

AVANÇOS TECNOLÓGICOS DA CRIOPRESERVAÇÃO DE OVÓCITOS

TECHNOLOGICAL ADVANCES IN OOCYTES CRIOPRESERVATION

Rafaella Tortoriello Barbosa*, Juliana Polisseni**, Martha de Oliveira Guerra***, Luiz Sérgio de Almeida Camargo#, Vera Maria Peters##

RESUMO

Apresenta-se uma revisão atualizada sobre a criopreservação de ovócito e sua importância em reprodução assistida. O presente trabalho tem como ênfase vantagens e desvantagens dos métodos utilizados para congelamento de gametas, efeito dos crioprotetores intracelulares e extracelulares, além da aplicabilidade da técnica na fertilidade feminina e na manutenção da biodiversidade animal.

PALAVRAS CHAVE:

Criopreservação. Ovócitos.

ABSTRACT

It presents an updated review of oocyte cryopreservation and its importance in assisted reproduction. This work has an emphasis on advantages and disadvantages of the methods used for freezing gametes, the effects of intracellular and extracellular cryoprotectants, and the applicability of the technique in female fertility and in maintaining animal biodiversity.

KEY WORDS:

Criopreservation. Oocytes.

1 INTRODUÇÃO

A criopreservação, definida pela manutenção de tecidos em temperatura criogênica a -196°C , promove a interrupção de todas as reações químicas, processos biológicos e físicos intra e extracelulares, mantendo por tempo indeterminado o tecido criopreservado (BAKHACH, 2009).

As primeiras tentativas de criopreservar tecidos de mamíferos ocorreram a partir da utilização de ovócitos não fertilizados de ratos, em 1950, tendo como crioprotetor o glicerol, em temperatura de -10°C a -20°C . Desde então, muitas pesquisas vêm sendo realizadas

nesta área; na década de 70, melhores resultados foram observados ao criopreservar ovócitos e embriões de camundongos (GRUDZINSKAS, 1995; SMORAG et al., 2008).

Atualmente, a criopreservação de ovócitos, juntamente com outras técnicas de reprodução assistida, vem sendo aplicada para manutenção da fertilidade em mulheres submetidas a tratamentos quimio e radioterápicos pela presença, principalmente, de tumores estrógeno-dependentes (MIGISHIMA et al., 2003; VARGHESE et al., 2008).

Através do congelamento ultra-rápido (vitrificação) de ovócitos em prófase I, maturação e fertilização in vitro, foi relatado no Canadá, em 1986, o primeiro nascimento de um bebê. Recentemente, ocorreu a primeira gravidez em paciente que havia criopreservado ovócitos em estágio de metáfase II; no entanto, é importante ressaltar que ainda é desconhecido o total de nascimentos por ovócitos criopreservados; calcula-se que seja em torno de mais de 475 crianças nascidas após criopreservação do gameta feminino em todo o mundo (TAO; DEL VALLE, 2008; EZCURRA et al., 2009).

Por não possuir problemas éticos e jurídicos, a técnica de congelamento dos ovócitos torna-se mais eficiente quando comparada ao congelamento de embriões; além da grande importância em reprodução assistida, a criopreservação também é utilizada para

* Médica Veterinária - Estagiária do Centro de Biologia da Reprodução – Universidade Federal de Juiz de Fora/MG.

** Farmacêutica bioquímica. Embriologista - Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Saúde - Universidade Federal de Juiz de Fora/MG.

*** Pesquisador do Centro de Biologia da Reprodução – UFJF.

Médico veterinário - Pesquisador da Embrapa Gado de Leite.

Pesquisador do Centro de Biologia da Reprodução – UFJF.

Correspondence author: Rafaella Tortoriello Barbosa. Universidade Federal de Juiz de Fora, Centro de Biologia da Reprodução, Campus Universitário, Caixa Postal 328, CEP 36001-970, Juiz de Fora, MG, Brasil.

