DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE CULTIVO IN VITRO EFICIENTE PARA O DESENVOLVIMENTO FOLICULAR E A COMPETÊNCIA DE OÓCITOS OVARIANOS CAPRINOS.

Alesandro Silva Ferreira[1]
Anna Clara Accioly Ferreira[2]
Anelise Maria Costa Vasconcelos Alves[3]
José Ricardo De Figueiredo[4]
Juliana Jales De Hollanda Celestino[5]

RESUMO

Este estudo teve como objetivo elaborar um sistema de cultivo eficiente e específico para folículos pré-antrais tardios (FOPA) e antrais iniciais (FA), para melhores taxas de maturação de oócitos caprinos. Para tanto, foram estabelecidos meios específicos para FOPA e FA, referido como meio FOPA: α-MEM+ com alta concentração de insulina (10 µg/mL) e meio FA: α-MEM+ com baixa concentração de insulina (10 ng/mL) acrescido de hormônio do crescimento (GH). Os FOPA foram cultivados por 24 dias nos seguintes tratamentos: 1- apenas em meio FOPA; 2- em meio FOPA no primeiro quarto do cultivo (D0-D6) seguido de meio FA (D6-D24) e 3- em meio FOPA + fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF-9) no primeiro quarto do cultivo (D0-D6) seguido de meio FA + GDF-9 (D6-D24). Os FA foram cultivados durante 18 dias em meio FA ou meio FA+GDF-9. Os resultados mostraram que em ambas categorias foliculares, do dia 6 ao 18, a porcentagem de folículos morfologicamente intactos diminuiu($P < 0,05$). Para FOPA, foi observado que o meio dinâmico sem GDF-9, a partir do dia 18, resultou em taxas mais altas de folículos intactos ($P < 0,05$). A retomada meiótica foi maior ($P <0,05$) em FA em relação a FOPA, quando considerado o meio dinâmico. Já em meio fixo, foram observadas taxas similares de retomada meiótica e metáfase II entre as duas classes foliculares. Em conclusão, o uso de meio FOPA por 24 dias parece ser o melhor método para o cultivo de FOPA caprinos.

Palavras-chave: folículo ovariano competência oocitária cultivo in vitro hormônios .

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências da Saúde, Discente, silvaalesandro90@gmail.com[1]
Universidade Estadual do Ceará, Laboratório de manipulação de oócitos e folículos pré-antrais, Docente, annaaccioly2014@gmail.com[2]
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências da Saúde, TAE, aneliseal vs@unilab.edu.br[3]
Universidade Estadual do Ceará, Laboratório de manipulação de oócitos e folículos pré-antrais, Docente, figueiredo.lamofopa@gmail.com[4]
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências da Saúde, Docente, juliana.celestino@unilab.edu.br[5]

ISSN: 2447-6161

INTRODUÇÃO

O folículo ovariano é a unidade morfofuncional do ovário, sendo responsável por proporcionar o ambiente necessário para o desenvolvimento do oócito que nele está incluso (CORTVRINT E SMITZ, 2001). De acordo com o grau de evolução, os folículos podem ser classificados em pré-antrais e não cavitários e antrais ou cavitários. Os folículos pré-antrais (FOPA), por sua vez, podem ser classificados em primordiais, primários e secundários. Já os folículos antrais (FA), em terciários e pré-ovulatórios (SAUMANDE, 1991). Sabe-se que os oócitos estão presentes no ovário, predominantemente inclusos em FOPA, representando estes o pool de estoque de folículos ovarianos. Entretanto, durante toda a vida reprodutiva da fêmea ou feminina, a grande maioria desses folículos (99,9%) morrem pelo fenômeno conhecido como atresia folicular (FIGUEIREDO et al., 2008).

Com isso, o cultivo in vitro folicular (CIVF) é uma tecnologia em desenvolvimento que objetiva otimizar a utilização de oócitos imaturos para reprodução assistida (SHEA et al., 2014). Para tanto, a composição do meio é essencial para o sucesso do CIVF. Diversas substâncias já foram relatadas como chaves para a foliculogênese in vitro, tais como o anetol, um antioxidante (SÀ et al., 2017), o hormônio do crescimento (GH) (CADENAS et al., 2017), a insulina (THONGKITTIDILOK et al., 2018) e o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF-9) (MONTE et al., 2019).

