

## CRIOPRESERVAÇÃO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CANINOS COM GLICEROL E ETILENOGLICOL

Kele Amaral Alves<sup>1</sup>, Benner Geraldo Alves<sup>1</sup>, Marcelo Emílio Beletti<sup>2</sup>, Aline Costa Lúcio<sup>2</sup>, José Octavio Jacomini<sup>2</sup>

<sup>1</sup> UFG

<sup>2</sup> UFU

Correspondência: Kele Amaral Alves: kelevet@gmail.com

**RESUMO:** Objetivou-se com este estudo avaliar o efeito dos crioprotetores glicerol e etilenoglicol em duas concentrações (1,5 M e 3,0 M) sobre a viabilidade de folículos pré-antrais caninos após exposição e criopreservação. Ovários (n=8) de cadelas, sem raça definida, foram submetidos ao processo de isolamento mecânico simples para resgate dos folículos pré-antrais. Em seguida, amostras do pool folicular foram destinadas ao teste de toxicidade com exposição de 20 min ao glicerol e etilenoglicol e após congelamento/descongelamento, analisadas quanto a viabilidade pelo corante fluorescente iodeto de propídeo. No teste de toxicidade, apenas o grupo que utilizou etilenoglicol a 1,5 M (51,5%) não apresentou redução significativa da viabilidade folicular em relação ao controle (63,2%). Após os procedimentos de criopreservação, a viabilidade foi consideravelmente menor em todos os grupos, sendo 12% para glicerol (1,5 M), 15,5% para etilenoglicol (1,5 M), 14% para glicerol (3,0 M) e 28% para etilenoglicol (3,0 M). Ressaltando-se a necessidade de aperfeiçoamento das técnicas de criopreservação de folículos pré-antrais caninos, conclui-se que o etilenoglicol demonstrou os melhores resultados após o período de exposição e procedimentos de congelamento/descongelamento.

**Palavras-chave:** crioprotetores; descongelamento; toxicidade; viabilidade folicular

## CRYOPRESERVATION OF CANINE PREANTRAL FOLLICLES WITH GLYCEROL AND ETHYLENE GLYCOL

**ABSTRACT:** The aim of this work was evaluate glycerol and ethylene glycol cryoprotective effects at 1.5 M and 3.0 M under canine preantral follicles viability after exposure and cryopreservation. Eight ovarian of non defined breed bitches was mechanically isolated to rescue the preantral follicles. Then were separated aliquots for after toxicity test with 20 min of exposure and after cryopreservation with glycerol and ethylene glycol using propidium iodide dye at confocal inverted microscope. The follicles were considered viable if were not stained. On the toxicity test only the group that used ethylene glycol at 1.5 M did not shown significant reduction of viability (51.5%) compared with control group (63.2%). After cryopreservation, the follicular viability was significantly lower in all groups, being, 12% for glycerol (1.5 M), 15.5% for ethylene glycol (1.5 M), 14% for glycerol (3.0 M) and 28% for ethylene glycol (3.0 M). Emphasizing the need for improvement of canine preantral follicles cryopreservation, this study concludes that ethylene glycol demonstrated the best results after the exposure period and freezing/thawing procedures.

**Key Words:** cryoprotectants; thawing; toxicity; follicular viability

## INTRODUÇÃO

A preocupação com mudanças climáticas e perdas ambientais tem aumentado o interesse da comunidade internacional em pesquisas que envolvem técnicas de conservação da biodiversidade ou que propiciem o aumento da produção de alimentos com maior sustentabilidade. A criopreservação de gametas femininos está inserida neste contexto visto que da mesma forma que propicia a preservação de material genético de espécies ameaçadas, através de bancos de germoplasma animal, também estimula o aumento da eficiência reprodutiva de animais de alto valor zootécnico.

Os folículos pré-antrais (FPA) representam a reserva de gametas femininos a qual pode ser resgatada do processo de atresia por meio de técnicas de isolamento folicular (mecânico ou enzimático). Todavia, é imprescindível o desenvolvimento de biotecnologias eficientes de conservação dos FPA isolados, uma vez que a manipulação e cultivo imediatos de um grande número destas estruturas seriam inexequíveis (Santos *et al.*, 2006).

A preservação de ovócitos imaturos em folículos pré-antrais é vantajosa, devido a menores taxas metabólicas, número reduzido de organelas, formação incompleta da zona pelúcida e menor proporção volume/superfície, tornando-os menos vulneráveis a congelação (Ruffing *et al.*, 1993). Ovócitos imaturos demonstraram melhor eficiência nas taxas de clivagem e de produção de blastocistos, após o processo de vitrificação, indicando melhor resistência a crioinjúria (Zhou *et al.*, 2010).