Received: 12/09

Accepted: 04/10

formação de bancos genéticos de espécies ou raças em extinção, mantendo a biodiversidade animal e avanços no melhoramento genético (MIGISHIMA et al., 2003; TAO; DEL VALLE, 2008; VARGHESE et al., 2008).

Apesar de ser uma técnica muito divulgada, fatores como temperatura, tempo de exposição (congelamento lento ou vitrificação), tipo e concentração do crioprotetor ainda devem ser estudados para que se alcancem resultados mais satisfatórios após o congelamento e reexpansão (CHIAN et al., 2004; TAO; DEL VALLE, 2008; FUJIWARA et al., 2010).

A revisão visa a informar sobre os agentes crioprotetores envolvidos na criopreservação de ovócitos, tipos de congelamento e a discutir sobre os problemas que ainda ocorrem no processo de criopreservação de ovócitos.

2 AGENTES CRIOPROTETORES

Os crioprotetores são solventes orgânicos que agem protegendo as células e tecidos no momento de queda abrupta de temperatura. As características principais destes agentes são: possuir baixo peso molecular e altas solubilidade e permeabilidade plasmática. Os crioprotetores, então, promovem estabilização das proteínas intracelulares, reduzem a formação de cristais no interior das células e diminuem o impacto causado pelos eletrólitos no meio intra e extracelular (CHIAN et al., 2004; EDASHIGE et al., 2007; GOSDEN; NAGANO, 2002; PICTON et al., 2000).

Os crioprotetores são divididos em três grupos:

1) Intracelulares ou permeáveis de baixo peso molecular (ex.: dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol (ETG), propanodiol (PROH), glicerol (GLI), metanol e butanodiol).

2) Extracelulares ou impermeáveis de baixo peso molecular (galactose, glicose, sacarose e trealose).

3) Extracelulares ou impermeáveis de elevado peso molecular (polivinilpirrolidona, polivinil álcool, hialuronato de sódio, albumina sérica bovina e ficoll) (GOSDEN et al., 2002; SHAW; JONES, 2003).

Acredita-se que os crioprotetores intracelulares interagem com a membrana celular, promovendo a estabilização para que não ocorra o rompimento no momento da congelação (Figura 1). Estes atuam também como um tampão hiperosmótico que reduz o efeito das altas concentrações de moléculas no interior das células desidratadas (SHAW; JONES, 2003; TAYLOR; BAICU, 2009). Com exceção do GLI, que possui baixa solubilidade em água, o DMSO, PROH e o ETG possuem alta solubilidade, penetrando rapidamente nas células, tornando-se, assim, os mais recomendados para criopreservar gametas (CHIAN et al., 2004; GOSDEN; NAGARO, 2002).

Para controlar a reidratação no momento da descongelação, pode-se utilizar crioprotetores extracelulares de baixo ou elevado peso molecular em conjunto com um crioprotetor intracelular (CHIAN

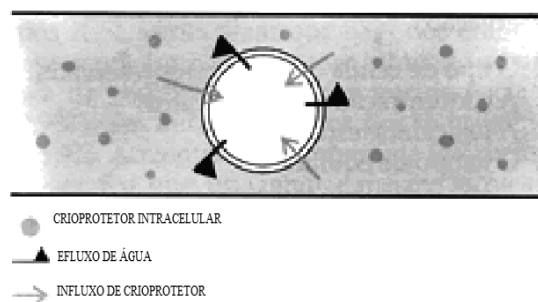


Figura 1: Dinâmica osmótica de uma estrutura criopreservada e solução crioprotetora.

Fonte: Adaptado de <<http://www.crh.com.br/crh.asp?pasta=33&livro=1&txt=9>>.

et al., 2004; SRIPUNYA et al., 2010; TAYLOR; BAICU, 2009). A grande importância da utilização de um crioprotetor extracelular de baixo peso molecular no meio de diluição ou remoção é promover a retenção de água no exterior da célula, diminuindo assim o risco de lise celular (SHAW; JONES, 2003).

