



Criopreservação e xenotransplante de tecido ovariano

Cryopreservation and xenotransplantation of ovarian tissue

M.C. Matos^{1,4}, M.B. Bezerra² W.R.R. Vicente³

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

²Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal do Semiárido, Mossoró, RN, Brasil.

⁴Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

⁴Correspondência: marciacmattos@yahoo.com.br

Resumo

A criopreservação de tecido ovariano é uma biotécnica alternativa potencialmente útil na formação de bancos de células germinativas para a estocagem de DNA de espécies de alto valor zootécnico, raras ou em extinção. Além disso, gera grandes perspectivas na preservação da fertilidade de pacientes com câncer ou com problemas de infertilidade que possam provocar falha ovariana prematura. A criopreservação aliada ao processo de xenotransplante é um campo vasto para pesquisas, abrangendo desde métodos e protocolos mais efetivos de preservação até aspectos fundamentais da foliculogênese.

Palavras-chave: congelamento lento, folículos pré-antrais, transplante de tecido ovariano, vitrificação.

Abstract

Cryopreservation of ovarian tissue is an alternative biotechnology potentially useful to implement gene DNA banks of livestock animals, rare and endangered species. Furthermore, it generates great prospects to save the fertility of patients with cancer or infertility problems that can cause premature ovarian failure. The cryopreservation combined with xenotransplantation is an ample field for research, ranging from more effective methods and protocols, including fundamental aspects of folliculogenesis.

Keywords: freezing, ovarian tissue transplantation, preantral follicles, vitrification.

Introdução

Nas últimas décadas, avanços importantes ocorreram no desenvolvimento de técnicas para recuperação e crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais (FOPA). Em várias espécies, como em ruminantes, os métodos de isolamento de FOPA dos demais componentes do estroma ovariano são eficazes. Entretanto, apesar da recuperação, o cultivo *in vitro* e a manutenção da viabilidade dessas estruturas constituem um grande desafio. Os entraves de baixa viabilidade e tempo no cultivo de FOPA motivam os pesquisadores a estabelecerem protocolos eficientes de criopreservação de tecido ovariano, para que os gametas possam ser conservados até que sistemas de cultivo *in vitro* também eficientes sejam desenvolvidos.

A capacidade de criopreservar a estrutura e a função de células e tecidos exerce um controle central em várias áreas da biologia e da medicina (Gook e Edgar, 2007). Em particular, a criopreservação de tecido ovariano em animais é uma estratégia promissora para programas conservacionistas e de melhoramento genético. Além disso, em medicina humana, tal técnica tem o propósito de preservar a fertilidade, especialmente em pacientes jovens com câncer ou em mulheres com risco de falha ovariana prematura.

A criopreservação de tecido ovariano é uma biotécnica de grande potencial na conservação dos gametas femininos, com a obtenção de oócitos viáveis para a posterior fertilização em várias espécies. Com essa finalidade, é necessário estabelecer estratégias para gerar embriões a partir dos FOPA criopreservados e, nesse sentido, a técnica de xenotransplante (transplante entre espécies) é uma ferramenta importante no intuito de promover o desenvolvimento dos FOPA criopreservados e a maturação oocitária.

Criopreservação de tecido ovariano

Com relação às técnicas de criopreservação, não existe um consenso sobre o método, as dimensões dos fragmentos, os agentes crioprotetores ou o que ocorre após a descongelamento (Courbiere et al., 2006). Geralmente o tecido ovariano é criopreservado em tiras finas ou em pequenos cubos, para que ocorra um balanço delicado no tempo de penetração do crioprotetor no tecido, de maneira que exerça seu efeito protetor (Paris et al., 2004).



De modo geral, estudiosos investigam a possibilidade de preservar o córtex ovariano por diferentes métodos de congelação lenta ou rápida, na qual se inclui o processo de vitrificação. A congelação lenta utiliza taxas de congelação ótimas à célula, porém produz cristais de gelo extracelulares que são prejudiciais ao tecido ao redor. De outra maneira, na vitrificação a solução é amorfa, denominada de fase sólida vítrea, prevenindo a formação de cristais de gelo no tecido (Pegg, 2001).

A congelação lenta ou convencional é caracterizada pela exposição do tecido a baixas concentrações de agente crioprotetor (~1,5 M/l; Paynter, 2000) por período que varia de 20 (Rodrigues et al., 2004a, b) a 60 minutos (Candy et al., 1997), seguido de uma lenta e gradual redução de temperatura. O método padrão é baseado no protocolo de congelação de embriões, que corresponde à taxa de 0.3°C/min e *seeding* manual (Carroll et al., 1990).

