

CONSERVAÇÃO DA FERTILIDADE FEMININA: DESENVOLVIMENTO IN VITRO DE FOLÍCULOS OVARIANOS CAPRINOS APÓS A VITRIFICAÇÃO

Maria Bianca De Almeida Silva¹
José Ricardo De Figueiredo²
Éverton Pimentel Ferreira Lopes³
Ana Paula Ribeiro Rodrigues⁴
Rebeca Magalhães Pedrosa Rocha⁵

RESUMO

A criopreservação de tecido ovariano contribui para a conservação de milhares de folículos destinados às técnicas de reprodução humana e animal. Entretanto, o sucesso do desenvolvimento desses folículos pós-criopreservação ainda é bastante variável e controverso. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da adição de novos polímeros sintéticos na solução de vitrificação sobre o desenvolvimento folicular após cultivo in vitro de folículos ovarianos secundários (F.SEC) e antrais iniciais (F.AI) caprinos. Para isso, os F.SEC e F.AI foram isolados e distribuídos, aleatoriamente, em dois grupos experimentais (não-vitrificado e vitrificado), sendo posteriormente cultivados in vitro por seis dias. Os dados revelaram que a taxa de crescimento dos F.SEC vitrificados foi maior do que a dos F.AI vitrificados. O teste de viabilidade por calceína e etídio mostrou que a porcentagem de F.SEC viáveis (frescos ou vitrificados) foi maior do que a porcentagem de F.AI viáveis, enquanto a análise de viabilidade por azul de trypan mostrou que a porcentagem de F.SEC vitrificados viáveis foi maior do que a de F.AI vitrificados viáveis. A integridade das junções transzonais (TZPs) em F.AI vitrificados apresentaram sinais de perda. A imunohistoquímica para a aromatase indicou a presença dessa enzima tanto em células da granulosa quanto em oócitos de folículos SEC e AI frescos e vitrificados. Concluiu-se que os F.SEC parecem ser mais resistentes à vitrificação do que os F.AI.

Palavras-chave: vitrificação; folículo pré-antral; folículo antral; biotecnologia.

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências da Saúde-ICS, Discente,
bianca.almeida1529@gmail.com¹

Universidade Estadual do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Docente, figueiredo.lamofopa@gmail.com²

Universidade Estadual do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Discente, everton_pimentel@hotmail.com³

Universidade Estadual do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Docente,

anapaula.ribeirorodrigues@gmail.com⁴

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências da Saúde-ICS, Docente,
rebecarocha@unilab.edu.br⁵

INTRODUÇÃO

A criopreservação de tecido ovariano é uma técnica comumente utilizada para a preservação de gametas, assegurando tanto a conservação de espécies animais, como possibilitando a recuperação da fertilidade em humanos (BEDAIWY; FALCONE, 2004). São descritos na literatura dois procedimentos relacionados à biotécnica de criopreservação: a congelação lenta (AMORIM et al., 2012) e a vitrificação (LORNAGE et al., 2006).

Alguns estudos relatam que a congelação lenta pode ser mais eficiente devido à baixa concentração de agentes crioprotetores (ACPs - ISACHENKO et al., 2009; RAHIMI et al., 2009; GOSDEN et al., 2010), porém, induz a formação de cristais de gelo, um dos principais danos celulares após a criopreservação (SILBER et al., 2010). Já a vitrificação, por outro lado, reduz ao máximo a formação de cristais de gelo, devido à redução drástica da temperatura e ao uso de elevadas concentrações de ACPs (SILBER et al., 2010). De qualquer forma, independentemente da técnica utilizada, para evitar uma possível toxicidade celular, é necessária a combinação de dois ou mais crioprotetores permeáveis ou impermeáveis, reduzindo o efeito tóxico individual e mantendo o efeito geral. Portanto, o critério de escolha e a concentração dos ACPs na solução de criopreservação é fundamental para o sucesso da técnica.

Nesse sentido, polímeros sintéticos, como o acetato denominado de Supercool X-1000 e o copolímero de poliglicerol (PGL), denominado de Supercool Z-1000 e a polivinilpirrolidona 25 (PVP-K12) vem ganhando bastante destaque, uma vez que já foram aplicados com sucesso durante a vitrificação de tecido ovariano e folículos pré-antrais isolados (TING et al., 2012 e 2013). Essas moléculas são análogos sintéticos das proteínas de ligação ao gelo (ice-binding protein-IBP), encontradas em seres vivos que habitam regiões de baixas temperaturas (TING et al., 2012), as quais aumentam a viscosidade das soluções crioprotetoras e reduzem a formação de cristais de gelo (FULLER et al., 2004). Ting et al. (2012 e 2013) relataram que folículos secundários de macacas vitrificados na presença dos polímeros supracitados foram capazes de sobreviver e crescer após um longo período de cultivo in vitro (6 semanas) e mantiveram os níveis de produção de esteróides. Apesar dos resultados positivos, ainda não existem relatos da adição dessas substâncias na solução de vitrificação de folículos isolados caprinos. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da adição de novos polímeros sintéticos na vitrificação e posterior cultivo in vitro de folículos ovarianos secundários (F.SEC) e antrais iniciais (F.AI) caprinos.

