

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

ANÁLISE CITOGENÉTICA DE TECIDO OVARIANO DE FETOS BOVINOS
XENOTRANSPLANTADO APÓS VITRIFICAÇÃO

Bruna de Souza Campos

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do grau
de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia – MG

Julho – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

ANÁLISE CITOGENÉTICA DE TECIDO OVARIANO DE FETOS BOVINOS
XENOTRANSPLANTADO APÓS VITRIFICAÇÃO

Bruna de Souza Campos

Prof. Dr. José Octavio Jacomini

Dra. Kele Amaral Alves

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do grau
de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia – MG

Julho – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

ANÁLISE CITOGENÉTICA DE TECIDO OVARIANO DE FETOS BOVINOS
XENOTRANSPLANTADO APÓS VITRIFICAÇÃO

Bruna de Souza Campos

Prof. Dr. José Octavio Jacomini
Faculdade de Medicina Veterinária

Dra. Kele Amaral Alves
Programa de pós-graduação em ciências veterinárias FAMEV-UFU

Homologado pela coordenação do Curso de
Biotecnologia em __/__/__

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos

Uberlândia – MG

Julho – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO BIOTECNOLOGIA

ANÁLISE CITOGENÉTICA DE TECIDO OVARIANO DE FETOS BOVINOS
XENOTRANSPLANTADO APÓS VITRIFICAÇÃO

Bruna de Souza Campos

Aprovado pela Banca Examinadora em: 05/07/19 Nota: 100

Prof. Dr. José Octavio Jacomini

Uberlândia – MG

Julho – 2019

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Milton e Sivalda, que sempre acreditaram e investiram em mim. O carinho e cuidado de vocês, fizeram toda a diferença em minha caminhada até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar o meu caminho durante o meu curso e a realização desta pesquisa.

Ao Instituto de Biotecnologia, e todo o seu corpo docente, que ao longo da minha formação ofereceu um ambiente de estudo agradável e repleto de oportunidades.

Aos professores e toda a equipe do Laboratório de Reprodução Animal, por me receberem no laboratório e por todos os conhecimentos adquiridos. Em especial à Giovanna Faria de Moraes e Kele Amaral Alves, por todo o apoio na elaboração deste trabalho, obrigada por todos os ensinamentos.

Ao meu orientador José Octavio Jacomini, pelo empenho dedicado ao meu projeto de pesquisa.

Ao Laboratório de Citogenética, em especial aos professores Robson José de Oliveira Júnior e Rute Magalhães Brito, por me receberem no laboratório. Obrigada por toda atenção e conhecimento compartilhado comigo.

Aos meus amigos de faculdade, especialmente Ana Claudia e Thamires, que compartilharam comigo, momentos importantes durante minha graduação, e tornaram essa jornada mais leve e divertida. Obrigada pelo companheirismo e amizade.

Ao meu irmão, por toda ajuda e carinho.

Ao meu namorado, pela companhia e amizade durante todos esses anos.

Aos meus pais, Milton e Sivalda que sempre foram meu suporte durante toda a minha vida. Obrigada por toda dedicação, apoio e amor incondicional. Sem a força de vocês eu não conseguiria seguir em frente. Sou imensamente grata.

RESUMO

A utilização do xenotransplante de tecido ovariano fetal e da vitrificação, podem ser alternativas para preservação de material genético. Sendo assim, com este trabalho objetivou-se avaliar o potencial genotóxico da metodologia de vitrificação e xenotransplante sobre células ovarianas de fetos bovinos, utilizando o teste de micronúcleo. Para isso, utilizou-se fragmentos de ovários de fetos bovinos (n=5 pares) que foram submetidos aos tratamentos como o xenotransplante em camundongos, vitrificação e vitrificação seguida de xenotransplante. O teste de micronúcleo, foi realizado por meio do afrouxamento da matriz colagenosa do tecido ovariano por digestão enzimática (colagenase tipo I), com subsequente coloração do material genético com o fluorocromo Hoeschst 33258 e posterior análise em microscópio de fluorescência. Os resultados, demonstraram que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos de tratamento do controle vitrificado (CV), xenotransplante fresco (XF) e xenotransplantados vitrificado (XV). No entanto, houve diferença entre o tratamento de controle fresco com os outros tipos de tratamentos. Permitindo concluir que tratamentos como o xenotransplante e a vitrificação são capazes de causar danos ao material genético.