Entretanto, ainda não há consenso sobre qual o melhor crioprotetor, já que a concentração de exposição, a temperatura e o tipo de crioprotetor podem causar danos às células pela alta toxicidade química. É importante que se leve em consideração a toxicidade e a associação entre os crioprotetores, além da técnica e do tipo de material a ser conservado (STACHECKI; COHEN, 2004).

3 MÉTODOS DE CRIOPRESERVAÇÃO

O objetivo da criotecnologia é diminuir os danos sobre as células nas etapas da criopreservação (KULESHOVA; LOPATA, 2002). Os principais problemas que ocorrem no processo do congelamento são: depósito de sais no interior da célula, diferenças de pressão osmótica entre o ambiente intra e o extracelular, dispersão do fuso meiótico e danos ao citoesqueleto. Estes podem promover alterações no trânsito de moléculas e organelas durante o processo de divisão celular, gerar mudanças de volume no ovócito, com consequente lesão na membrana plasmática e nas organelas (FUJIWARA et al., 2010; KUWAYAMA, 2007; TAO; DEL VALLE, 2008).

Recentemente, dois principais métodos têm sido utilizados para criopreservar ovócitos: congelamento lento ou convencional e congelamento ultra-rápido ou vitrificação (Figura 2) (TAO; DEL VALLE, 2008). As fases de aquecimento e hidratação diferem entre os procedimentos, principalmente no momento da adição de crioprotetores e o tempo de criopreservação (VAJTA; KUWAYAMA, 2006).

No congelamento lento, a queda na temperatura ocorre gradualmente através de uma curva dependente da estrutura a ser criopreservada, na tentativa de promover um delicado equilíbrio entre os diferentes elementos celulares (LOUTRADI et al.,

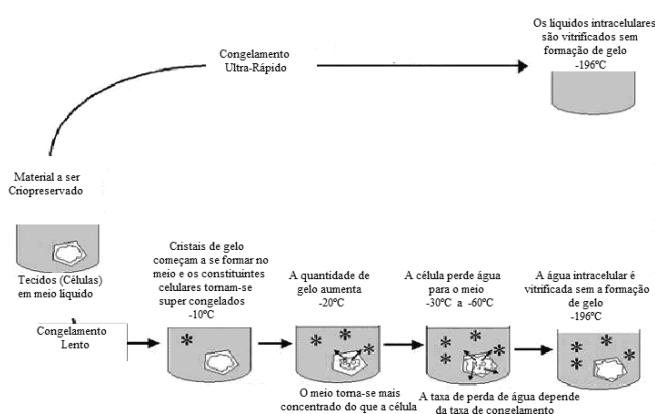


Figura 2: Eventos físico-químicos que ocorrem durante os dois principais métodos de criopreservação.

Fonte: Adaptado de <www.integral.br/zoom/materia.asp?materia=248>.

2008). Os ovócitos, por exemplo, são expostos de modo gradual a temperaturas cada vez mais baixas, através do uso de um aparelho programável para baixar automaticamente a temperatura de resfriamento (CHEN; YANG, 2009).

No entanto, o resfriamento lento pode causar danos celulares, como a formação de cristais de gelo no interior das células (VAJTA, 2000). Isto porque são usadas menores concentrações de crioprotetores, os quais não eliminam a formação de gelo intracelular e possíveis lesões na célula (SEKI; MAZUR, 2008; VAJTA; KUWAYAMA, 2006). Além disso, para a realização da técnica é necessário pessoal qualificado, equipamentos caros e maior tempo para sua aplicação (CAO et al., 2009; CHEN; YANG, 2009; VAJTA; KUWAYAMA, 2006).

Na vitrificação, no entanto, o resfriamento é radical, podendo ser definido como um procedimento físico no qual os crioprotetores são altamente concentrados, não levando a formação de cristais de gelo e menor dispersão do fuso meiótico (CHEN; YANG, 2009; KULESHOVA; LOPATA, 2002; VAJTA, 2000; VAJTA; KUWAYAMA, 2006;).