Além da composição do meio, o período de cultivo também é um fator chave no sucesso da foliculogênese in vitro. Para a espécie caprina, estudos apontam maiores diâmetros oocitários e maiores taxas de retomada meiótica para folículos pré-antrais (FOPA) cultivados por 24 dias. Já para os folículos antrais iniciais (FA), 18 dias parece ser o ideal (FERREIRA et al., 2018).

A dinâmica de desenvolvimento folicular e oocitário ovarianos é complexa e envolve a participação e interação de diversas substâncias (EPPIG, 2001) e os requerimentos foliculares, durante o desenvolvimento folicular, podem variar entre substâncias e concentrações, tanto in vivo quanto in vitro (MAGALHÃES et al., 2013). Esses fatores fazem com que a produção de oócitos maturos in vitro seja pouco eficaz comparado ao potencial reprodutivo do organismo in vivo. Diante do exposto, questiona-se se seria necessário a utilização de um meio dinâmico, além do tempo de cultivo, para a melhoria nas taxas de maturação de oócitos caprinos crescidos in vitro.

Com isso, considerando os requerimentos estágio-específico folicular durante o CIVF, esse trabalho objetivou elaborar um sistema de cultivo eficiente e específico para folículos pré-antrais e antrais iniciais, para melhorar as taxas de maturação de oócitos caprinos crescidos in vitro.

METODOLOGIA

Para tanto, ovários de cabras adultas sem raça definida (idade de 1 a 3 anos) foram coletados em abatedouro local, e transportados ao laboratório em MEM-HEPES por no máximo 1 h a 4 °C (CHAVES et al., 2008).

Folículos pré-antrais secundários e antrais iniciais foram isolados, selecionados, distribuídos aleatoriamente

ISSN: 2447-6161

e cultivados. O meio de base consistiu em alfa meio essencial mínimo suplementado de diferentes substâncias, inclusive anetol (α- MEM+). Foram estabelecidos meios específicos para FOPA e FA, referidos como meio FOPA composto por α-MEM+ suplementado com alta concentração de insulina (10 µg/mL) e meio FA que consistia de α-MEM+ suplementado com baixa concentração de insulina (10 ng/mL), mais 50 ng/mL de GH. Os FOPA foram cultivados por 24 dias nos seguintes tratamentos: 1- apenas em meio FOPA (FOPA-Fix); 2- em meio FOPA no primeiro quarto do cultivo (D0-D6) e posteriormente em meio FA (D6-D24) (FOPA-Din) e 3- em meio FOPA + fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF-9) no primeiro quarto do cultivo (D0-D6) e posteriormente em meio FA + GDF-9 (D6-D24) (FOPA-Din + GDF-9). Os FA foram cultivados durante 18 dias em meio FA (FA-Fix) ou meio FA+GDF-9 (FA-Fix + GDF-9). O cultivo foi realizado a 38,5 ° C, em 7,5 % de CO2 em atmosfera por 18 (folículos antrais iniciais) ou 24 dias (folículos pré-antrais tardios).

Para a avaliação do desenvolvimento folicular, a cada seis dias de cultivo, os folículos foram classificados como normais, extrusos ou degenerados, de acordo com as características morfológicas. O diâmetro folicular foi medido apenas em folículos normais, sendo então calculada a taxa de crescimento folicular. A formação da cavidade antral foi definida como uma cavidade translúcida visível por entre as camadas das células da granulosa.

Após os períodos de cultivo, os complexos cumulus-oócito (CCOs) foram recuperados e apenas os oócitos ≥110 µm de diâmetro com citoplasma homogêneo, circundados por pelo menos uma camada compacta de células do cumulus foram selecionados para MIV e calculada então a taxa de recuperação oocitária.

Após a MIV, os COCs foram desnudados e incubados em gotas de 10 µL de PBS suplementado com 5,5 µg/mL Hoechst 33342 e 1% de glutaraldeído a temperatura ambiente por 30 minutos, e processados (CADENAS et al., 2017). A viabilidade oocitária e a configuração da cromatina foram avaliadas com auxílio de microscópio de fluorescência .