Desde o início da década de 80, os protocolos de congelação melhoraram a sobrevivência celular quando comparados aos protocolos iniciais dos anos 50, devido às taxas mais lentas de congelação (Demirci et al., 2003). Com isso, na congelação convencional, a formação de cristais de gelo no meio intracelular pode ser evitada pelo resfriamento lento, permitindo adequada desidratação, e a água intracelular remanescente se mantém em potencial de equilíbrio com a solução extracelular e o gelo formado (Mazur et al., 2005).

A vitrificação surgiu como um método alternativo à congelação lenta (Rall e Fahy, 1985). O processo consiste na congelação ultrarrápida do material biológico, que alcança diretamente o estado vítreo sem exposição ao estado cristalino, evitando, assim, a formação de gelo intracelular. Nesse processo, o tecido é exposto a altas concentrações de crioprotetores penetrantes, geralmente entre 20 (Isachenko et al., 2003) e 40% (Salehnia et al., 2002), em pequenos volumes de solução e submergido diretamente em nitrogênio líquido.

Os métodos de vitrificação apresentam vantagens sobre o convencional, como o baixo custo, já que não é necessário utilizar máquina programável de congelação e, além disso, é um processo extremamente rápido. Todavia, apesar de a vitrificação simplificar o processo de congelação, sabe-se que os crioprotetores podem causar toxicidade, formação de gelo extracelular e efeitos osmóticos adversos (Santos et al., 2007).

Com o objetivo de melhorar as taxas de congelação, novos procedimentos de vitrificação foram planejados para reduzir o volume da solução de criopreservação, como, por exemplo, a técnica de grades de microscopia eletrônica de transmissão (MET; Martino et al., 1996), Open Pulled Straws (OPS; Vajta et al., 1998) e Superfície Sólida (SS; Dinnye's et al., 2000). Embora os diferentes métodos de vitrificação apresentem resultados promissores, a congelação convencional ainda é o método mais comumente utilizado para a preservação do tecido ovariano.

Xenotransplante

Independentemente do processo de criopreservação a ser empregado, é necessário que a viabilidade folicular possa ser efetivamente avaliada após a descongelação do fragmento conservado. Com essa finalidade, a técnica de xenotransplante do tecido ovariano criopreservado para camundongos imunossuprimidos se apresenta como modelo para o estudo do desenvolvimento folicular (Gosden et al., 1994b; Oktay et al., 1998) e dos efeitos da criopreservação sobre a viabilidade folicular (Newton et al., 1996).

Os animais imunossuprimidos, *Nude* (sem linfócitos T) ou *SCID* (*severe combined immunodeficiency*; sem linfócitos B e T), são produzidos a partir de manipulação genética e, nesse caso, perdem a capacidade de uma resposta imune humoral. Isso possibilita que sejam usados como receptores e funcionem como excelentes modelos experimentais para uso em xenotransplante (Aubard, 2003).

Gosden et al. (1994b) foram os primeiros a sugerirem o xenotransplante como processo de maturação folicular. No estudo, fragmentos frescos de córtex ovariano de ovelhas e gatas foram xenotransplantados sob a cápsula renal de camundongos *SCID*. Os autores constataram, durante período de nove meses, sobrevivência e desenvolvimento folicular até o estágio antral. A partir desses dados, a ativação de folículos primordiais, seguida do crescimento até o início do estágio antral, foi obtida após xenotransplante de tecido ovariano em roedores imunossuprimidos em várias espécies, como, por exemplo: saguis (Candy et al., 1995), elefantes (Gunasena et al., 1998), humanos (Oktay et al., 1998), bovinos (Senbon et al., 2003; Hernandez-Fonseca et al., 2005), marsupiais (Mattiske et al., 2002) e gatos (Bosch et al., 2004).

Em humanos, Dath et al. (2010) inseriram fragmentos ovarianos provenientes de oito pacientes congelados convencionalmente (Gosden et al., 1994a) em diferentes sítios de transplante em camundongos (peritônio, bursa ovariana, sob a pele e no músculo; Fig. 1). Na avaliação microscópica do estudo, os quatro sítios de transplante suportaram igualmente o crescimento folicular inicial e preservaram os folículos quiescentes.