Palavras chave: fetos bovinos, genotocidade, micronúcleos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Xenotransplante	1
1.2 Vitrificação	2
1.3 Danos ao DNA e métodos de detecção	2
2. OBJETIVOS.....	6
3. MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1 Ética	7
3.2 Desenho experimental	7
3.3 Coleta de ovários	7
3.4 Preparação das amostras.....	7
3.5 Vitrificação	7
3.6 Reaquecimento	8
3.7 Remoção dos crioprotetores	8
3.8 Xenotransplante	9
3.9 Análise citogenética.....	9
3.9.1 Dissociação tecidual.....	10
3.9.2 Coloração com fluorocromo Hoechst 33258	10
3.9.3 Leitura de lâminas.....	10
3.10 Análise estatística	11
4. RESULTADOS	11
5. DISCUSSÃO.....	12
6. CONCLUSÃO	14
REFERÊNCIAS	15

1. INTRODUÇÃO

1.1 Xenotransplante

Xenotransplante é a denominação dada ao transplante de células, tecidos ou órgãos entre animais de espécies diferentes. Uma de suas principais aplicações é na área de transplantes de órgãos e tecidos (MACEDO; BEZERRA, 2015). Sendo uma técnica importante para o fornecimento de órgãos para tratamento de pacientes que apresentam alguma doença que cause falência de órgãos. Outra aplicação do xenotransplante em relação à bancos de germoplasmas animais, que podem ser usados para preservação de espécies ameaçadas de extinção (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FIGUEIRÊDO, 2008).

Uma possível futura aplicação, diz respeito ao aspecto econômico. Pois, tendo o xenotransplante como uma tecnologia reprodutiva, é possível que animais com potencial genético superior, gerem um número maior de descendentes também com alto valor genético, através da diminuição do intervalo de gerações. O que é importante para o melhoramento genético animal. Pois, a resposta à seleção pode ser acelerada diminuindo-se o intervalo de gerações (JÚNIOR, 2010).

A utilização de xenotransplante de tecido ovariano fetal bovino é algo inovador, pois espera-se que o tecido fetal proporcione menores taxas de rejeição e melhores taxas de recuperação celular do tecido. Já que, nesse estágio, o ovário contém uma quantidade mínima de tecido estromal e conjuntivo (COX; SHAW; JENKIN, 1996). Esses tecidos contêm altas concentrações de linfócitos do tipo T, principal célula causadora de rejeição de enxertos. Por isso, pesquisas científicas nessa área tem o intuito de aprimorar a técnica, e criar mecanismos para se conhecer mais sobre o xenotransplante e sua influência no organismo do indivíduo receptor.

1.2 Vitrificação

A criopreservação do tecido ovariano é um método que pode ser utilizado para preservar a fertilidade de mulheres. Esta biotecnologia tem a finalidade de preservar as células germinativas por períodos prolongados (RODRIGUES et al., 2014). No entanto, ovócitos maturados são muito sensíveis ao resfriamento e difíceis de serem criopreservados por métodos de congelamento lento (Oktay et al., 2006). No entanto, a vitrificação ultrar-rápida resolveu essas dificuldades em grande parte, e o congelamento de óvulos é muito eficiente (KAGAWA; SILBER; KUWAYAMA, 2009).

O resfriamento e reaquecimento na técnica de vitrificação, proporcionam o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), de maneira que o estresse osmótico gerado pelo aumento do metabolismo pode comprometer o restabelecimento do tecido ovariano, e o desenvolvimento folicular (WANG et al., 2013). A presença de EROs no citoplasma celular pode influenciar a sobrevivência celular após a criopreservação de tecidos ovarianos (FABRI et al., 2010).