Os dados estatísticos foram apresentados como média (± EPM) ou percentagem. Foram utilizados ANOVA one-way e teste Student-Newman Keuls para comparação de meios e o teste de Qui-quadrado ou Teste G para análises entre tratamentos e dias de cultivo. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo investigou pela primeira vez os efeitos do meio dinâmico com insulina (alta ou baixa concentração), GH e GDF-9 na sobrevivência e desenvolvimento de FOPA caprinos isolados cultivados in vitro.

No tocante ao cultivo de FOPA, os resultados demonstraram que na ausência de GDF-9, o sistema de cultivo (fixo x dinâmico) afetou alguns parâmetros, tais como morfologia folicular e taxas de crescimento durante a segunda parte do cultivo. O meio FOPA tem sido usado comumente com a adição de insulina em alta concentração (“suprafisiológica”) (FERREIRA et al., 2018; THONGKITTIDILOK et al., 2018), enquanto para FA tem sido usado insulina relativamente em baixa concentração (“fisiológica”) (CADENAS et al., 2017). Por essa razão, foi proposto testar aqui um meio sequencial para FOPA com a composição sendo mudada no dia 6 de cultivo, quando os folículos iniciam a entrada no estágio antral.

ISSN: 2447-6161

A porcentagem de folículos morfologicamente intactos diminuiu , enquanto a extrusão de folículos aumentou (P <0,05) do dia 6 para o dia 18 de cultivo, em ambas as categorias foliculares. Para os FOPA, os meios dinâmicos foram capazes de manter a porcentagem de folículos intactos dos dias 18 a 24. Ao comparar FOPA com FA, a porcentagem de folículos intactos foi maior (P <0,05) no FA no dia 18, independentemente do tratamento.

Além disso, para o FOPA, a partir do dia 18, o uso de um meio dinâmico sem GDF-9 resultou em taxas mais altas (P <0,05) de folículos intactos e menores (P <0,05) de extrusão folicular quando comparado ao meio fixo, sem efeito na degeneração folicular, exceto no dia 18.

Entre os dias 0 e 6 de cultivo, independentemente das condições de cultivo, os tratamentos FOPA apresentaram uma maior taxa de crescimento folicular (P <0,05) do que os tratamentos de FA. Do dia 6 ao 18, folículos antrais obtidos in vitro cultivados em meio FOPA apresentaram uma maior (P<0,05) taxa de crescimento em comparação aos folículos cultivados em meio FA, exceto o tratamento FA-Fix + GDF-9, que foi o único a manter uma taxa de crescimento semelhante (P > 0,05), entre o primeiro e os últimos dois terços do cultivo.

Ao final do cultivo, os diâmetros oocitários foram superiores (P < 0,05) em FA do que em FOPA. As frequências de oócitos ≥110 µm foram similares (P > 0,05) entre todos os meios dos tratamentos FOPA. Entretanto, a frequência de oócitos ≥110 µm foi superior (P < 0,05) nos tratamentos com FA (FA-Fix: 28,6%; FA-Fix + GDF-9: 25,7%) do que em FOPA Din (10%) e FOPA Din + GDF-9 (13%) . Ademais, a degeneração oocitária foi maior (P < 0,05) quando FOPA foram cultivados em meio dinâmico sem GDF-9 (54,3 %) comparado a FOPA cultivados em meio fixo (31,3 %) ou meio dinâmico com GDF-9 (33,3 %). Com isso, corroborando com os nossos achados deste trabalho, Almeida et al. (2011) relataram que a adição de GDF-9 ao meio contendo insulina alta e incrementado com concentrações de FSH promoveu a sobrevivência de FOPA isolados depois de 18 dias de cultivo.

A retomada meiótica foi mais elevada (P < 0,05) em FA (FA-Fix: 34,3%; FA-Fix + GDF-9: 38,6%) do que em FOPA (FOPA-Din: 20%; FOPA-Din + GDF-9: 14,5%) cultivados em meios dinâmicos. No entanto, taxas semelhantes (P > 0,05) de retomada da meiose e MII foram observadas entre FA (34,3%; 21,4%) e FOPA (23, 9%; 13,4%) cultivados em meios fixos. Além disso, as taxas de MII foram semelhantes (P > 0,05) entre FOPA (FOPA-Fix: 13,4%) e FA (FA-Fix: 21,4% FA-Fix+GDF-9: 17,1%) cultivados em meios fixos na ausência ou presença do GDF-9. A adição de GDF-9 ao meio promoveu taxas semelhantes (P < 0,05) de oócitos em MII entre FOPA (7,2%) e FA (17,1%).