Em relação à espécie bovina, pesquisadores relataram a manutenção da morfologia folicular e da viabilidade do tecido ovariano por meio da congelação lenta (Lucci et al., 2004; Celestino et al., 2008) ou vitrificação (Gandolfi et al., 2006). Resultados similares foram citados após a vitrificação e subsequente alotransplante de tecido ovariano (Kagawa et al., 2009).

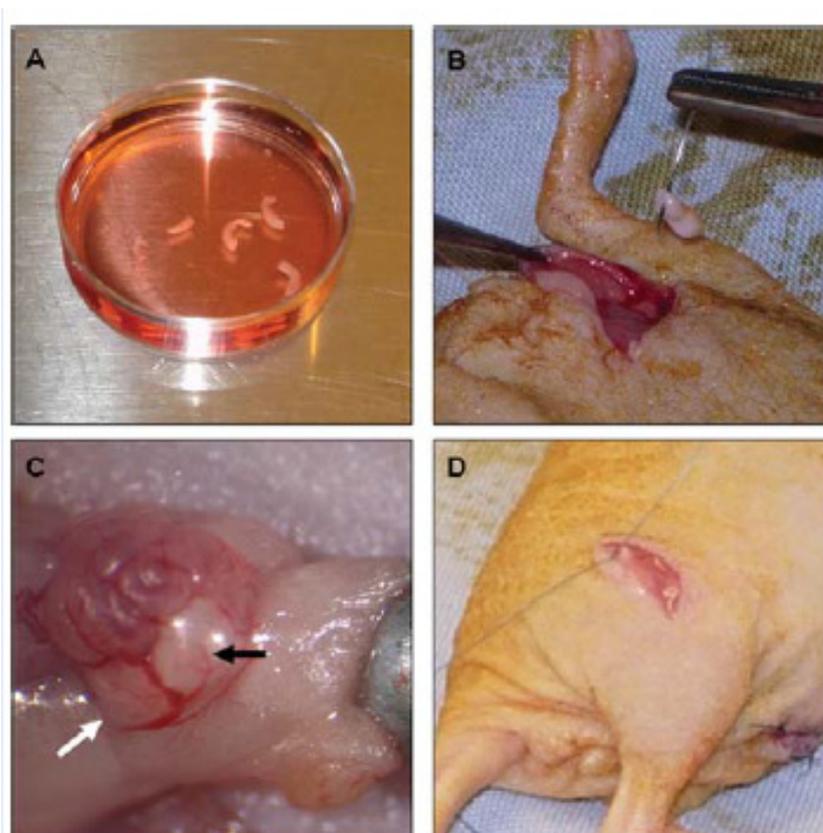


Figura 1. Ilustração do procedimento de xenotransplante de tecido ovariano humano: (A) Fragmentos descongelados de córtex de ovário humano. (B) laparotomia mediana para xenotransplante intraperitoneal (IP) e subcutâneo (SC). (C) Fragmento inserido (seta preta) na bursa ovariana de camundongo (OB; seta branca), visualizados por microscopia. (D) Incisão na coxa direita para inserção de fragmento ovariano na musculatura (Dath et al., 2010).

No processo de xenotransplante, os folículos são expostos a condições adversas, como: isquemia, temperatura e pH corporais diferentes e reações imunológicas. Com isso, o desenvolvimento folicular e a qualidade do oócito podem ser prejudicados (Britt, 1991). Nesse contexto, demonstra-se que a maior perda de viabilidade folicular ocorre pela isquemia e não pelas injúrias durante o processo de congelamento e descongelamento (Newton et al., 1996). Há evidências de que o sucesso do transplante do tecido ovariano está relacionado aos empenhos para minimizar a injúria isquêmica antes e durante o estabelecimento da angiogênese no tecido transplantado (Weissman et al., 1999).

Diante desses e outros fatores, o sítio mais apropriado para o transplante ainda não foi determinado, pois os resultados são ainda contraditórios. Vários sítios foram sugeridos: intraperitoneal, sob a cápsula renal e subcutâneo (Schubert et al., 2008). Um dos sítios preferidos para o transplante do tecido ovariano no tecido receptor é sob a cápsula renal. Este sítio de transplante tem sido escolhido devido à alta vascularização e proteção ao tecido transplantado (Gosden et al., 1994b).

Em estudo recente e, ainda não publicado, folículos pré-antrais de fragmentos ovarianos de fetos bovinos cultivados sob a cápsula renal de camundongas imunodeficientes, cresceram até estádios antrais a partir de 30 dias após o xenotransplante sob resposta a protocolos hormonais (Bezerra et al., 2010).