Além disso, quando ocorre a perda do equilíbrio entre produção e eliminação de EROs, o que é chamado de estresse oxidativo, podem ocorrer danos ao DNA, RNA, lipídios e proteínas. Além de fragmentação do DNA, as EROs podem causar o mal funcionamento do sistema de reparo do DNA, contribuindo para o desenvolvimento de doenças, como o câncer (SOSA et al., 2013).

1.3 Danos ao DNA e métodos de detecção

A molécula ácido desoxirribonucléico (DNA) é a matéria-prima da herança que influencia todos os aspectos da estrutura e funcionamento dos organismos. Uma única molécula de DNA, juntamente com proteínas associadas, compreende um cromossomo. Os cromossomos estão localizados nos núcleos de todas as células eucariotas, bem como em organelas como o

cloroplasto e a mitocôndria. Os genes são unidades funcionais de informação genética que residem nos cromossomos. Estas unidades são sequências lineares de bases nitrogenadas que codificam as moléculas necessárias para o bom funcionamento do corpo. A informação genética contida nos cromossomos é replicada e distribuída para células recém-criadas durante a divisão celular mitótica (GERSEN; KEAGLE, 2005).

Variações cromossômicas (ou cariotípicas) podem ocorrer entre diferentes células do indivíduo, entre indivíduos diferentes da mesma população ou entre populações diferentes da mesma espécie (CHAVES; NICOLAU, 2013). Tais alterações podem ser classificadas em numéricas quando correspondem ao aumento ou à perda de um ou mais cromossomos; ou estruturais que, menos comuns que as numéricas, podem afetar a estrutura de um ou mais cromossomos, autossomos ou sexuais. (GUERRA, 1988).

Rearranjos cromossômicos são diversos, e frequentemente resultam em anormalidades fenotípicas (SHAFFER; LUPSKI, 2000). Por isso, constituem uma categoria importante de doenças genéticas, respondendo por uma proporção significativa dos insucessos reprodutivos, malformações congênitas e retardo mental (GARDNER; SUTHERLAND, 1996). Com relação à origem das aberrações cromossômicas, sabe-se que resultam de quebras cromossômicas espontâneas ou induzidas por agentes mutagênicos. As quebras nas extremidades tendem a se unir, podendo originar uma deficiência ou uma reorganização estrutural do cromossomo durante os estágios da mitose ou meiose do ciclo celular (ROSSETTO, 2015).

O termo citogenética atualmente refere-se a todo e qualquer estudo relativo ao cromossomo isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, tanto no que diz respeito a sua morfologia, organização, função e replicação, quanto à sua variação e evolução (CHAVES; NICOLAU, 2013). A análise cromossômica, é um procedimento diagnóstico cada vez mais importante em várias áreas da medicina clínica (THOMPSON; THOMPSON, 2002). Esta

análise é muito válida para correlacionar determinadas patologias ou a adoção de técnicas de transplante com alterações do cariótipo normal (GUERRA, 1988).

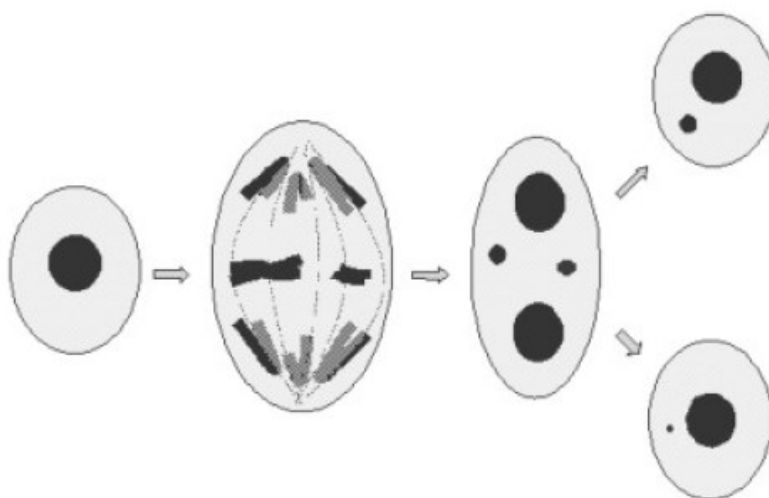
Um dos testes mais comuns e aplicáveis em ensaios de toxicidade é o teste do micronúcleo. Uma vez que, apresenta resultados rápidos na detecção de danos cromossômicos induzidos. Micronúcleos são fragmentos de DNA que são separados do núcleo principal e se caracterizam por serem corpúsculos pequenos, arredondados ou ovais, encontrados no citoplasma, normalmente ao lado do núcleo principal. A sua semelhança com o núcleo principal em forma, textura, coloração e conteúdo de DNA é o que facilita sua detecção. O tamanho dos micronúcleos varia conforme o agente indutor, sendo que micronúcleos derivados de cromossomos inteiros, são normalmente maiores do que aqueles derivados de fragmentos cromossômicos (AGOSTINI, 1993).