A taxa de sobrevivência de ovócitos após a criopreservação é afetada por fatores morfológicos e biofísicos, como a formação de gelo

intracelular e injúrias osmóticas (Morató *et al.*, 2008). Esses efeitos negativos podem ser reduzidos com a utilização de agentes crioprotetores, que permitem preservar as células a temperaturas extremamente baixas. Os crioprotetores glicerol (Gli) e etilenoglicol (Eti) podem suprimir a temperatura de formação de gelo intracelular e estabilizar a membrana celular minimizando o desequilíbrio hidroeletrólítico (Mazur e Kleinhans, 2008).

Antes da aplicação de protocolos de criopreservação é necessário determinar o agente crioprotetor, sua concentração, tempo de exposição, método de congelação, descongelação e remoção do crioprotetor, além de avaliar a viabilidade das estruturas submetidas ao processo. Para tanto, pode-se adotar o uso de sondas fluorescentes que indiquem células cuja membrana nuclear e sistema de transporte ativo estejam prejudicados (Thomas *et al.*, 2001; Onions *et al.*, 2008). O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito dos crioprotetores glicerol e etilenoglicol, utilizado em duas concentrações (1,5 M e 3,0 M), sobre a viabilidade de folículos pré-antrais caninos após exposição e criopreservação.

## MATERIAL E MÉTODOS

Ovários (n=8) de cadelas sem raça definida, entre 24 e 60 meses de idade, foram coletados após procedimento de ovariohisterectomia. Em seguida, foram lavados em álcool 70% durante 10 seg e armazenados em solução tampão fosfatada (PBS) a 4°C e transportados ao laboratório. Os ovários foram submetidos ao procedimento mecânico de isolamento, utilizando o aparelho fatiador de tecidos ajustado para intervalos de corte de 500 µm (Alves *et al.*, 2012b). Os fragmentos ovarianos foram colocados em recipiente contendo 15 mL de PBS com 10% de soro fetal

bovino para dissociação celular, utilizando-se sucessivamente pipetas de Pasteur de 1600 e 600  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Posteriormente, a suspensão foi filtrada em malhas de náilon de 500  $\mu\text{m}$  e 100  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

Da suspensão de FPA isolados foram retiradas nove amostras de 1000  $\mu\text{L}$  cada. No grupo controle foi adicionado o corante fluorescente iodeto de propídeo (IP) na concentração final de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Após 10 min, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, foram retirados 50  $\mu\text{L}$  e colocados em lâmina e lamínula para leitura da viabilidade em microscópio invertido com fluorescência. Os FPA foram considerados não viáveis quando o núcleo era marcado em vermelho (Figura 1), indicando a absorção do fluorocromo (Alves *et al.*, 2012a). Para o teste de toxicidade (T), quatro amostras do pool folicular foram direcionadas aos tratamentos com glicerol (Gli 1,5 e Gli 3,0) e etilenoglicol (Eti 1,5 e Eti 3,0) a 1,5 e 3,0 M. Após o período de exposição de 20 min, à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas duas vezes (250 g x 2 min), para remoção do crioprotetor, e ressuspensas com PBS para posterior análise da viabilidade com IP.

As amostras (quatro) destinadas à criopreservação (C), pelo método convencional de congelamento, receberam os crioprotetores na concentração final de 1,5 e 3,0 M de glicerol e etilenoglicol. Após equilíbrio com o crioprotetor, por 20 min a temperatura ambiente, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 mL, colocadas em congelador programável e refrigeradas até  $-7^{\circ}\text{C}$  a uma taxa de  $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . A cristalização foi realizada manualmente com auxílio de um swab, após imersão em nitrogênio líquido. O arrefecimento continuou a  $0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até atingir  $-40^{\circ}\text{C}$  e, em seguida, as palhetas foram imersas e armazenadas em nitrogênio líquido ( $-$

$196^{\circ}\text{C}$ ) por sete dias (Aerts *et al.*, 2005).

A descongelação foi realizada expondo-se as palhetas a temperatura ambiente por 10 seg e em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 seg, dispensando o material em criotubos plásticos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e coradas com IP, seguindo o mesmo protocolo adotado para o controle e toxicidade. Cada ovário constituiu uma repetição, sendo avaliados 200 FPA por tratamento. O teste estatístico Qui-quadrado foi utilizado para analisar os efeitos do glicerol e do etilenoglicol em diferentes concentrações (1,5 e 3,0 M) sobre a porcentagem de FPA viáveis em relação ao grupo controle. Os resultados foram expressos na forma de porcentagem e considerados significativos quando  $P < 0,05$ .