Avanços e perspectivas

O primeiro relato de criopreservação de tecidos ovarianos bem-sucedida foi descrito em camundongos e, desde então, descendentes normais foram obtidos também em ovinos e humanos. Entretanto, os métodos de congelamento ainda são considerados experimentais e, com isso, a vitrificação tem se destacado como uma alternativa promissora. A possibilidade de criopreservar com sucesso o tecido ovariano humano pelo método direto de imersão em nitrogênio líquido somente com o uso de crioprotetores penetrantes já é um fato amplamente considerado. Em ovinos, já foram obtidos gestação e nascimento após o autotransplante ortotópico de hemi-ovários vitrificados, porém dados de vitrificação de tecido ovariano bovino ainda são limitados.

Com relação ao xenotransplante de tecido ovariano, foi demonstrado o crescimento de folículos



primordiais bovinos até o estágio antral por meio de xenotransplante em camundongos *SCID*, com dimensões suficientes para maturação *in vitro*. Dessa maneira, embora seja possível a ativação FOPA bovinos em xenotransplantes, ainda não há relatos de gestação ou nascimento a partir de tecido xenotransplantado na espécie.

Contudo, embora a criopreservação de tecidos ovarianos aliada à ferramenta do xenotransplante tenha alcançado sucesso em algumas espécies, faz-se necessário seu aperfeiçoamento por meio do desenvolvimento de condições ótimas de criopreservação e transplante, assim como o desenvolvimento e o aprimoramento dos protocolos de cultivo folicular, considerando que o maior obstáculo está na diversidade biológica do tecido ovariano entre espécies.

Referências bibliográficas

- Aubard Y.** Ovarian tissue xenografting. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, v.108, p.14-18, 2003.
- Bezerra MB.** *Folículos ovarianos pré-antrais bovinos: cultivo in vitro e xenotransplante*. 2010. 63f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, 2010.
- Bosch P, Hernandez-Fonseca HJ, Miller DM, Wininger JD, Massey JB, Lamb SV.** Development of antral follicles in cryopreserved cat ovarian tissue transplanted to immunodeficient mice. *Theriogenology*, v.61, p.581-94, 2004.
- Britt JH.** Impacts of early postpartum metabolism on follicular development and fertility. *Bovine Pract*, v.24, p.39-43, 1991.
- Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG.** Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. *J Reprod Fertil*, v.110, p.11-19, 1997.
- Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG.** Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation. *Hum Reprod*, v.10, p.2334-2338, 1995.
- Carroll J, Whittingham DG, Wood MJ, Telfer E, Gosden RG.** Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. *J Reprod Fertil*, v.90, p.321-327, 1990.
- Celestino, JJ, Santos RR, Lopes CA, Martins FS, Matos MH, Melo MA, Bão SN, Rodrigues AP, Silva JR, Figueiredo JR.** Preservation of bovine preantral follicle viability and ultra-structure after cooling and freezing of ovarian tissue. *Anim Reprod Sci*, v.108, p.309-318, 2008.
- Choi WJ, Yeo HJ, Shin JK, Lee SA, Lee JH, Paik WY.** Effect of vitrification method on survivability, follicular growth and ovulation of preantral follicles in mice. *J Obstet Gynaecol Res*, v.33, p.128-133, 2007.
- Courbiere B, Odagescu V, Baudot A, Massardie J, Mazoyer C, Salle B, Lornage J.** Cryopreservation of the ovary by vitrification as an alternative to slow-cooling protocols. *Fertil Steril*, v.86, suppl.3, p.1243-1251, 2006.
- Dath C, Van Eyck AS, Dolmans MM, Romeu L, Delle Vigne L, Donnez J, Van Langendonck A.** Xenotransplantation of human ovarian tissue to nude mice: comparison between four grafting sites. *Hum Reprod*, v.25, p.1734-1743, 2010.
- Demirci B, Lornage J, Salle B, Poirel MT, Guerin JF, Franck M.** The cryopreservation of ovarian tissue: uses and indications in veterinary medicine. *Theriogenology*, v.60, p.999-1010, 2003.
- Dinnye's A, Dai Y, Jiang S, Yang X.** High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod*, v.63, p.513-518, 2000.
- Gandolfi F, Paffoni A, Papasso Brambilla E, Bonetti S, Brevini TA, Ragni.** Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. *Fertil Steril*, v.85, p.1150-1156, 2006.
- Gook DA, Edgar DH.** Human oocyte cryopreservation. *Hum Reprod Update*, v.13, p.591-605, 2007.
- Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R.** Restoration of fertility to oophorectomised sheep by ovarian autografts stored at -196°C. *Hum Reprod*, v.9, p.597-603, 1994a.
- Gosden RG, Boulton MI, Grant K, Webb R.** Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice. *J Reprod Fertil*, v.101, p.619-623, 1994b.
- Gunasena KT, Lakey JRT, Villines PM, Bush M, Raath C, Critser ES.** Antral follicles develop in xenografted cryopreserved African elephant (*Loxodonta africana*) ovarian tissue. *Anim Reprod Sci*, v.53, p.266-275, 1998.
- Hernandez-Fonseca HJ, Bosch P, Miller DM, Wininger JD, Massey JB, Brackett BG.** Time course of follicular development after bovine ovarian tissue transplantation in male non-obese diabetic severe combined immunodeficient mice. *Fertil Steril*, v.83, suppl.1, p.1180-1187, 2005.
- Isachenko E, Isachenko V, Ramih G, Nawroth F.** Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, v.108, p.186-193, 2003.
- Kagawa N, Silber S, Kuwayama M.** Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online*, v.18, p.568-577, 2009.
- Lucci CM, Kacinskis MA, Lopes LH, Rumpf R, Bão SN.** Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. *Theriogenology*, v.61, p.1101-1114,