METODOLOGIA

Ovários (n=80) de 40 cabras mestiças de 1-3 anos de idade foram submetidos ao isolamento de F.SEC e F.AI, sendo posteriormente cultivados in vitro por 6 dias ou vitrificados e estocados em nitrogênio líquido por 7 dias. Após o período de crioestocagem, os folículos foram aquecidos e imediatamente cultivados in vitro por 6 dias.

No processo de vitrificação, F.SEC e F.AI foram sucessivamente expostos aos crioprotetores intracelulares em três diferentes soluções de equilíbrio (ES), apresentando uma base comum constituída por MEM-HEPES, 15% de soro fetal bovino (SFB), 1 µl/ml de ácido ascórbico, adicionada de crioprotetores intracelulares: a) 5% de glicerol (ES1); b) 15% de glicerol e 15% de etilenoglicol (ES2) ou c) 30% de ambos crioprotetores intracelulares (ES3). A exposição dos folículos às soluções de equilíbrio foi realizada à temperatura ambiente por 5, 3 e 2 minutos, à ES1, ES2 e ES3, respectivamente. Após a última exposição, os folículos foram transferidos para a solução de vitrificação (VS) composta por 50% da ES3 adicionada de crioprotetores extracelulares, ou seja, polímeros sintéticos (20% de Supercool X-1000, 40% de Supercool Z-1000 e 20% de

Polivinilpirrolidona - PVP). Em seguida, as palhetas foram expostas ao vapor de nitrogênio líquido (LN2) por 2 minutos e então mergulhadas diretamente no LN2 e estocadas até o momento do aquecimento à temperatura ambiente por 5 segundos, sendo posteriormente imersas em banho-maria a 45 °C por 30 segundos para a descongelação total da VS. Os folículos foram recuperados das palhetas e submetidos à remoção dos crioprotetores, utilizando quatro lavagens sucessivas de 3 min cada, em diferentes soluções de lavagem compostas por MEM-HEPES adicionado de concentrações decrescentes de sacarose (1M, 0,75M, 0,5M e 0,25 M). Posteriormente, os folículos foram ainda submetidos a duas lavagens de 5 minutos em MEM-HEPES com 15% de SFB.

Folículos SEC e AI frescos ou vitrificados/aquecidos também foram cultivados individualmente, em microplacas de 96 poços de ultra-baixa-aderência e placas de petri de 60 x 15 mm, respectivamente, em α -MEM suplementado com 3 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), 10 μ g/mL de insulina recombinante humana, 5,5 μ g/mL de transferrina, 5 ng/mL de selênio, 2 mM de glutamina, 2 mM de hipoxantina e 50 μ g/mL de ácido ascórbico, ou ainda deste adicionado de 10 ng/mL de insulina e 50 ng/mL de hormônio do crescimento bovino somente para F.AI. 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 e a troca de meio foi realizada de maneira parcial a cada 2 dias.

No decorrer do cultivo, foram avaliados os seguintes parâmetros: aparência morfológica e desenvolvimento (formação de antro e crescimento folicular). Ao final do período de cultivo, folículos frescos ou vitrificados foram distribuídos aleatoriamente para ensaio de viabilidade por fluorescência, corando o citoplasma em verde com 4 μ M de calceína-AM quando viáveis e corando a cromatina de vermelho com 2 μ M de homodímero de etídio-1 quando não viáveis, ou por coloração vital, corando os folículos não viáveis com azul de trypan.

No tocante à análise das junções transzonais, os folículos foram incubados por 2 horas à temperatura ambiente com anticorpo Alexa 488 Phalloidina e examinados por microscopia confocal de varredura a laser. Para avaliação da aromatase, os folículos foram incubados por 30 minutos com anticorpo policlonal de coelho anti-aromatase e, em seguida, com anticorpo secundário IgG anti-coelho, seguido de incubação no complexo avidina-biotina, que interage com solução de diaminobenzidina cromogênica, apresentando coloração marrom quando positiva para aromatase.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora uma redução significativa tenha sido observada nos folículos SEC e AI morfológicamente normais no final do período de cultivo in vitro (dia 6), não houve diferença significativa entre os folículos secundários frescos e vitrificados. Após 4 dias de cultivo, 61% dos folículos secundários (frescos e vitrificados) apresentavam uma pequena cavidade antral e, posteriormente, observou-se ao final do cultivo (D6) que a taxa de formação de antro aumentou para 95 % em folículos frescos e 89% em folículos vitrificados, sem diferença significativa entre os grupos. No dia 6 de cultivo in vitro, observou-se que o diâmetro dos folículos secundários vitrificados foi significativamente menor do que o diâmetro dos folículos frescos. Resultados semelhantes foram observados para a taxa de crescimento folicular entre folículos secundários frescos e vitrificados. Como esperado, ao final do cultivo, o diâmetro folicular dos folículos antrais iniciais foi significativamente maior do que o diâmetro dos folículos secundários. No entanto, a taxa de crescimento dos folículos secundários vitrificados foi maior do que os folículos antrais iniciais vitrificados.