Estudos prévios relataram taxas mais altas de maturação em oócitos de FA do que FOPA quando cultivados sob as mesmas condições experimentais (CADENAS et al., 2017, FERREIRA et al., 2018). Entretanto, no presente estudo, foram observadas taxas similares de maturação entre FA e FOPA, quando FA obtidos in vitro foram comparados com FA obtidos in vivo durante o mesmo período de cultivo (18 dias).

CONCLUSÕES

Em conclusão, o cultivo in vitro de FOPA em meio fixo com insulina em alta concentração aumentou o crescimento folicular. No entanto, apesar desses achados, os folículos cultivados em meio fixo mostraram crescimento e taxas de maturação oocitária semelhantes quando comparados com o meio dinâmico, onde a concentração de insulina foi reduzida até o nível fisiológico, quando os folículos entraram em na fase antral.

ISSN: 2447-6161

Assim, o uso de meio fixo com alta concentração de insulina (10 µg / ml) por 24 dias parece ser o melhor método para o cultivo de FOPA caprino. Contudo, a utilização de sistemas de cultivo sequencial pode representar uma alternativa para melhoramento dos sistemas de cultivo comumente utilizados, para aumento da competência oocitária.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq por proporcionar subsídios para a realização com consentimento da bolsa. A Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira (UNILAB), a Universidade Estadual do Ceará (UECE) e ao Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-Antrais (LAMOFOPA) pelo apoio no desenvolvimento dos experimentos desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.P.; SARAIVA, M.V.A.; ARAÚJO, V.R.; MAGALHÃES, D.M.; DUARTE, A.B.G.; FROTA, I.M.A.; LOPES, C.A.P.; CAMPELLO, C.C.; SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, J.R. Expression of growth and differentiation factor 9 (GDF-9) and its effect on the in vitro culture of caprine preantral ovarian follicles. Small Ruminant Research, v. 100, p. 169-176, 2011.

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.

CORTVRINDT, R.G.; SMITZ, J.E. Fluorescent probes allow rapid and precise recording of follicle density and staging in human ovarian cortical biopsy samples. Fertilility and Sterility, v. 75, p. 599-593, 2001.

EPPIG, J.J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. Reproduction, v. 122, n. 6, p. 829-838, 2001.

FERREIRA, A.C.A.; CADENAS, J.; SÁ, N.A.R.; CORREIA, H.H.V.; GUERREIRO, D.D.; LOBO, C.H.; ALVES, B.G.; MASIDE, C.; GASTAL, E.L.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. In vitro culture of isolated preantral and antral follicles of goats using human recombinant FSH: concentration-dependent and stage-specific effect. Anim. Reprod. Sci., v. 196, p. 120–129, 2018.

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.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal. São Paulo: Editora Roca, p.303-327, 2008.

MAGALHÃES-PADILHA, D.M.; GEISLER-LEE, J.; WISCHRAL, A.; GASTAL, M.O.; FONSECA, G.R.; ELOY, Y.R.G.; GEISLER, M.; FIGUEIREDO, J.R.; GASTAL, E.L. Gene expression during early folliculogenesis in goats using microarray analysis. Biol. Reprod., v. 89, p. 1–12, 2013

SHEA, L.D.; WOODRUFF, T.K.; SHIKANOV, A. Bioengineering the ovarian follicle microenvironment. Annu.

ISSN: 2447-6161

Rev. Biomed. Eng., v. 16, p. 29–52, 2014.

THONGKITTIDILOK, C.; SINGH, R.P.; COMIZZOLI, P.; WILDT, D.; SONGSASEN, N. Insulin promotes preantral follicle growth and antrum formation through temporal expression of genes regulating steroidogenesis and water transport in the cat. Reproduction, Fertility and Development, v. 30, n. 10, p. 1369-1379, 2018.

ISSN: 2447-6161