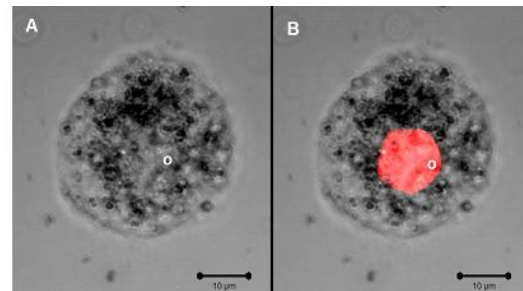


Figura 1 – Análise da viabilidade de folículos pré-antrais de cadelas após os testes de toxicidade e criopreservação. Foliculo pré-antral não viável em contraste de fase (A) com o núcleo (o) marcado por iodeto de propídeo (B). Microscopia de fluorescência.

## RESULTADOS

A viabilidade da amostra controle (63,2%), após procedimento mecânico de isolamento, foi superior ( $P < 0,05$ ) aos outros tratamentos com exceção para o grupo que utilizou etilenoglicol a 1,5 M (51,5%). Quando comparado os tratamentos com a mesma concentração de crioprotetores o número de folículos pré-antrais viáveis foi semelhante. No entanto, na concentração de 3,0 M houve redução significativa da viabilidade em relação aos tratamentos controle e 1,5 M (Tabela 1).

**Tabela 1** - Porcentagem de folículos pré-antrais (FPA) viáveis após teste de toxicidade com diferentes concentrações (1,5 e 3,0 M) de glicerol (Gli) e etilenoglicol (Eti).

	Teste de Toxicidade				
	*Controle	Gli 1,5 M	Gli 3,0 M	Eti 1,5 M	Eti 3,0 M
% FPA Viáveis	63,2 <sup>a</sup> (158/250)	47,5 <sup>b</sup> (95/200)	28,5 <sup>c</sup> (57/200)	51,5 <sup>ab</sup> (103/200)	33,5 <sup>c</sup> (67/200)

<sup>abc</sup>Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente. P<0,05.

\*Controle: sem adição de crioprotetor

O número de folículos pré-antrais viáveis após a criopreservação foi menor em relação à amostra controle (P<0,05). O etilenoglicol 3,0 M apresentou maior viabilidade folicular (28%) após o procedimento. Independente da concentração, não houve efeito sobre a preservação dos folículos quando utilizado o glicerol (Tabela 2). A comparação entre os testes de toxicidade e criopreservação, com o mesmo crioprotetor e concentração, demonstrou que o etilenoglicol a 3,0 M durante a criopreservação foi o único que não apresentou diferença (P>0,05) na viabilidade folicular em relação ao teste de toxicidade.

**Tabela 2** - Porcentagem de folículos pré-antrais (FPA) viáveis após criopreservação com diferentes concentrações (1,5 e 3,0 M) de glicerol (Gli) e etilenoglicol (Eti).

	Teste de Criopreservação				
	*Controle	Gli 1,5 M	Gli 3,0 M	Eti 1,5 M	Eti 3,0 M
% FPA Viáveis	63,2 <sup>a</sup> (158/250)	12,0 <sup>b</sup> (24/200)	15,5 <sup>b</sup> (31/200)	14,0 <sup>b</sup> (28/200)	28,0 <sup>c</sup> (56/200)

<sup>abc</sup>Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente. P<0,05.

\*Controle: sem adição de crioprotetor

## DISCUSSÃO

O procedimento mecânico de isolamento possibilitou a recuperação de uma porcentagem significativa de folículos pré-antrais viáveis (63,2%). Em outras espécies, esta técnica simples e rápida, proporcionou o resgate de milhares de folículos pré-antrais por ovário (caninos: 25200, Alves *et al.*, 2012b; felinos: 12500, Jewgenow e Stolte, 1996; suínos: 599160, Alves *et al.* 2012a; bovinos: 52100; Lucci *et al.*, 2002; caprinos: 1126, Rodrigues *et al.*, 1998).

