REDUÇÃO DE RADICAIS LIVRES PRODUZIDOS NA CRIOPRESERVAÇÃO: EFEITOS DO ÁCIDO ALFA LIPÓICO NO CULTIVO IN VITRO DE FOLÍCULOS OVARIANOS CAPRINOS

Maria Bianca De Almeida Silva[1]
Ana Paula Ribeiro Rodrigues[2]
Mariana De Brito Chagas[3]
Éverton Pimentel Ferreira Lopes[4]
Rebeca Magalhães Pedrosa Rocha[5]

RESUMO

Durante a criopreservação pode ocorrer um aumento excessivo de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, consequentemente, possíveis danos celulares. No intuito de evitar esses danos, alguns pesquisadores relataram o benefício da adição de antioxidantes durante o cultivo *in vitro*. Portanto, o objetivo do presente projeto foi investigar os efeitos do ácido alfa lipóico (ALA) sobre o desenvolvimento de folículos secundários (FSEC) e folículos antrais iniciais (FAI) vitrificados e cultivados *in vitro*. Para tanto, os FSEC e FAI foram isolados de fragmentos ovarianos, sendo destinados imediatamente ao cultivo *in vitro* (grupo controle) ou a vitrificação utilizando polímeros sintéticos (PS), proteínas anticongelantes (AC1K ou AC100K) ou sem proteínas anticongelantes (SAC). Após 7 dias de armazenamento, os FSEC e FAI foram cultivados *in vitro* na presença de 100 µM de ALA por 6 dias. Os resultados mostraram que todos os tratamentos apresentaram a morfologia normal e a taxa de formação de antro semelhantes. Não houve diferença significativa entre os diâmetros de folículos frescos e vitrificados na presença de PS. A vitrificação com PS aumentou o nível de EROs de FSEC e FAI. Contudo, a adição de 1000 ng/mL de proteínas anticongelantes reduziu ainda mais os níveis de EROs nos FSEC. Em conclusão, a utilização de proteínas anticongelantes e do ALA demonstrou ser adequada para a vitrificação de folículos ovarianos.

Palavras-chave: Vitrificação; Cultivo in vitro; Biotecnologia.

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências da Saúde, Discente, bianca.almeida1529@gmail.com[1]
Universidade Estadual do Ceará, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Docente, anapaula.ribeirorodrigues@gmail.com[2]
Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Discente, mariana.chagas@aluno.uece.br[3]
Universidade Estadual do Ceará, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia, 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 de oócitos tem sido uma importante alternativa para a preservação ou extensão da função reprodutiva em mulheres. Além disso, possibilita a formação de bancos de germoplasma de animais raros e/ou de alto valor genético (PEINADO et al., 2022; ANGEL-VELEZ et al., 2023). Sabe-se que a vitrificação atualmente tornou-se a técnica de escolha para a criopreservação de oócitos devido aos melhores resultados comparados ao congelamento lento na medicina humana e animal, mas ainda requer uma utilização mais padronizada (LEVI-SETTI, 2016).

A vitrificação emprega a diminuição brusca da temperatura e a utilização de altas concentrações de agentes crioprotetores (ACP), para a obtenção de um estado sólido amorfo, conhecido como estado vítreo, que evite ao máximo a formação de cristais de gelo dentro da célula (FULLER, 2004). Contudo, esse método aumenta o estresse oxidativo e osmótico, bem como, a toxicidade, resultantes das altas concentrações de ACP utilizadas. Podendo causar alterações no citoesqueleto, nas mitocôndrias e no fuso meiótico, redução da atividade enzimática, danos no DNA, morte celular por apoptose, endurecimento da zona pelúcida e perda de células do cumulus (BEST, 2015; COLOMBO, 2022).

