



IV ENCONTRO INTERNACIONAL DE BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE HUMANA E ANIMAL:

AVANÇOS E TENDÊNCIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA SAÚDE HUMANA E ANIMAL

AVALIAÇÃO DA FRAGMENTAÇÃO DE DNA E ESTRESSE OXIDATIVO EM COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITOS BOVINOS IMATUROS APÓS VITRIFICAÇÃO UTILIZANDO DOIS BLOQUEADORES DE GELO

Maria Bianca de Almeida Silva¹; Alesandro Silva Ferreira¹; Gustavo Bezerra Nobre do Vale²;
Éverton Pimentel Ferreira Lopes³; Gildas Mbemya Tetaping⁵; Rebeca Magalhães Pedrosa Rocha⁴;
José Ricardo de Figueiredo⁵; Ana Paula Ribeiro Rodrigues⁵

¹Graduando em Farmácia pela Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB), Redenção-CE; ²Graduando em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza-CE; ³Pós-graduando em biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO/UECE), Fortaleza-CE; ⁴Docente do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB), Redenção-CE; ⁵Docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-CE.
bianca.almeida1529@gmail.com

RESUMO

A criopreservação é uma importante ferramenta que contribui para a conservação do material genético reprodutivo em animais e/ou humanos. Durante o processo de criopreservação pode ocorrer um aumento excessivo de radicais livres e consequentemente possíveis danos nas organelas ou no material genético das células. No intuito de evitar esses possíveis inconvenientes, pesquisadores relataram o benefício da adição de substâncias que confirmam proteção aos oócitos durante a redução drástica de temperatura. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a fragmentação de DNA e a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio após a vitrificação utilizando dois bloqueadores de gelo, seguida de maturação *in vitro* de CCOs bovinos. Para tanto, CCOs bovinos foram aspirados de folículos antrais (3-6 mm) e selecionados para vitrificação utilizando polímeros sintéticos (PS) ou proteínas anticongelantes (PAC III). Após a vitrificação/aquecimento, os CCOs foram destinados à MIV por 24h. De acordo com nossos achados, a vitrificação utilizando PS apresentou menor porcentagem de danos no DNA em relação ao protocolo de vitrificação utilizando PAC III. Além disso, vale destacar que o protocolo PAC III apresentou maiores níveis de estresse oxidativo em relação ao controle fresco. Diante do exposto, a vitrificação utilizando polímeros sintéticos parece ser mais eficaz contra a fragmentação de DNA para a vitrificação de CCOs bovinos imaturos.

PALAVRAS-CHAVES: Criopreservação; Oócitos; Aditivos crioprotetores.

1 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). Basicamente os oócitos podem ser criopreservados por congelamento lento ou por vitrificação. A congelamento lento utiliza equipamentos programáveis para redução gradativa de temperatura e baixas concentrações de crioprotetores. Por outro lado, a vitrificação vem ganhando destaque, pois promove a redução drástica de temperatura, utilizando concentrações elevadas de agentes crioprotetores (ACP), reduzindo a formação de cristais de gelo (FULLER, 2004). Contudo, relatos como estágio meiótico, alterações de osmolaridade, estresse oxidativo, toxicidade e recristalização, podem ser considerados inconvenientes nessa técnica (CHANG et al., 2022). Dessa forma, a utilização de bloqueadores de gelo como os polímeros sintéticos e as proteínas anticongelantes durante a vitrificação de oócitos torna-se fundamental para observar os possíveis efeitos dessas substâncias a fim de evitar danos celulares e estabelecer protocolos de vitrificação adequados para essas estruturas.

2 OBJETIVO

Avaliar danos ao DNA e o estresse oxidativo após vitrificação e maturação *in vitro* de CCOs bovinos na presença de polímeros sintéticos (PS) e proteínas anticongelantes (PAC III).

3 MATERIAIS E MÉTODO

CCOs foram puncionados, selecionados e distribuídos aleatoriamente em dois grupos: frescos e vitrificados. Uma parte dos CCOs foram imediatamente destinados a MIV por 24h (controle fresco), enquanto os CCOs destinados à vitrificação, foram submetidos a dois protocolos: (1) utilizando polímeros sintéticos (PS) ou (2) proteínas anticongelantes (PAC III). No protocolo de PS, os CCOs foram expostos a três diferentes soluções de equilíbrio (SE) que tem como meio de base (MB) o MEM-HEPES suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB) e 100 μ M de ALA, sendo diferenciada pela adição de 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) na SE 1; 15% de DMSO e etilenoglicol (EG) na SE 2; e 30% de ambos os ACPs na SE 3, por 5, 3 e 2 minutos respectivamente em temperatura ambiente (TA). Em seguida, os CCOs foram transferidos para a solução de vitrificação (SV) composta por 50% da SE adicionada de 10% de PS (5% de Polivinilpirrolidona – PVP, 2.5% de Supercool X-1000 e 2.5% de Supercool Z-1000) por 10 segundos. No protocolo utilizando PAC III, os CCOs foram expostos à SE composta por MEM-HEPES suplementado com 20% (v/v) de SFB, 7,5% de DMSO e 7,5% de EG por 15 min. Em seguida, os CCOs foram expostos à SV composta por MEM-HEPES plus 20% de SFB, 16% de DMSO, 16 % de EG, 100

μM de ALA e 1M de sacarose por 20 segundos. Foram adicionadas em ambas as soluções (SE e SV) 1000 ng/mL de PAC III. Em ambos os protocolos para a vitrificação propriamente dita, grupos de 5-10 CCOs foram transferidos para palhetas de 0,25 mL (MINITUBE BRASIL) e envasadas com SV e seladas com PVA. Em seguida, as palhetas foram expostas ao vapor de nitrogênio líquido (NL_2) por 2 minutos e então mergulhadas diretamente no NL_2 sendo crioestocadas por uma semana.