Uma das teorias primárias de injúrias celulares atribuídas à

criopreservação está relacionada ao estresse osmótico e toxicidade causada pelos crioprotetores (Mullen *et al.*, 2008). Nesse estudo o etilenoglicol e o glicerol demonstraram melhores taxas de viabilidade folicular quando utilizados em menores concentrações (1,5 M). Os efeitos da toxicidade se manifestam de forma diferente entre as espécies (Cocero *et al.*, 1996). Folículos pré-antrais de camundongos expostos ao etilenoglicol (6,0 M) não apresentaram alteração sobre a morfologia e viabilidade (Abedelahi *et al.*, 2009). Em ovinos, o etilenoglicol (1,5 M) não comprometeu a viabilidade dos folículos pré-antrais (Santos *et al.*, 2006). Por outro lado, em bovinos, foi reportado decréscimo da viabilidade celular quando os folículos foram expostos ao etilenoglicol 1,5 M (Lucci *et al.*, 2004).

Várias manipulações de crioprotetores têm sido propostas, no intuito de aumentar a sobrevivência das estruturas criopreservadas, levando em consideração aspectos importantes como permeabilidade da membrana celular, lipídios e água intracelular (Saragusty e Arav, 2011). Além disso, a formação de cristais de gelo no interior da célula depende da velocidade de resfriamento, pois durante o procedimento de congelamento ocorre formação de gelo no espaço extracelular, causando um gradiente osmótico do meio intracelular para a solução congelada extracelular. Dessa forma, a água intracelular vai se deslocar através da membrana ou permanecer no interior da célula, formando cristais de gelo (Devireddy *et al.*, 2002; Jain e Paulson, 2006).

O processo de criopreservação adotado prejudicou a taxa de viabilidade folicular em todas as concentrações, com o etilenoglicol a 3,0 M apresentando o melhor resultado entre os crioprotetores. A perda da viabilidade celular após o processo de criopreservação pode ser explicada pela

quebra das junções entre as células da granulosa e o ovócito, ruptura da membrana basal e nuclear, redução da multiplicação celular e redução da atividade citoplasmática (Van Den Hurk e Santos, 2009). Na criopreservação de tecido ovariano humano, verificou-se que o etilenoglicol por apresentar baixo peso molecular e alta permeabilidade de membrana, constitui-se um crioprotetor de ação rápida e consequentemente mais eficiente (Hovatta, 2000).

O glicerol possui peso molecular superior ao etilenoglicol (92,10 vs. 62,07 daltons; Massip, 2001), esta característica confere ao glicerol baixa permeabilidade de membrana, o que leva a severos danos citoplasmáticos (Széll e Shelton, 1986). Diversos estudos têm demonstrado que a exposição do tecido ovariano ou de folículos pré-antrais ao glicerol, resulta em uma redução substancial na porcentagem de folículos viáveis em caprinos (Rodrigues *et al.*, 2004) e ovinos (Santos *et al.*, 2006). Neste estudo a baixa eficiência do glicerol na criopreservação de FPA caninos aponta a necessidade de aprimoramento do período de equilíbrio e da concentração para garantir sua melhor penetração nas células.

A comparação entre os procedimentos de teste de toxicidade e criopreservação demonstrou decréscimo significativo da viabilidade dos folículos pré-antrais com o uso do glicerol nas concentrações de 1,5 e 3,0 M, o que condiz com resultados reportados por Santos *et al.* (2006).

## CONCLUSÃO

O etilenoglicol apresentou os melhores resultados de viabilidade folicular após os testes de toxicidade (1,5 M) e criopreservação (3,0 M). No entanto, ressalta-se a necessidade de aperfeiçoamento da biotécnica de

criopreservação para folículos pré-antrais caninos.

## AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG.

## REFERÊNCIAS

- ABEDELAKHI, A.; SALEHNIYA, M.; ABDOLAMIR, A. *et al.* Comparison of ultrastructure and morphology of mouse ovarian follicles after conventional and direct cover vitrification using different concentrations of ethylene glycol. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v.7, n.2, p.45-52, 2009.
- AERTS, J.M.; OSTE, M.; BOLS, P.E. Development and practical applications of a method for repeated transvaginal, ultrasound-guided biopsy collection of the bovine ovary. **Theriogenology**, v.64, n.4, p.947-957, 2005.
- ALVES, B.G.; ALVES, K.A.; ARAÚJO, V.R. *et al.* Quantitative and morphological study of preantral follicles from prepubertal gilts. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.40, n.4, p.1079, 2012a.
- ALVES, K.A.; ALVES, B.G.; ARANTES, L.G. *et al.* Isolamento mecânico de folículos pré-antrais de cadelas - Efeito do intervalo de secção. **Archives of Veterinary Science**, v.17, n.1, p.15-21, 2012b.
- COCERO, M.J.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; BARRAGAN, M.L. Differences on post-thawing survival between ovine morula and blastocysts cryopreserved with ethylene glycol and glycerol. **Cryobiology**, v.33, n.5, p.502-507, 1996.
- DEVIREDDY, R.V.; SWANLUND, D.J.; OLIN, T. *et al.* Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined used differential scanning calorimetry. **Biology of Reproduction**, v.66, n.1, p.222-231, 2002.
- HOVATTA, O. Cryopreservation and culture of human primordial ovarian follicles. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.169, n.1-2, p.95-97, 2000.
- JAIN, J.K.; PAULSON, R.J. Oocyte cryopreservation. **Fertility and Sterility**, v.86, Supl 4, p.1037-1046, 2006.

