.l], v.6, n.2, p.80-93, 2012.

BORDES, A.; LORNAGE, J.; DEMIRCI, B.; FRANCK, M.; GUERIN JF.; SALLE, B. Normal gestations and live births after orthotopic autograft of vitrified- warmed hemi-ovaries into ewes. Hum Reprod, v. 10, p. 2745-2748, 2005.

FULLER, B. J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. Cryo Letters, [S.l], v.25, n.6, p.375-388, 2004.

GOMES, F.D.R., de Brito, D.C.C., de Sá, N.A.R. et al. Development of sheep secondary follicles and preservation of aromatase and metalloproteinases 2 and 9 after vitrification and in vitro culture. Cell Tissue Bank 23, 247–259 (2021).

LOPES, E. P. F; RODRIGUES, G. Q; DE BRITO, D. C. C; ROCHA, R. M. P; FERREIRA, A. C. A; DE SÁ, N. A. R; ZELINSKI, M. Vitrification of caprine secondary and early antral follicles as a perspective to preserve fertility function. Reproductive Biology, [S.l.], 2020.

SANTOS, R. R; CELESTINO, J. J. H; LOPES, C. A. P; MELO, M. A. P; RODRIGUES, A. P. R; FIGUEIREDO, J. R.

Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. Revista Brasileira de Reproduçao Animal, [S.l.], v.32, n.1, p.9–15, 2008.

SHEIKHI, M; HULTENBY, K; NIKLASSON, B; LUNDQVIST, M; HOVATTA, O. Clinical grade vitrification of human ovarian tissue: an ultrastructural analysis of follicles and stroma in vitrified tissue. Human Reproduction, [S.l.], v.26, n.3, p.594-603, 2011.

KIM, G. A; KIM, H. Y; KIM, H. Y; LEE, G; LEE, E; AHN, J. Y; PARK, J. H; LIM, J. M. Effectiveness of slow freezing and vitrification for long-term preservation of mouse ovarian tissue. Theriogenology, [S.l.], v.75, n.6, p.1045-1051, 2011.

FERREIRA, A.C. C.; CADENAS, J.; SÁ, N. A. R.; CORREIA, H. H. V.; GUERREIRO, D. D.; LOBO, C. H.; et al. In vitro culture of isolated preantral and antral follicles of goats using human recombinant FSH: Concentration dependent and stage-specific effect. Ani Reprod Sci, v. 196, p. 120-129, 2018.

CHAVES, D. F.; CAMPELO, I. S.; SILVA, M. M. A. S.; BHAT, M. H.; TEIXEIRA, D. I. A.; MELO, L. M.; SOUZA-FABJAN, J. M. G.; MERMILLOD, P.; FREITAS, V. J. F . The use of antifreeze protein type III for vitrification of in vitro matured bovine oocytes. Cryobiology (Print) , v. 73, p. 324-328, 2016.

LEE, J.; KIM, E. J.; KONG, H. S.; YOUM, H. W.; KIM, S. K.; LEE, J. R.; KIM, S. H. Establishment of an improved vitrification protocol by combinations of vitrification medium for isolated mouse ovarian follicles. Theriogenology, v. 121, p. 97-103, 2018.

SILVA, L. M; MBEMYA, G. T; GUERREIRO, D. D; BRITO, D. C. C; DONFACK , N. J; MORAIS, M. L. G. S; RODRIGUES, G. Q; BRUNO, J. B; ROCHA, R. M. P; ALVES, B. G;APGAR, G. A; CIBIN, F. W. S; FIGUEIREDO, J. R; RODRIGUES A. P. R. Effect of Catalase or Alpha Lipoic Acid Supplementation in the Vitrification Solution of Ovine Ovarian Tissue. Biopreserv Biobank, [S.l.], v.16, n.4, p.258-269, 2018.

ISSN: 2447-6161