INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FONTES E CONCENTRAÇÕES DO HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE SOBRE O DESENVOLVIMENTO FOLICULAR E A COMPETÊNCIA DE OÓCITOS OVARIANOS.

Francisco Glauber Peixoto Ferreira [1], Anna Clara Accioly Ferreira [2], José Ricardo de Figueiredo [3], Juliana Jales de Hollanda Celestino [4]

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de diferentes fontes e concentrações de FSH no cultivo de folículos pré-antrais e antrais iniciais. Para tanto, após coleta dos ovários, foram obtidos folículos pré-antrais secundários (150 – 250 µm) e antrais iniciais (300 – 400 µm). Realizou-se o cultivo folicular com base em uma curva concentração resposta de recombinante humano (FSHrh), nas seguintes concentrações: 0, 10, 50 e 100 mUI/mL (Fase I); e, com FSH pituitário porcino (FSHpp); 0, 100, 200, 500 mIU/mL, em que foi comparado com a melhor concentração de FSHrh (50 mUI / mL) definida na Fase I, e com FSH recombinante bovino (FSHrb) (100 ng/mL) - (Fase II). Após cultivo, oócitos foram selecionados para maturação in vitro. . Avaliou-se morfologia folicular, taxa de crescimento, formação de antro, viabilidade oocitária e percentual de maturação in vitro: na Fase I, em folículos antrais, a adição de FSH 50 mUI/mL aumentou o diâmetro folicular e taxa de crescimento, percentagem de oócitos desenvolvidos e diâmetro oocitário (P< 0,05), não acontecendo o mesmo para folículos pré-antrais. Já com relação à Fase II, no que se refere ao diâmetro médio de oócitos viáveis ≥ 110 µm, na categoria de folículos antrais, o tratamento FSHrh resultou em maior diâmetro (P 0,05). Em conclusão, durante o cultivo in vitro, as diferentes categorias foliculares (pré-antrais e antrais iniciais) demonstraram diferentes respostas estágio-específica às diferentes fontes de FSH.

Palavras-chave:

Hormônio Folículo Estimulante. Desenvolvimento folicular. Competência oocitária.

[1] Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - UNILAB, Instituto Ciências da Saúde, Discente, e-mail: fgpf.glauber@hotmail.com
[2] Universidade Estadual do Ceará - UECE, Programa de Pós-Graduação em CiênciasVeterinárias (PPGCV), Docente, e-mail: annaclaraaccioly@yahoo.com.br
[3] Universidade Estadual do Ceará - UECE, Faculdade de Veterinária - FAVET , Docente, e-mail: figueiredo.lamofopa@gmail.com
[4] Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - UNILAB, Instituto Ciências da Saúde, Docente, e-mail: juliana.celestino@unilab.edu.br

INTRODUÇÃO

O Hormônio Folículo Estimulante-FSH desempenha papel fundamental na regulação das funções gonadais, sendo produzido e secretado pela glândula hipófise como uma glicoproteína de elevada heterogeneidade (ULLOA-AGUIRRE et al., 1995). Esta gonadotrofina é indispensável para o desenvolvimento e maturação das gônadas na puberdade e produção de gametas durante a fase fértil da vida, além de ser implicada na ovulação. As ações do FSH são mediadas nas células somáticas ovarianas através de receptores específicos da superfície celular (MINJ et al., 2008).

In vivo, o FSH tem sido amplamente utilizado em programas de estimulação ovariana nas diversas espécies (humana: AGARWAL et al., 2000; caprina: BALDASSARRE E KARATZAS, 2004; bovina: BÉNYEI E BARROS, 1999). Um dos motivos para que o FSH tenha sido muito utilizado para humanos é o fato de que a preservação da fertilidade de jovens mulheres em idade reprodutiva tem se tornado um dos grandes desafios da medicina, já que a maioria dos tratamentos contra o câncer pode causar insuficiência ovariana prematura, devido à toxicidade ovariana dos agentes quimioterápicos.