- JEWGENOW, K.; STOLTE, M. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats--viability and ultrastructural investigations. **Animal Reproduction Science**, v.44, n.3, p.183-193, 1996.
- LUCCI, C.M.; RUMPF, R.; FIGUEIREDO, J.R. *et al.* Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of and efficient isolation method. **Theriogenology**, v.57, n.5, p.1467-1483, 2002.
- LUCCI, C.M.; KACINSKI, M.A.; LOPES, L.H.R. *et al.* Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. **Theriogenology**, v.61, n.6, p.1101-1114, 2004.
- MASSIP, A. Cryopreservation of embryos of farm animals. **Reproduction of Domestic Animals**, v.36, n.2, p.49-55, 2001.
- MAZUR, P.; KLEINHANS, F.W. Relationship between intracellular ice formation in oocytes of the mouse and *Xenopus* and the physical state of the external medium--a revisit. **Cryobiology**, v.56, n.1, p.22-27, 2008.
- MORATÓ, R.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, M.T. *et al.* Cryotops versus open-pulled straws (OPS) as carriers for the cryopreservation of bovine oocytes: Effects on spindle and chromosome configuration and embryo development. **Cryobiology**, v.57, n.2, p.137-141, 2008.
- MULLEN, S.F.; LI, M.; CHEN, Z. *et al.* Human oocyte vitrification: the permeability of metaphase II oocytes to water and ethylene glycol and the appliance toward vitrification. **Fertility and Sterility**, v.89, n.6, p.1812-1825, 2008.
- ONIONS, V.J.; MITCHELL, M.R.; CAMPBELL, B.K. *et al.* Ovarian tissue viability following whole ovine ovary cryopreservation: assessing the effects of sphingosine-1-phosphate inclusion. **Human Reproduction**, v.23, n.3, p.606-618, 2008.
- RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; LUCCI, C.M. *et al.* Isolamento mecânico de folículos ovarianos pré-antrais em cabras. **Ciência Rural**, v.28, n.3, p.477-482, 1998.
- RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; COSTA, S.H.F. *et al.* Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. **Theriogenology**, v.61, n.6, p.1009-1024, 2004.
- RUFFING, N.A.; STEPONKUS, P.L.; PITT, R.E. *et al.* Osmometric behavior, hydraulic conductivity, and incidence of intracellular ice formation in bovine oocytes at different developmental stages. **Cryobiology**, v.30, n.6, p.562-580, 1993.
- SANTOS, R.R.; RODRIGUEZ, A.P.R.; AMORIM, C.A. *et al.* Teste de toxicidade e criopreservação de folículos pré-antrais ovinos isolados utilizando Glicerol, Etilenoglicol, Dimetilsulfóxido e Propanodiol. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, v.43, n.2, p.250-255, 2006.
- SARAGUSTY, J.; ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction**, v.141, n.1, p.1-19, 2011.
- SZÉLL, A.; SHELTON, J.N. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.78, n.2, p.699-703, 1986.
- THOMAS, F.H.; LEASK, R.; SRSEN, V. *et al.* Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture. **Reproduction**, v.122, n.3, p.487-495, 2001.
- VAN DEN HURK, R.; SANTOS, R. Development of fresh and cryopreserved early-stage ovarian follicles, with special attention to ruminants. **Animal Reproduction**, v.6, n.1, p.72-95, 2009.
- ZHOU, X.L.; AL NAIB, A.; SUN, D.W. *et al.* Bovine oocyte vitrification using the Cryotop method: Effect of cumulus cells and vitrification protocol on survival and subsequent development. **Cryobiology**, v.61, n.1, p.66-72, 2010.