As quebras de DNA, que levam à formação de micronúcleos, podem não ser reparadas se as enzimas de reparo na via de união das extremidades não homólogas, estiverem com defeito. (FENECH et al., 2011). Além disso, as células contendo micronúcleos podem ser destinadas à apoptose, causando sua morte. Ou então, micronúcleos podem ser reintegrados na cromatina (STOPPER; MULLER, 1997), restabelecendo então, a homeostasia genética.

A frequência de células com micronúcleos reflete o nível de dano induzido por agentes clastogênicos (aqueles que causam quebras cromossômicas) ou aneugênicos (indutores de aneuploidia ou promotores de segregação cromossômica anormal) (AGOSTINI, 1993). O aumento desta frequência, revela uma ação genotóxica que pode ou não estar associada a transformação neoplásica.

A formação do micronúcleo (Figura 1), se dá pela perda de cromossomos inteiros ou apenas fragmentos de cromossomos ou cromossomo. Ainda pode ocorrer pela perda de cromossomos que não foram incluídos nos núcleos filhos, na conclusão da telófase durante a

mitose, porque não se ligaram ao fuso durante a segregação na anáfase (KLOBUTCHER, 2001).

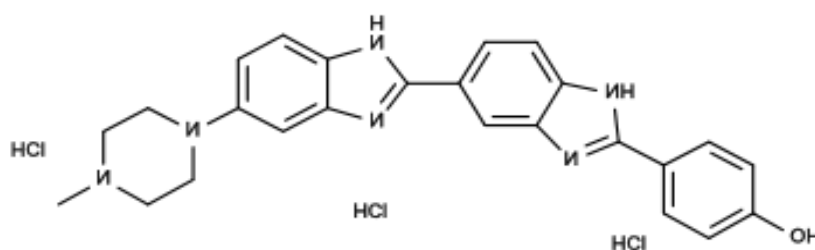


(KLOBUTCHER, 2001).

Figura 1: Visão geral da formação de micronúcleos originários de um cromossomo em células mononucleares.

Para evidenciar os micronúcleos, se faz necessário, o uso de corantes do material genético. Atualmente, uma das principais técnicas utilizadas é a microscopia de fluorescência, devido a sua vantagem de ser específica em suas ligações.

O corante Hoechst 33258, é um composto sintético que contém dois anéis benzimidazole consecutivos com um grupo fenólico e um grupo N-metilpiperazina em cada extremidade da molécula alongada (Figura 2). Sabe-se que se liga ao DNA helicoidal duplo e, como tal, tem sido amplamente utilizado como corante citológico fluorescente para o DNA. Diversos estudos mostraram que o Hoechst 33258 se liga preferencialmente à região rica em nucleotídeos de adenina e timina do DNA com um tamanho de ligação mínimo de quatro pares de bases consecutivas de adenina e timina (WU; SANTI, 1988).



(WU; SANTI, 1988)

Figura 2. Estrutura química do Hoechst 33258

Dentro do nosso conhecimento atual, com base em revisões bibliográficas, não existem trabalhos que relacionem xenotransplante de tecido ovariano fetal bovino com suas possíveis alterações cromossômicas. Compreendendo então, a aplicabilidade e importância da técnica de vitrificação como método de preservação celular, e do xenotransplante como técnica reprodutiva, nota-se a importância de estudar as possíveis alterações cromossômicas decorrentes dessas técnicas.