Diante de tudo que foi exposto, formulou-se então o seguinte problema: diferentes fontes e concentrações de FSH, quando adicionado ao meio de cultivo, influenciam o desenvolvimento de folículos pré-antrais e antrais iniciais e a subsequente maturação de oócitos oriundos desses folículos previamente cultivados in vitro? Essa pesquisa objetivou avaliar as diferentes fontes e concentrações do FSH no cultivo in vitro de folículos pré-antrais e antrais iniciais isolados de origem caprina, com o intuito de elaborar um sistema de cultivo eficiente para melhorar as taxas de maturação de oócitos oriundos de folículos crescidos in vitro.

METODOLOGIA

No tocante à metodologia, a mesma aconteceu em duas Fases a saber: Fase I - Curva concentração-resposta do Hormônio Folículo Estimulante Humano recombinante humano (FSHrh) e Fase II - Curva concentração-resposta do FSH pituitário porcino (FSHpp) em comparação ao FSH recombinante bovino (FSHrb) e FSHrh. Para tanto, folículos pré-antrais (150 – 250 µm) e antrais iniciais (300 – 400 µm) foram obtidos de cabras adultas mestiças (com idade entre 1 e 3 anos)em abatedouro local, e transportados para o laboratório em MEM-HEPES dentro de 1 a 4 ° C (CHAVES et al., 2008).

Uma vez obtidos, os folículos foram distribuídos aleatoriamente e cultivados em alfa-meio essencial mínimo suplementado (α-MEM+) (meio controle) na ausência ou presença de uma curva concentração-resposta com FSH recombinante humano (FSHrh), nas seguintes concentrações: 0, 10, 50 e 100 mUI/mL (Fase I); e, com FSH pituitário porcino (FSHpp), nas seguintes concentrações: 0, 100, 200, 500 mIU/mL, em que foi comparado com a melhor concentração de FSHrh (50 mUI / mL) definida na Fase I, e com FSH recombinante bovino (FSHrb) (100 ng/mL) - (Fase II). As concentrações de FSH recombinante bovino (100 ng/mL) e FSH recombinante humano (50 mUI mL) foram definidas em experimentos anteriores (FERREIRA et al., 2016; FERREIRA et al., 2018).

Após 18 dias de cultivo, oócitos maiores que 110 µm foram selecionados para a maturação in vitro. Os parâmetros avaliados foram morfologia folicular, taxa de crescimento e formação de antro, viabilidade, extrusão e taxa de recuperação oocitária e percentual de maturação in vitro.

Avaliação do desenvolvimento folicular ocorreu basicamente da seguinte forma: a cada 6 dias de cultivo, os folículos foram classificados como normais, extrusos ou degenerados, de acordo com características morfológicas (SÁ et al., 2017). Em seguida, calculou-se a taxa de crescimento folicular considerando o diâmetro de folículos normais no dia 18, menos o diâmetro dos folículos normais no dia 0, dividido por 18 dias de cultivo. A formação da cavidade antral foi definida como uma cavidade translúcida visível dentro das camadas das células da granulosa.

Na maturação in vitro (MIV), a taxa de recuperação oocitária foi calculada dividindo-se o número de oócitos ≥110 µm de diâmetro (zona pelúcida não incluída) pelo número de folículos viáveis ao final do cultivo e multiplicando esse valor por 100 (FERREIRA et al., 2016). A viabilidade dos oócitos e a configuração da cromatina em maturação foram avaliadas por microscopia de fluorescência (Nikon, Eclipse 80i, Tóquio, Japão). Após a MIV, os oócitos foram desnudos mecanicamente e incubados em grupos de 10 em 100 µL-gotas de meio PBS.