Em relação à viabilidade folicular por calceína e etídio, foi demonstrado que esta não diferiu entre folículos frescos e vitrificados em ambas as categorias foliculares (SEC e AI). Por outro lado, a porcentagem de

folículos SEC viáveis (frescos ou vitrificados) foi significativamente maior do que a porcentagem de folículos AI viáveis. Já a avaliação pelo corante do azul de trypan, demonstrou que a porcentagem de folículos viáveis frescos foi maior do que a de folículos vitrificados em ambas as categorias foliculares (SEC e AI). Além disso, a viabilidade dos folículos SEC vitrificados foi significativamente maior do que a viabilidade dos folículos AI vitrificados.

Vários pesquisadores relataram a redução da viabilidade folicular após o procedimento de vitrificação (SADR et al., 2018; LUNARDI et al., 2015; HATAMI et al., 2014), o que pode ser explicado pela redução drástica da temperatura, levando à ruptura de membranas celulares (FAHY et al., 2004; PEGG, 2007) e estresse mecânico sofrido pelos folículos durante a geração do gradiente de concentração que ocorre naturalmente durante as etapas de adição e remoção dos agentes crioprotetores (FULLER, 2004), causando a morte folicular.

Relacionado à avaliação da TZPs, notou-se que estas estavam presentes e intactas em folículos frescos (SEC e AI) e vitrificados (apenas secundários). No entanto, folículos AI vitrificados pareceram apresentar menor intensidade fluorescente para as estruturas, sugerindo a perda de TZPs em alguns segmentos desses folículos. Este achado sugere que as TZPs não puderam ser restauradas ao longo do período de cultivo. Barret et al. (2010) também observaram redução na quantidade de TZPs em folículos ovarianos humanos criopreservados e cultivados por 2 e 6 dias, em comparação com folículos não criopreservados. As TZPs são formadas principalmente por F-actina durante o desenvolvimento do folículo e são extremamente sensíveis às flutuações de temperatura (SONGSASEN et al., 2002; BERNARD e FULLER, 1996).

Os resultados referentes à imunohistoquímica para a aromatase indicaram a presença dessa enzima tanto em células da granulosa quanto em oócitos de folículos SEC e AI (frescos e vitrificados), sugerindo que mesmo após o processo de vitrificação os folículos podem se manter funcionais, preservando sua capacidade esteroidogênica. Estudos anteriores relataram que a expressão gênica da p450 aromatase está intimamente relacionada à produção de altos níveis de estradiol nos folículos secundários caprinos (CHAVES et al., 2010).

CONCLUSÕES

Conclui-se, portanto, que F.SEC e F.AI isolados do estroma ovariano caprino foram capazes de sobreviver e crescer após vitrificação e cultivo in vitro por curto período. Contudo, os F.SEC parecem ser mais resistentes que os F.AI ao estresse causado pelas condições de vitrificação e cultivo in vitro, como foi revelado pela perda de TZPs. No entanto, a capacidade esteroidogênica foi mantida em ambas as categorias foliculares.

AGRADECIMENTOS

A Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afrobrasileira (UNILAB) por proporcionar subsídios para a realização com consentimento da bolsa. À Universidade Estadual do Ceará (UECE) e ao Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-Antrais (LAMOFOPA) da UECE pelo apoio no desenvolvimento dos experimentos desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

AMORIM, C. A.; DOLMANS, M. M.; DAVID, A.; JAEGER, J.; VANACKER, J.; CAMBONI, A.; DONNEZ, J.; VAN LANGENDONCKT, A. Vitrification and xenografting of human ovarian tissue. *Fertility and Sterility*, v. 98, n.

5, p. 1291-1298. e2, 2012.

BARRETT, SL; SHEA, LD; WOODRUFF, TK. Noninvasive index of cryo recovery and growth potential for human follicles in vitro. *Biology of reproduction*, v. 82, n. 6, p. 1180-1189, 2010.

BEDAIWY, M.A.; FALCONE, T. Ovarian tissue banking for cancer patients: reduction of post-transplantation ischaemic injury: intact ovary freezing and transplantation. *Human Reproduction*, v. 19, n. 6, p. 1242-1244, 2004.