A hipótese principal deste trabalho, é que as técnicas de vitrificação e xenotransplante não causem danos a estrutura ao DNA.

2. OBJETIVOS

Avaliar o potencial clastogênico e genotóxico da metodologia de vitrificação e xenotransplante sobre células ovarianas de fetos bovinos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Ética

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA), da Universidade Federal de Uberlândia (Protocolo 006/2017).

3.2 Desenho experimental

Foram utilizados 5 pares de ovários de fetos bovinos, divididos em fragmentos de 3mm x 3mm x 1mm, e distribuídos aleatoriamente nos grupos: controle fresco (CF), controle vitrificado (CV) vitrificado xenotransplantado (VX) e xenotransplantado fresco (XF). Foram realizadas duas repetições, a primeira com 3 pares de ovários e a segunda com 2 pares. Os fragmentos de todos tratamentos foram submetidos a análise citogenética.

3.3 Coleta de ovários

Ovários de fetos bovinos (n = 5 pares) a partir de 180 dias de gestação foram obtidos em frigorífico local. A idade dos fetos foi determinada pela distância em centímetros entre a articulação atlanto-occipital e a inserção da cauda aplicada a uma fórmula desenvolvida por Rexoard et al., (1974). Após a coleta, os ovários foram lavados em álcool 70% por 10 segundos, em seguida lavados duas vezes em PBS e transportados ao laboratório em caixa isotérmica a temperatura de 4°C, em até 2 horas.

3.4 Preparação das amostras

No laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária – UFU, os ovários foram cortados ao meio e a fragmentação do córtex ovariano originou fragmentos de 3 mm x 3mm x 1mm. Os fragmentos foram conservados em soro fisiológico auto clavado até serem destinados aos diferentes tratamentos.

3.5 Vitrificação

O processo de vitrificação de fragmentos ovarianos envolveu o equilíbrio das amostras em duas soluções de vitrificação (SV) com diferentes concentrações de crioprotetores (CARVALHO et al., 2014). Neste trabalho, foram utilizados os crioprotetores etileno (EG) e o dimetilsulfóxido (DMSO). A solução 1 (SV1) continha TCM199 suplementado com 10 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), 0,25 M de sacarose, 10% de etileno (EG) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). A solução 2 (SV2) foi composta por TCM199 suplementado com 10mg/ mL de BSA, 0,25 M de sacarose, 20% de EG e 20% de DMSO.

Os fragmentos foram expostos a SV1 durante 4 minutos e em seguida expostos a SV2 durante 1 minuto. Todos os procedimentos foram realizados em temperatura ambiente. Em seguida os fragmentos foram envasados em bainhas francesas com a SV2 que foram vedadas com massa acrílica. As bainhas foram expostas ao vapor de nitrogênio por 5 minutos (-30°C) a uma distância de 3 centímetros do nitrogênio e mergulhadas em nitrogênio líquido para armazenamento (-196°C) durante uma semana (TING et al., 2011).

3.6 Reaquecimento

Para o reaquecimento, as bainhas contendo as amostras foram expostas a temperatura ambiente (25°C) por 30 segundos e em seguida imersas em banho-maria a 37°C durante 1 minuto.

3.7 Remoção dos crioprotetores

Após o reaquecimento, o grupo de fragmentos vitrificados foi submetido à remoção da solução de vitrificação por meio da passagem pela solução de lavagem (SL), realizada em 3 etapas: SL1) TCM199 + 3 mg/ mL de BSA + 0,5M de sacarose, SL2) TCM 199 + 3 mg/ mL de BSA + 0,25 M de sacarose e SL3) TCM 199 + 3 mg/ mL de BSA.

Os fragmentos ficaram por 5 minutos em cada etapa (CARVALHO et al., 2014). Após a remoção dos crioprotetores os fragmentos foram incubados por 24 horas em placas de 24

poços contendo 500 μ L de meio TCM 199 suplementado com gentamicina (1 μ L/mL), em temperatura ambiente (25°C) (DAI et al., 2015).