Para ambas as fases, todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o Sigma Plot versão 11.0 (Systat

Software Inc.) e os dados foram mostrados como média (± E.P.M.) e percentagem. As variáveis de proporção foram analisadas entre os tratamentos pelos testes de Qui-quadrado e exato de Fisher. As medias entre os tratamentos foram comparativamente avaliadas por ANOVA e teste de Tukey, em que o teste t-pareado foi utilizado para analisar o efeito do tratamento dentro dos dias de cultivo. Uma probabilidade de $P < 0,05$ indicou que houve diferença significativa, e valores entre $P > 0,05$ e ≤ 01 foram considerados como significado aproximado.
O trabalho foi devidamente submetido e aprovado à Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Ceará (UECE), sob o número de protocolo 2422377-2016.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo comparou pela primeira vez, sob as mesmas condições experimentais, o efeito da estimulação de FSHrh no cultivo in vitro de folículos pré-antrais e antrais iniciais caprinos. Os dados indicam claramente que os folículos pré-antrais e antrais responderam diferentemente à estimulação com FSHrh no que diz respeito ao crescimento folicular e oocitário, retomada meiótica do oócito e maturação. Neste estudo, especificamente na Fase 1 e independentemente da categoria folicular, a adição de FSHrh não afetou os percentuais de folículos íntegros, extrusos e degenerados quando comparados ao controle. Além disso, não houve efeito da adição de FSHrh na formação de antro durante o cultivo in vitro de folículos pré-antrais. A ausência de efeito do FSHrh nos parâmetros acima mencionados pode ser explicada pela presença de insulina no meio de base. Estudos mostraram que a insulina é um fator de sobrevivência que estimula a proliferação celular e contribui para o desenvolvimento folicular (GUTIERREZ et al., 2000; CHAVES et al., 2012; AMIN et al., 2013).
Um dos novos achados do presente estudo foi o efeito estágio específico e o efeito dependente da concentração de FSHrh no cultivo in vitro de folículos isolados de cabras. Os dados indicam que a adição de FSH a 50 mUI/mL melhorou a taxa de crescimento folicular diária de oócitos completamente desenvolvidos e maturação oocitária, após cultivo de folículo antral, mas não teve efeito positivo no cultivo in vitro de folículos pré-antrais. Além disso, nesta categoria folicular, o tratamento com FSH a 10 e 100 mUI/mL reduziu a percentagem de oócitos em metáfase (MII) em comparação ao grupo controle, conforme pode ser observado na Tabela 1. Vários estudos têm demonstrado que a concentração adequada de FSH para o cultivo in vitro de folículos pré-antrais variava de 1 para 2000 mUI/mL (PARK et al., 2012; ROCHA et al., 2014; IHM et al., 2015). Além disso, as concentrações ideais de FSH variam com as espécies animais, hormônios e fatores de crescimento presentes no meio de base, e fonte de FSH (XU et al., 1995).

Com relação à Fase II, a adição de FSHrb em folículos antrais resultou na ausência do oócito em MII, com nenhuma diferença ($P>0,05$) dos outros tratamentos. Na mesma categoria folicular, a percentagem de eficiência de MII (%MII/retomada meiótica) foi superior nos tratamentos FSHpp10 e FSHrh, quando comparados ao controle. Para folículos pré-antrais, a ausência de MII e, consequentemente, a eficiência de MII, ocorreu nos tratamentos FSHpp100 e FSHrh, como nenhuma diferença ($P>0,05$) dos outros tratamentos.
Na Fase II, em relação ao diâmetro médio de oócitos viáveis ≥ 110 µm, na categoria de folículos antrais, o tratamento FSHrh resultou em maior diâmetro do que o FSHrb, embora eles não tenham diferido dos outros tratamentos. Para folículos pré-antrais, a adição de FSH não melhorou o diâmetro de oócitos completamente crescidos ($P > 0,05$). A adição de FSHrb, em folículos antrais, resultou na ausência de oócitos em MII, sem diferença ($P>0,05$) do grupo controle, e os outros tratamentos não diferiram entre eles ($P > 0,05$). Na mesma categoria folicular, a percentagem de eficiência de MII (%MII/retomada meiótica) foi superior nos tratamentos FSHpp10 e FSHrh, quando comparados ao controle. Para folículos pré-antrais, a ausência de MII ocorreu nos tratamentos FSHpp100 e FSHrh, sem diferença de FSHpp10, e os outros tratamentos não diferiram entre eles ($P > 0,05$) conforme pode ser visto na Tabela 2. Xu et al. (2011) demostraram que o LH junto ao FSH funcionou como fator relevante para maturação oocitária até a fase de meiose II, sendo utilizado em experimentos com ratos. Contudo, ao ser testado em primatas não humanos (macaco Rhesus), esta combinação promoveu redução da viabilidade oocitária, sendo alcançados resultados melhores ao se utilizar somente FSH, o que indica quanto maior a especificidade em conhecer determinados tipos de FSH,