BERNARD, A.; FULLER, B.J. Cryopreservation of human oocytes: a review of current problems and perspectives. *Human Reproduction Update*, v. 2, n. 3, p. 193-207, 1996.

CADENAS, J.; LEIVA-REVILLA, J.; VIEIRA, L.A.; APOLLONI, L.B.; AGUIAR, F.L.N.; ALVES, B.G.; LOBO, C.H.; RODRIGUES, A.P.R.; APGAR, G.A.; SMITZ, J.; FIGUEIREDO, J.R.; MASIDE, C. Caprine ovarian follicle requirements differ between preantral and early antral stages after IVC in medium supplemented with GH and VEGF alone or in combination. *Theriogenology*, v. 87, p. 321-332, 2017.

Celestino JJ, Bruno JB, Lima-Verde IB, Matos MH, Saraiva MV, Chaves RN, Martins FS, Almeida AP, Cunha RM, Lima LF, Name KP, Campello CC, Silva JR, Bão SN, Figueiredo JR. Steady-state level of kit ligand mRNA in goat ovaries and the role of kit ligand in preantral follicle survival and growth in vitro. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, v. 77, n. 3, p. 231-240, 2010.

FAHY, GM; WOWK, B; WU, J; PAYNTER, S. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. *Cryobiology*, v. 48, n. 1, p. 22-35, 2004.

FULLER, BJ. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *CryoLetters*, v. 25, n. 6, p. 375-388, 2004.

GOSDEN, R.G.; YIN, H.; BODINE, R.J.; MORRIS, G.J. Character, distribution and biological implications of ice crystallization in cryopreserved rabbit ovarian tissue revealed by cryo-scanning electron microscopy. *Human reproduction*, v. 25, n. 2, p. 470-478, 2010.

HATAMI, S; ZAVAREH, S; SALEHNIA, M; LASHKARBOLOUKI, T; GHORBANIAN, MT; KARIMI, I. The impact of alpha lipoic acid on developmental competence of mouse vitrified pre-antral follicles in comparison to those isolated from vitrified ovaries. *Iranian journal of reproductive medicine*, v. 12, n. 1, p. 57, 2014.

LORNAGE, J.; COURBIÈRE, B.; MAZOYER, C.; ODAGESCU, V.; BAUDOT, A.; BORDES, A.; POIREL, M. T.; FRANCK, M.; SALLE, B. Ovarian tissue vitrification: cortex and whole ovary in sheep. *Gynecologie, Obstetrique & Fertilité*, v. 34, n. 9, p. 746-753, 2006.

LUNARDI, F.O.; CHAVES, R.N.; LIMA, L.F.; ARAÚJO, V.R.; BRITO, I.R.; SOUZA, C.E.; DONATO, M.A.; PEIXOTO, C.A.; DINNYES, A.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P. Vitrified sheep isolated secondary follicles are able to grow and form antrum after a short period of in vitro culture. *Cell and tissue research*, v. 362, n. 1, p. 241-251, 2015.

RAHIMI, G.; ISACHENKO, V.; TODOROV, P.; TAWADROS, S.; MALLMANN, P.; NAWAROTH, F.; ISACHENKO, E. Apoptosis in human ovarian tissue after conventional freezing or vitrification and xenotransplantation. *CryoLetters*, v. 30, n. 4, p. 300-309, 2009.

PEGG, D.E. Principles of Cryopreservation. *Methods Mol. Biol*, 368:39-57, 2007.

SADR, S.Z.; FATEHI, R.; MAROUFIZADEH, S.; AMORIM, C.A.; EBRAHIMI, B. Utilizing Fibrin-Alginate and Matrigel-Alginate for Mouse Follicle Development in Three-Dimensional Culture Systems. *Biopreservation and biobanking*, v. 16, n. 2, p. 120-127, 2018.

SONGSASEN, N; YU, IJ; RATTERREE, MS; VANDEVOORT, CA; LEIBO, SP. Effect of chilling on the organization of tubulin and chromosomes in rhesus monkey oocytes. *Fertility and sterility*, v. 77, n. 4, p. 818-825, 2002.

TING, A.Y.; YEOMAN, R.R.; LAWSON, M.S.; ZELINSKI, M.B. Synthetic polymers improve vitrification

outcomes of macaque ovarian tissue as assessed by histological integrity and the in vitro development of secondary follicles. *Cryobiology*, v. 65, n. 1, p. 1-11, 2012.

TING, A. Y.; YEOMAN, R. R.; CAMPOS, J. R.; LAWSON, M. S.; MULLEN, S. F.; FAHY, G. M.; ZELINSKI, M. B. Morphological and functional preservation of pre-antral follicles after vitrification of macaque ovarian tissue in a closed system. *Human Reproduction*, v. 28, n. 5, p. 1267-1279, 2013.