3.8 Xenotransplante

Foram utilizados 10 camundongos com seis semanas de idade, fêmeas, BALB C, produzidas no setor de reprodução da rede de biotérios de roedores da Universidade Federal de Uberlândia, com peso vivo de aproximadamente 20 gramas.

Antes do procedimento cirúrgico, os camundongos foram anestesiados com xilazina 2% e quetamina 2% e a dor foi controlada durante o pós-operatório com tramadol. Em cada animal foram transplantados cinco fragmentos de tecido ovariano, os quais foram fixados junto ao peritônio na cavidade abdominal com fio de sutura prolene 5/0 não absorvível.

Após o transplante dos fragmentos ovarianos, os camundongos ficaram alojados em caixas individuais, em sala com temperatura e iluminação controladas à 22°C e com ciclos de iluminação alternados entre claro e escuro a cada 12 horas. Os animais ficaram alojados dentro da rede de biotérios de roedores da Universidade Federal de Uberlândia. A água e o alimento foram ofertados à vontade e previamente esterilizados. A recuperação dos enxertos foi feita 14 dias após o transplante. Os camundongos foram anestesiados com o uso de anestesia geral e em seguida eutanasiados por deslocamento cervical. Os enxertos foram recuperados para posteriores análises.

3.9 Análise citogenética

A metodologia utilizada, foi desenvolvida neste trabalho, sendo então uma metodologia nova. O princípio baseou-se no afrouxamento da matriz colagenosa do tecido ovariano fetal bovino por digestão enzimática, subsequente coloração do material genético com o fluorocromo Hoeschst 33258, para posterior análise em microscópio de fluorescência (Olympus®), do laboratório de Morfologia Vegetal e Microscopia de Imagem da Universidade Federal de Uberlândia.

3.9.1 Dissociação tecidual

Para afrouxamento da matriz colagenosa utilizou-se a enzima colagenase tipo I, isolada de *Clostridium histolyticum* (GIBCO). A enzima foi preparada de acordo com as instruções do fabricante e utilizada a uma concentração de 20U/ μ L. Os fragmentos foram transferidos para eppendorff adicionando de 0,5 mL da solução enzimática de uso. Os eppendorffs foram mantidos em banho maria a 37°C e a dissociação foi assistida por pipetagens da suspensão, repetidas de 10 em 10 minutos após as 3 primeiras horas. Ao final da dissociação tecidual, a atividade enzimática foi bloqueada com 450 μ L de ácido acético a 100% e 50 μ L de água destilada. Para obtenção do concentrado de células, o eppendorff foi centrifugado a 1000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet, ressuspendido em 20 μ L de ácido acético diluído a 45%. Esse volume final foi transferido para uma lâmina de microscopia, para realização do esfregaço.

3.9.2 Coloração com fluorocromo Hoechst 33258

Após a secagem da lâmina, foram adicionados 50 μ L do fluorocromo Hoechst 33258 diluído em PBS. Em seguida uma lamínula foi posicionada sobre a lâmina, que permaneceu por aproximadamente 20 minutos em estufa a 37°C para secagem do fluorocromo. Após a secagem, a lamínula foi retirada utilizando água destilada. Sobre a lâmina foi adicionado 50 μ L da solução de montagem, e posicionado outra lamínula.