maior será a chance de alcançar resultados mais eficazes, no nosso caso, este sendo representado pelo FSHrh, cabendo ainda mais estudos com foco na temática em questão.

CONCLUSÕES

Em conclusão, durante o cultivo in vitro, as diferentes categorias foliculares (pré-antrais e folículos antrais iniciais) demonstraram diferentes respostas estágio-específica às diferentes fontes de FSH, observando independentemente do tipo de FSH, uma influência maior em folículos antrais iniciais do que nos pré-antrais. Além disso, para um resultado mais desejável da maturação oocitária dos folículos antrais iniciais, recomenda-se o uso de FSHrh a 50 mUI/mL ou FSHp a 10 mUI/mL.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico – CNPq por dar subsídio à realização da pesquisa com o consentimento da bolsa e às instituições Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB) e Universidade Estadual do Ceará (UECE) pelo apoio prático na realização dos experimentos.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, R.; HOLMES, J.; JACOBS, H. S. Follicle-stimulating hormone or human menopausal gonadotropin for ovarian stimulation in in vitro fertilization cycles: a meta-analysis. Fertil Steril, v.73, p.338-343, 2000.

AMIM, R. U.; REDDY, K. C.; RAO, K. S.; RAGHA VENDER, K. B. P.; TEJA, A.; RAMESH, T.; ARUNAKUMARI, G.; 2013. In vitro culture of goat preantral follicles from fetal ovaries. Small Rumin. Res. 115, 71–76

BALDASSARRE, H.; KARATZAS, C. N. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. Anim Reprod Sci, v.82/83, p.255-66, 2004.

BÉNYEI, B.; BARROS, C. C. W. Efeito da superovulação sobre o desempenho de bovinos doadores de embrião importado de clima temperado para clima tropical nos dois primeiros anos de adaptação. Arq Brase Med Vet Zootec, v.52, p.366 -371, 1999.

CHAVES, R. N.; DUARTE, A. B. G.; RODRIGUES, G. Q.; CELESTINO, J. J. H.; SILVA, G. M.; LOPES, C. A. P.; ALMEIDA, A. P.; DONATO, M. A. M.; PEIXOTO, C. A.; MOURA, A. A. A.; LOBO, C. H.; LOCATELLI, Y.; MERMILLOD, P.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. 2012. The effects of insulin and follicle-stimulating hormone (FSH) during in vitro development of ovarian goat preantral follicles and the relative mRNA expression for insulin and FSH receptors and cytochrome P450 aromatase in cultured follicles. Biol. Reprod. 3, 1-11

CHAVES, R.N.; MARTINS, F.S.; SARAIVA, M.V.A.; CELESTINO, J.J.H.; LOPES, C.A.P.; CORREIA, J.C.; LIMA-VERDE, I.B.; MATOS, M.H.T.; BÁO, S.N.; NAME, K.P.O.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. Chilling ovarian fragments during transportation improve viability and growth of goat preantral follicles cultured in vitro. Reprod. Fertil. Dev., v. 20, p. 640-647, 2008.FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; SILVA, J.R.V. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais. In: GONÇALVES, P.B.D.