Aparentemente, os oócitos são protegidos do estresse oxidativo por enzimas antioxidantes presentes no fluido folicular. No entanto, quando esse tipo celular é retirado de seu ambiente natural para técnicas de reprodução assistida, seu sistema de defesa natural é perdido (LIVINGSTON et al., 2009; WANG et al., 2002). Diante disso, ressalta-se a necessidade da adição de antioxidantes ao meio de cultivo *in vitro* ou de vitrificação, com a finalidade de evitar que o estresse oxidativo ocorra e atrapalhe o desenvolvimento oocitário.

METODOLOGIA

Os ovários coletados de ovelhas adultas sem padrão de raça definida (n=36, 1-3 anos) foram fragmentados (1-2 mm de espessura) para seleção e microdissecação de folículos secundários (FSEC; 250 µm de diâmetro) e folículos antrais iniciais (FAI; 350 µm de diâmetro), sendo os folículos frescos imediatamente cultivados *in vitro* por 6 dias, enquanto os demais folículos foram vitrificados.

No protocolo com polímeros sintéticos (PS), os folículos (SEC e AI) foram expostos às três soluções de equilíbrio (SE) à temperatura ambiente por 5, 3 e 2 minutos, respectivamente, apresentando uma base comum constituída por MEM-HEPES: 15% de soro fetal bovino (SFB), 100 µM de ácido alfa lipóico e 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) (SE1); 15% de DMSO e etilenoglicol (EG) (SE2); ou 30% de ambos os ACPs (SE3). Após a última exposição, os folículos foram transferidos para a solução de vitrificação (SV) composta por 50% da SE adicionada de PS (20% de Supercool X-1000, 40% de Supercoool Z-1000 e 20% de Polivinilpirrolidona – PVP).

No protocolo com as proteínas anticongelantes (PAC), os folículos (FSEC e FAI) foram expostos (15 min) à SE composta por MEM acrescido de HEPES suplementado com 20% (v/v) de SFB, 100 µM de ácido alfa lipóico, 7,5% de DMSO e 7,5% de EG. Em seguida, os folículos foram expostos (20 min) à SV composta por MEM-HEPES, 20% de SFB, 100 µM de ácido alfa lipóico, 16% de DMSO, 16 % de EG e 1M de sacarose. Ambas as soluções, na presença (1000 ng/mL-AC1K ou 100 000 ng/ml-AC100K) ou ausência (SAC) de proteínas anticongelantes.

Para a vitrificação, grupos de 5 folículos (FSEC ou FAI) foram transferidos para palhetas de 0,25 mL, que foram expostas ao vapor de nitrogênio líquido (NL2) por 2 minutos e então mergulhadas diretamente no NL. Após uma semana de armazenamento, as palhetas foram aquecidas à temperatura ambiente por 5 segundos,

ISSN: 2447-6161

posteriormente imersas em banho-maria a 45 ºC por 10 segundos. Os folículos foram recuperados das palhetas e submetidos à remoção dos crioprotetores, realizando quatro lavagens sucessivas de 3 min cada, em MEM-HEPES com concentrações decrescentes de sacarose (1 M, 0,75 M, 0,5 M e 0,25 M). Posteriormente, os folículos foram submetidos a mais duas lavagens de 5 minutos em MEM-HEPES, 15% de SFB e 100 µM de ácido alfa lipóico.

Os FSEC e FAI frescos ou vitrificados foram cultivados individualmente em gotas de 100 µL de meio de cultivo sob óleo mineral em placas de petri de 60 x 15 mm. O meio de cultivo para os FSEC foi constituído de α-MEM 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 presença de 100 µM de ácido alfa lipóico. Enquanto, os FAI foram cultivados no mesmo meio suplementado, com adição de 10 ng/mL de insulina e 50 ng/mL de hormônio do crescimento bovino. Para ambas as categorias foliculares, o cultivo *in vitro* foi realizado a 38,5 °C em 7,5% de CO2 por 6 dias, com substituição de 60 µL do meio a cada 2 dias por meio fresco.