2004.

Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod*, v.54, p.1059-1069, 1996.

Mattiske, D, Shaw, G, Shaw, JM. Influence of donor age on development of gonadal tissue from pouch young of the tammar wallaby, *Macropus eugenii*, after cryopreservation and xenografting into mice. *Reproduction*, v.123, p.143-153, 2002.

Mazur P, Seki S, Pinn IL, Kleinhans FW, Edashige K. Extra and intracellular ice formation in mouse oocytes. *Cryobiology*, v.51, p.29-53, 2005.

Newton H, Aubard Y, Rutherford A, Sharma V, Gosden RG. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum Reprod*, v.11, p.1487-1491, 1996.

Oktay K, Newton H, Mullan J, Gosden RG. Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. *Hum Reprod*, v.13, p.1133-1138, 1998.

Paris MCJ, Snow M, Cox S-L, Shaw JM. Xenotransplantation: a tool for reproductive biology and animal conservation? *Theriogenology*, v.61, p.277-291, 2004.

Paynter SJ. Current status of the cryopreservation of human unfertilized oocytes. *Hum Reprod Update*, v.6, p.449-456, 2000.

Pegg DE. The current status of tissue cryopreservation. *Cryo Lett*, v.22, p.105-14, 2001.

Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature*, v.24, p.387-402, 1985.

Rodrigues APR, Amorim CA, Costa SHF, Matos MHT, Santos RR, Lucci CM, Bao SN, Figueiredo JR. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. *Theriogenology*, v.61, p.1009-1024, 2004a.

Rodrigues APR, Amorim, CA, Costa SHF, Matos MHT, Santos RR, Lucci CM, Bao SN, Ohashi OM, Figueiredo JR. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. *Anim Reprod Sci*, v.84, p.211-227, 2004b.

Salehnia M, Abbasian ME, Rezazadeh VM. Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue. *Fertil Steril*, v.178, p.644-645, 2002.

Santos RR, Tharasanit T, Van Haeften T, Figueiredo JR, Silva JRV, Van den Hurk R. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. *Cell Tissue Res*, v.327, p.167-176, 2007.

Schubert B, Canis M, Darcha C, Artonne C, Smitz J, Grizard G. Follicular growth and estradiol follow-up after subcutaneous xenografting of fresh and cryopreserved human ovarian tissue. *Fertil Steril*, v.89, p.1787-1794, 2008.

Senbon S, Ota A, Tachibana M, Miyano T. Bovine oocytes in secondary follicles grow and acquire meiotic competence in severe combined immunodeficient mice. *Zygote*, v.11, p.139-149, 2003.

Vajta G. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev*, v.51, p.53-58, 1998.

Weissman A, Gottlieb L, Colgan T, Jurisicova A, Greenblatt EM, Casper RF. Preliminary experience with subcutaneous human ovarian cortex transplantation in the NOD-SCID mouse. *Biol Reprod*, v.60, p.1462-1467, 1999.