FERREIRA, A. C. A.; CADENASA, J.; SÁ, N. A. R.; CORREIA, H. H. V.; GUERREIRO, D. D.; LOBO, C. H.; ALVES, B. G.; MASIDE, C.; GASTALE, E. L.; RODRIGUESA, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. In vitro culture of isolated preantral and antral follicles of goats 1 using human recombinant FSH: concentration-dependent and stage-2 specific effect. 2018.

FERREIRA A.C.A.; MASIDE, C.; SÁ, N.A.R.; GUERREIRO, D.D.; CORREIA, H.H.V.; LEIVA-REVILLA, J.; LOBO, C.H.; ARAÚJO, V.R.; APGAR, G.A.; BRANDÃO, F.Z.; FIGUEIREDO, J.R.; CAMPELLO, C.C. 2016. Balance of insulin and FSH concentrations improves the in 423 vitro development of isolated goat preantral follicles in medium containing GH. Anim. Reprod. Sci. 165, 1-10.

GUTIERREZ, C. G.; RALPH, J. H.; TELFER, E. E.; WILMUT, I.; WEBB, R. 2000. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. Biol. Reprod. 62, 1322-1328.
IHM, J. E.; LEE, S. T.; HAN, D. K.; LIM, J. M.; HUBBELL, J. A. 2015. Murine ovarian follicle culture in PEG-Hydrogel: effects of mechanical properties and the hormones FSH and LH on development. Macromol. Res. 23, 377–38
PARK, K. E.; KU, S.; JUNG, K. C.; LIU, H. C.; KIM, Y. Y.; KIM, Y. J.; KIM, S. H.; CHOI, Y. M.; KIM, J. G.; MOON, S.Y. 2012. Effects of urinary and recombinant gonadotropins on in vitro maturation outcomes of mouse preantral follicles. Reprod. Sci. 20, 909–916.
ROCHA, R. M. P.; ALVES, A. M. C. V.; LIMA, L. F.; DUARTE, A. B. G.; CHAVES, R. N.; BRITO, I. R.; COSTA, E. C.; BERNUCI, M. P.; ROSA-ESILVA, A. C. J. S.; XU, M.; RODRIGUES, A. P. R.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; 2014. Is the mouse follicle culture a good model for the goat with respect to the development of preantral follicles in vitro? Domest. Anim. Endocrinol. 49, 27–30.
SÁ, N.A.R.; ARAÚJO, V.R.; CORREIA, H.H.V.; FERREIRA, A.C.A.; GUERREIRO, D.D.; SAMPAIO, A.M.; ESCOBAR, E.; SANTOS, F.W.; MOURA, A.A.; LÔBO, C.H.,; CECCATTO, V.M.; CAMPELLO, C.C.; RODRIGUES, A.P.R.; LEAL-CARDOSO, J.H.; FIGUEIREDO, J.R., 2017. Anethole improves the in vitro development of isolated caprine secondary follicles. Theriogenology 89, 226-234
ULLOA-AGUIRRE, A.; MIDGLEY JR, A. R.; BEITINS, I. Z.; PADMANABHAN, V. Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. Endocr Rev, v.16, p.765-787, 1995.
XU, Z.; GARVERICK, H. A.; SMITH, G. W.; SMITH, M. F.; HAMILTON, S. A.; YOUNGQUIST, R. S. 1995. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. Biol. Reprod. 53, 951–957.
XU, J.; LAUSON M, S.; YEOMAN, R. R.; PAU, K. I.; BARRETT, S. L. ZELINSKI, M. B. et al. Secondary folicle growth and oocyte maturation during scapsulated thee-dimencional culture in resus mokey efect of gonadotropins, oxigen and fetuin. Hum reprod. 2011. 26: 1061-72.