Os FSEC e FAI frescos ou vitrificados foram classificados como normais ou degenerados e avaliados quanto ao crescimento por meio da mensuração do diâmetro folicular nos dias 0 e 6 de cultivo. Enquanto, nos FSEC foi verificada a formação do antro pela presença de uma cavidade translúcida visível entre as camadas das células da granulosa. Após o cultivo *in vitro*, os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) foram analisados usando a sonda diacetato de 2',7'di-hidrodiclorofluoresceína (DCHF-DA, Sigma-Aldrich) e o potencial de membrana mitocondrial (PMM) avaliado pela sonda MitoTracker Orange para verificação de mitocôndrias ativas.

Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média. Os resultados foram considerados significativos quando $p<0,05$. As porcentagens foram avaliadas pelo qui-quadrado e a comparação dos valores médios foi avaliada por ANOVA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Independentemente do grupo (fresco ou vitrificado), não foram observadas alterações na morfologia normal dos FSEC e FAI. Ao avaliar a taxa de formação do antro nos FSEC, não foram encontradas diferenças entre os grupos (fresco e vitrificado). Além disso, foi demonstrado que após seis dias de cultivo *in vitro*, não houve diferença significativa entre os diâmetros dos FSEC frescos e vitrificados, bem como dos FAI frescos e vitrificados na presença de PS. Nos grupos de FAI vitrificados, não foi observada diferença significativa no diâmetro de folículos vitrificados na presença de polímero sintético e PAC na concentração de 100 000 ng/ml. Anteriormente, os PS foram utilizados na vitrificação de FSEC e FAI isolados de cabras (LOPES et al., 2020), mantendo a quantidade de folículos morfologicamente normais em ambas as categorias foliculares e a taxa de formação de antro dos FSEC, similar entre os grupos frescos e cultivados *in vitro* após a vitrificação. O estudo verificou ainda, que o diâmetro dos FSEC vitrificados foi menor do que dos folículos frescos, diferentemente dos resultados encontrados neste trabalho, enquanto o diâmetro dos FAI frescos e vitrificados foi semelhante. As proteínas anticongelantes mantiveram a morfologia folicular normal após vitrificação independente da categoria folicular corroborando com resultado anterior na literatura observado em murinos (WEN et al., 2014).

Em relação aos níveis de EROs, os oócitos provenientes de FSEC e FAI apresentaram maior nível de EROs após a vitrificação utilizando PS, em relação aos demais grupos. O tratamento AC100K provocou maior produção de EROs em comparação a AC1K nos FSEC. A alta produção de EROs com a utilização de PS foi reportada após vitrificação e CIV de fragmentos ovarianos bovinos (SHAHSAVARI et al., 2021). Entretanto, a

ISSN: 2447-6161

adição de proteínas anticongelantes na solução de vitrificação demonstrou uma redução dos níveis de EROs em ovários de camundongo (LEE et al., 2015).

Quanto ao PMM, nos oócitos provenientes tanto dos FSEC quanto dos FAI, principalmente, a utilização de PS na vitrificação aumentou a atividade mitocondrial, em comparação aos demais grupos. Além disso, a adição ou não das proteínas anticongelantes parece não alterar a atividade das mitocôndrias em relação ao controle. Um estudo avaliando a atividade mitocondrial dos oócitos obtidos a partir de FPA vitrificados e cultivados, mostraram que o PMM difere significativamente entre oócitos controle e vitrificados no dia 0 e no dia 1 de cultivo (DEMANT et al., 2012).

A produção aumentada de EROs e a redução da capacidade antioxidante no tecido ovariano congelado-descongelado, promove a apoptose folicular, anormalidades ultraestruturais e morfológicas dos folículos, danos mitocondriais, oscilação alterada de cálcio e depleção de ATP, bem como, o esgotamento da reserva ovariana consequente da superativação de folículos primordiais induzida pela inibição de PTEN. Diversos estudos já demonstraram que a adição de antioxidante ao meio de criopreservação é capaz de diminuir os níveis de EROs e a apoptose celular, aumentar a capacidade antioxidante, a integridade, viabilidade, sobrevivência e diâmetro folicular, além de preservar a atividade mitocondrial e melhorar a densidade do estroma ovariano (NAJAFI et al., 2023).