3.9.3 Leitura de lâminas

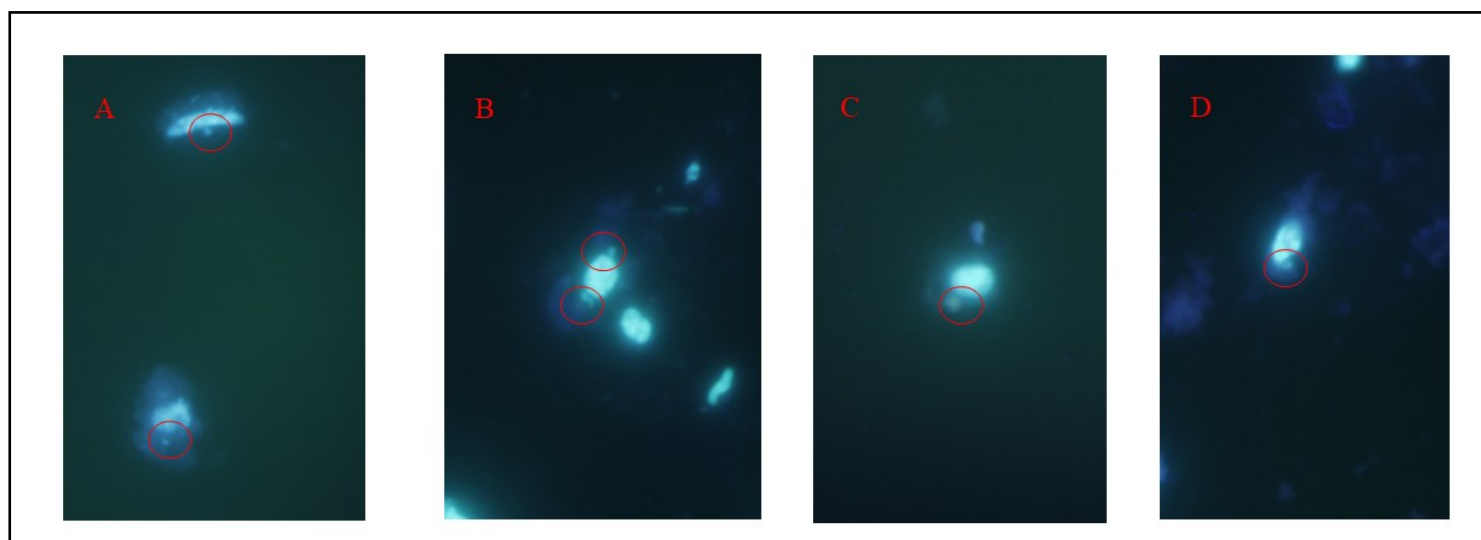
A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência Olympus®, do laboratório de Morfologia, Microscopia e Imagem (LAMОВI) da Universidade Federal de Uberlândia. Para tanto, foi feita a contagem de micronúcleos nas células, em uma amostragem de 1000 células por lâminas. Deve-se ressaltar que todos os tratamentos, foram utilizados na confecção de lâminas para análise citogenética, de forma que foram analisadas 3 lâminas/animal/tratamento.

3.10 Análise estatística

Análise estatística foi realizada com o software Sigma Plot versão 11.0 (Systat Software Inc., EUA). A análise dos dados foi realizada por meio da comparação das médias entre os tratamentos pelo teste de Fisher (LSD) com significância estatística estabelecida de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

A presença de micronúcleos nas células foi identificada pela coloração com o fluorocromo Hoechst 33258 (Figura 3).



Fonte: próprio autor

Figura 3: Detecção de micronúcleos em células ovarianas de fetos bovinos. A: células micronucleadas encontradas no grupo controle (CF). B: célula com dois micronúcleos encontradas no grupo tratado com vitrificação (CV). C: célula micronucleada encontrada no grupo submetido à xenotransplante (XF). D: célula micronucleada encontrada no grupo submetido à vitrificação e ao xenotransplante.

Os resultados da análise de micronúcleos estão dispostos na tabela 1. Não houve diferença entre os grupos de tratamento do controle vitrificado (CV), xenotransplante fresco (XF) e xenotransplantados vitrificado (XV). No entanto, nota-se diferença entre o tratamento de controle fresco com os outros tratamentos. Entretanto, não houve diferença entre os tratamentos quando analisados o número de células com mais de 1 micronúcleo. Demonstrando que o nível de agressividade dos tratamentos não foi maior em nenhum tratamento.

Tabela 1 – Quantidade células com micronúcleos (MN) encontrados em fragmentos de ovários de fetos bovinos submetidos aos tratamentos controle fresco (CF), controle vitrificado (CV), xenotransplante fresco (XF) e xenotransplantados vitrificado (XV), em 1000 células.