Após esse período, os CCOs foram aquecidos e maturados em Tissue Culture Medium (TCM-199) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), piruvato de sódio 0,2 mM, L-glutamina 2 mM, gentamicina 50 mg/mL, 10 UI/mL gonadotrofina coriônica equina (eCG) e 10 UI/mL de gonadotrofina coriônica humana (hCG) por 24 horas. Ao final da MIV, foram avaliados quanto aos níveis de fragmentação do DNA pelo ensaio de cometa alcalino e pela presença de radicais livres intracelular e no meio de MIV.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nossos dados mostraram que o controle positivo (H_2O_2) e os grupos vitrificados (PS e PAC III) apresentaram uma porcentagem maior de DNA comprometido em relação ao controle negativo (controle fresco). Vale destacar, que a vitrificação utilizando o protocolo PS apresentou uma menor porcentagem de danos no DNA em relação ao protocolo PAC III (25% vs. 43%, respectivamente) ($P < 0,05$). Em relação aos scores de distribuição de danos no DNA foi possível observar que o protocolo PS apresentou menores níveis de danos (score 2) em relação ao protocolo PAC III. Berthelot-Ricou et al (2013) demonstraram que a vitrificação de oócitos de camundongos induziu danos estatisticamente maiores ao DNA em comparação com o grupo de controle negativo. Já foi demonstrado que a vitrificação de oócitos imaturos em suínos, apresentou aumento das quebras da dupla fita de DNA, que permaneceram no estágio de clivagem subsequente do embrião e reduziram sua capacidade de desenvolvimento (SOMFAI et al., 2023).

Em relação ao estresse oxidativo, os dados mostraram que o controle positivo apresentou maior concentração de radicais livres em relação aos grupos vitrificados e controle fresco (negativo). Por outro lado, os CCOs vitrificados não diferiram entre si na produção de radicais livres (ERO e ERN), entretanto, o protocolo PAC III apresentou maior concentração de ERO e ERN em relação ao controle fresco. Gutiérrez-Castillo et al (2023) mostraram que oócitos bovinos maturados *in vitro* e vitrificados mantiveram os níveis de espécies reativas semelhantes ao controle. A vitrificação é responsável pela geração excessiva de EROs e nitrogênio (ERNs), devido a exposição às altas concentrações de agentes crioprotetores, causando alterações estruturais e metabólicas (DEVASAGAYAM et al., 2004). Além disso, Galeati et al. (2011) relataram que o estresse oxidativo induzido pela vitrificação de oócitos porcinos resultou na redução da viabilidade e capacidade de fertilização e no aumento da senescência.

5 CONCLUSÕES

Diante do exposto, a vitrificação utilizando polímeros sintéticos parece ser mais eficaz contra a fragmentação de DNA para a vitrificação de CCOs bovinos imaturos.

REFERÊNCIAS

ANGEL-VELEZ, D.; COSTER, T.; AZARI-DOLATAB, N.; FERNÁNDEZ-MONTORO, A.; BENEDETTI, C.; PAVANI, K.; SOOM, A.V.; PASCOTTINI, O.B.; SMITS, K. Embryo morphokinetics derived from fresh and vitrified bovine oocytes predict blastocyst development and nuclear abnormalities. **Scientific Reports**, v.13, n.1, p.4765, 2023.

BERTHELOT-RICOU, A.; PERRIN, J.; DI GIORGIO, C.; MEO, M.; BOTTA, A.; COURBIERE, B. Genotoxicity assessment of mouse oocytes by comet assay before vitrification and after warming with three vitrification protocols. **Fertility and sterility**, v.100, n.3, p.882-888, 2013.

CHANG, C.; SHAPIRO, D.B.; NAGY, Z.P. The effects of vitrification on oocyte quality. **Biology of Reproduction**, v.106, n.2, p.316-327, 2022.

DEVASAGAYAM, T.P.A.; TILAK, J.C.; BOLOOR, K.K.; SANE, K.S.; GHASKADBI, S.S.; LELE, R.D. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. **Japi**, v.52, n.794804, p.4, 2004.

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

GALEATI, G.; SPINACI, M.; VALLORANI, C.; BUCCI, D.; PORCU, E.; TAMANINI, C. Pig oocyte vitrification by cryotop method: effects on viability, spindle and chromosome configuration and *in vitro* fertilization. **Animal Reproduction Science**, v.127, n.1-2, p.43-49, 2011.

GUTIERREZ-CASTILLO, E.; DIAZ, F.A.; TALBOT, S.A.; BONDIOLI, K.R. Effect of bovine oocyte vitrification with EGTA and post-warming recovery with resveratrol on meiotic spindle, mitochondrial function, reactive oxygen species, and developmental competence. **Theriogenology**, v.196, p.59-67, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.11.006>.

PEINADO, I.; MOYA, I.; GARCIA-VALVERDE, L.; FRANCÉS, R.; RIBES, R.; POLO, P.; GÓMEZ-TORRES, M.J.; MONZÓ, A. 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.

SOMFAI, T.; HARAGUCHI, S.; DANG-NGUYEN, T.Q.; KANEKO, H.; KIKUCHI, K. Vitrification of porcine immature oocytes and zygotes results in different levels of DNA damage which reflects developmental competence to the blastocyst stage. **Plos one**, v.18, n.3, p.e0282959, 2023.