CONCLUSÕES

Diante disso, verifica-se que a criopreservação de FSEC e FAI na presença de proteínas anticongelantes pode ser adequada para a vitrificação e posterior desenvolvimento folicular *in vitro* após aquecimento, pois foram capazes de manter a morfologia normal, diminuir os níveis de EROs e o PMM dos oócitos. A presença do antioxidante ALA tanto na solução de vitrificação como no meio de cultivo também se mostrou relevante para a obtenção dos resultados obtidos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Funcap) pelo financiamento da pesquisa intitulada REDUÇÃO DE RADICAIS LIVRES PRODUZIDOS DURANTE A CRIOPRESERVAÇÃO: EFEITOS DO ÁCIDO ALFA LIPÓICO DURANTE O CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS OVARIANOS CAPRINOS e executada entre 01/09/2022 e 31/08/2023, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (Pibic) e Tecnológica (Pibiti), da Unilab.

REFERÊNCIAS

ANGEL-VELEZ, Daniel et al. Embryo morphokinetics derived from fresh and vitrified bovine oocytes predict blastocyst development and nuclear abnormalities. Scientific Reports, v. 13, n. 1, p. 4765, 2023.

BEST, Benjamin P. Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. Rejuvenation research, v. 18, n. 5, p. 422-436, 2015.

COLOMBO, Martina; ALKALI, Isa Mohammed; LUVONI, Gaia Cecilia. Microenvironment factors promoting the quality of vitrified cat oocytes. Theriogenology, 2022.

ISSN: 2447-6161

DEMANT, Myriam et al. Vitrification at the pre-antral stage transiently alters inner mitochondrial membrane potential but proteome of *in vitro* grown and matured mouse oocytes appears unaffected. Human reproduction, v. 27, n. 4, p. 1096-1111, 2012.

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

LEE, Hyang Heun et al. Effects of antifreeze proteins on the vitrification of mouse oocytes: comparison of three different antifreeze proteins. Human Reproduction, v. 30, n. 9, p. 2110-2119, 2015.

LEVI-SETTI, Paolo Emanuele; PATRIZIO, Pasquale; SCARAVELLI, Giulia. Evolution of human oocyte cryopreservation: slow freezing versus vitrification. Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity, v. 23, n. 6, p. 445-450, 2016.

LIVINGSTON, Tracy et al. Glutathione content and antioxidant enzyme expression of in vivo matured sheep oocytes. Animal reproduction science, v. 116, n. 3-4, p. 265-273, 2009.

LOPES, Éverton Pimentel Ferreira et al. Vitrification of caprine secondary and early antral follicles as a perspective to preserve fertility function. Reproductive biology, v.20, n.3, p.371-378, 2020.

NAJAFI, Atefeh; ASADI, Ebrahim; BENSON, James D. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review on reactive oxygen species generation and antioxidant therapy. Cell and Tissue Research, p. 1-23, 2023.

SHAHSAVARI, Mohammad Hamed et al. Impacts of different synthetic polymers on vitrification of ovarian tissue. Cryobiology, v. 94, p. 66-72, 2020.

PEINADO, Irene et al. Potential Development of Vitrified Immature Human Oocytes: Influence of the Culture Medium and the Timing of Vitrification. International Journal of Molecular Sciences, v. 24, n. 1, p. 417, 2022.

WANG, Xia et al. Vitamin C and Vitamin E supplementation reduce oxidative stress–induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. Fertility and sterility, v. 78, n. 6, p. 1272-1277, 2002.

WEN, Yan et al. The protective role of antifreeze protein 3 on the structure and function of mature mouse oocytes in vitrification. Cryobiology, v. 69, n. 3, p. 394-401, 2014.

ISSN: 2447-6161