A alta viscosidade dos crioprotetores e taxas de resfriamento muito rápidas são capazes de vitrificar o conteúdo (VAJTA, 2000). Os gametas são expostos diretamente a nitrogênio líquido, a -196°C , imediatamente após seu contato com a solução crioprotetora (STACHECKI; COHEN, 2004).

Porém, a alta concentração de crioprotetores necessária na vitrificação promove uma toxicidade química para os gametas durante o processo de manipulação em temperaturas acima de zero, podendo interferir na viabilidade e capacidade de fertilização dos ovócitos após o tratamento (KULESHOVA; LOPATA, 2002; VAJTA, 2000). Tem-se utilizado, então, solução crioprotetora composta por um crioprotetor não permeável, associado a pelo menos dois crioprotetores permeáveis, com a finalidade de minimizar o efeito tóxico destes para os ovócitos

(DESSOLLE et al., 2009; KULESHOVA; LOPATA, 2002; VAJATA; KUWAYAMA, 2006).

A vitrificação, então, vem se tornando uma opção competitiva quando comparada ao congelamento lento, já que apresenta rapidez para realização do procedimento, não necessita de equipamentos caros e obtém maiores taxas de sobrevivência (CAO et al., 2009; SEKI; MAZUR, 2008; VAJTA; KUWAYAMA, 2006).

Entretanto, a criopreservação de ovócitos ainda encontra-se em fase de investigação, pois apesar de serem observadas altas taxas de recuperação, o número de nascimentos continua baixo. Atualmente, a vitrificação é o método de escolha, devido aos seus pontos favoráveis em relação ao congelamento lento. Porém, é necessário um maior entendimento de todo o conjunto, tendo como perspectiva a estabilização de um protocolo específico de aplicação, que leve a menores lesões químicas e, conseqüentemente, a maiores taxas de nascidos vivos (CHIAN et al., 2004).

4 REFERÊNCIAS

- BAKHACH, J. The cryopreservation of composite tissues: Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. **Organogenesis**, Georgetown, v. 5, n. 3, p. 119-126, 2009.
- CAO, Y.X.; XING, Q.; LI, L.; et al. Comparison of survival and embryonic development in human oocytes cryopreserved by slow-freezing and vitrification. **Fertility and Sterility**, New York, v. 92, n. 4, p. 1306-1311, 2009.
- Centro de Reprodução Humana: <<http://www.crh.com.br/crh.asp?pasta=33&livro=1&txt=9>> Acessado em www.crh.com.br/crh.asp. 2009.
- CHEN, S.U.; YANG, Y.S. Slow freezing or vitrification of oocytes: their effects on survival and meiotic spindles, and the time schedule for clinical practice. **Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology**, Hong Kong, v. 48, n. 1, p. 15-22, 2009.
- CHIAN, R.C.; KUWAYAMA, M.; TAN, L.; TAN, J.; KATO, O.; NAGAI, T. High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrification. **The Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 50, n. 6, p. 685-696, 2004.
- DESSOLLE, L.; DE LAROUZIÈRE, V.; RAVEL, C.; BERTHAUT, I.; ANTOINE, J.M.; MANDELBAUM, J. Slow freezing and vitrification of human mature and immature oocytes. **Gynécologie, Obstétrique & Fertilité**, Paris, v. 37, n. 9, p. 712-719, 2009.
- EDASHIGE, K.; OHTA, S.; TANAKA, M.; et al. The role of aquaporin 3 in the movement of water and cryoprotectants in mouse morulae. **Biology of Reproduction**, Nova York, v. 77, n. 2, p. 365-375, 2007.
- EZCURRA, D.; RANGNOW, J.; CRAIG, M.; SCHERTZ, J. The Human Oocyte Preservation Experience (HOPE) a phase IV,

- prospective, multicenter, observational oocyte cryopreservation registry. **Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E**, London, v. 7, p. 53, 2009.
- FUJIWARA, K.; SANO, D.; SEITA, Y.; INOMATA, T.; ITO, J.; KASHIWAZARI, N. Ethylene glycol-supplemented calcium-free media improve zona penetration of vitrified rat oocytes by sperm cells. **The Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 56, n. 1, p. 169-175, 2010.
- GOSDEN, R.; NAGANO, M. Preservation of fertility in nature and ART. **Reproduction**, Mumbai, v. 123, n. 1, p. 3-11, 2002.
- GOSDEN, R.G.; MULLAN, J.; PICTON, H.M.; YIN, H.; TAN, S.L. Current perspective on primordial follicle cryopreservation and culture for reproductive medicine. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 8, n. 2, p. 105-110, 2002.
- GRUDZINSKAS, J.G.; YOVICH, J. Gametes: the oocyte. Cambridge; New York, NY, USA: Cambridge University Press, 1995. (Cambridge reviews in human reproduction). www.integral.br/zoom/materia.asp?materia=248.
- KULESHOVA, L.L.; LOPATA, A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. **Fertility and Sterility**, Nova York, v. 78, n. 3, p. 449-454, 2002.
- KUWAYAMA, M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. **Theriogenology**, Los Altos, v. 67, n. 1, p. 73-80, 2007.
- LOUTRADI, K.E.; KOLIBIANAKIS, E.M.; VENETIS, C.A.; et al. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. **Fertility and Sterility**, Nova York, v. 90, n. 1, p. 186-193, 2008.
- MIGISHIMA, F.; SUZUKI-MIGISHIMA, R.; SONG, S.; et al. Successful cryopreservation of mouse ovaries by vitrification. **Biology of Reproduction**, Nova York, v. 68, n. 3, p. 881-887, 2003.
- PICTON, H.M.; KIM, S.S.; GOSDEN, R.G. Cryopreservation of gonadal tissue and cells. **British Medical Bulletin**, London, v. 56, n. 3, p. 603-615, 2000.
- SEKI, S.; MAZUR, P. Effect of warming rate on the survival of vitrified mouse oocytes and on the recrystallization of intracellular ice. **Biology of Reproduction**, Nova York, v. 79, n. 4, p. 727-737, 2008.
- SHAW, J.M.; JONES, G.M. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 9, n. 6, p. 583-605, 2003.
- SMORAG, Z.; KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L.; SHRZYSZOWSKA, M.; JURA, J.; GAJDA, B.; BOCHENEK, M. Animal reproduction biotechnology in Poland. **The International Journal of Developmental Biology**, Vizcaya, v. 52, n. 2-3, p. 151-155, 2008.
- SRIPUNYA, N.; SOMFAI, T.; INABA, Y.; NAGAI, T.; IMAI, K.; PARNPAI, R. A comparison of cryotop and solid surface vitrification methods for the cryopreservation of in vitro matured bovine oocytes. **The Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 56, n. 1, p. 176-181, 2010.
- STACHECKI, J.J.; COHEN, J. An overview of oocyte cryopreservation. **Reproductive Biomedicine Online**, Cambridge, v. 9, n. 2, p. 152-163, 2004.
- TAO, T.; DEL VALLE, A. Human oocyte and ovarian tissue cryopreservation and its application. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, Nova York, v. 25, n. 7, p. 287-296, 2008.
- TAYLOR, M.J.; BAICU, S. Review of vitreous islet cryopreservation: Some practical issues and their resolution. **Organogenesis**, Georgetown, v. 5, n. 3, p. 155-166, Jul 2009.
- VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60-61, p. 357-364, 2000.
- VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**, Los Altos, v. 65, n. 1, p. 236-244, 2006.
- VARGHESE, A.C.; PLESSIS, S.S. D.; FALCONE, T.; AGARWAL, A. Cryopreservation/transplantation of ovarian tissue and in vitro maturation of follicles and oocytes: challenges for fertility preservation. **Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E**, London, v. 6, p. 47, 2008.