Tratamento	Nº de MN (média $\pm$ epm)	> 1 MC (média $\pm$ epm)
CF	7,8 $\pm$ 0,6 ^a	0,6 $\pm$ 0,2 ^a
CV	11,4 $\pm$ 1,6 ^b	0,8 $\pm$ 0,4 ^a
XF	10,4 $\pm$ 0,6 ^b	0,2 $\pm$ 0,1 ^a
XV	10,0 $\pm$ 0,9 ^b	0,4 $\pm$ 0,2 ^a

Letras diferentes na coluna, diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

A frequência de micronúcleos em células de tecido ovariano fornece um índice de dano genético acumulado que ocorre durante o tempo de vida dessas células. Para a aplicação do teste do micronúcleo como monitor citogenético de dano cromossômico, o nível de danos ao DNA na população “normal” deve ser identificado. A média obtida em nossa amostra foi de 7,8 $\pm$ 0,6 células micronucleadas no total de 1000 células analisadas no controle fresco. No presente trabalho os resultados apresentaram valores menores (7,8 $\pm$ 0,6) do que valores encontrados por outros autores (10) se encaixam com valores encontrados em outros trabalhos. (TANG et al., 2018).

Os resultados encontrados no presente estudo, demonstraram que houve aumento na frequência de micronúcleos em células do grupo controle (CF) com os demais tratamentos a que o tecido foi submetido (CV, XF e XV).

O presente estudo demonstrou haver diferença entre o grupo controle (CF) e o grupo tratado com vitrificação (CV). Sabendo que a vitrificação demanda uma alta concentração de crioprotetores para que as células suportem as baixas temperaturas de resfriamento e que o uso de crioprotetores pode ser danoso ao DNA, dependendo da concentração e do tempo que a célula permanece em contato com esses agentes. Podemos assim, explicar este resultado. Além do efeito negativo do crioprotetor, submeter as células a temperatura muito baixas, pode comprometer a integridade das membranas e de organelas, o que pode levar a danos ao DNA com a formação dos micronúcleos.

A diferença encontrada entre a frequência de micronúcleos nas células do grupo submetido à xenotransplante e o grupo controle (CF), demonstra que o estresse gerado no tecido submetido a esse tratamento, é capaz de danificar a estrutura do DNA. Uma possível explicação para este fato, é que possíveis inflamações que podem ter ocorrido durante os 14 dias em que o fragmento ovariano permaneceu transplantado no camundongo, possa ter induzido estresse oxidativo no tecido. Segundo Bartsch e Nair (2006), a ativação de células inflamatórias, induzem enzimas produtoras de oxidantes, como NADPH oxidase, óxido nítrico sintase induzida (iNOS), xantina oxidase (XO) e mieloperoxidase, que por sua vez, essas enzimas são responsáveis pela geração de altas concentrações de diversas espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), que reagem umas com as outras para formar espécies reativas, muitas vezes mais potentes, como o peroxinitrito. Essas espécies reativas são capazes de danificar o DNA, produzindo quebras em sua estrutura.

Devido ao efeito genotóxico tanto da vitrificação quanto do xenotransplante, seria esperado que o tecido que passou por ambas as técnicas apresentasse uma frequência de micronúcleos ainda maior do que o tecido apenas vitrificado ou xenotransplantados. O que não foi verificado neste estudo. Uma possível explicação, seria que a maquinaria de reparo das células contra os danos ao DNA, tenha sido capaz de cumprir o seu papel durante o período que permaneceu transplantado no camundongo, reparando então os defeitos ao DNA, seja por meio da indução celular à apoptose ou por reincorporação do fragmento de DNA perdido da célula.

Em resumo, os resultados encontrados neste trabalho, questionam a segurança da utilização da vitrificação como método de preservação celular, bem como a utilização do xenotransplante como uma técnica reprodutiva. Pois, não se apresentam completamente seguras geneticamente. Uma vez que a maior incidência de instabilidade cromossômica na população infértil é amplamente conhecida. Trkova et al. (2000), mostraram que as frequências de micronúcleos estão aumentadas em casais com infertilidade ou com dois ou mais abortos espontâneos. Milosevic-Djordjevic et al. (2012), mostram que as frequências médias de micronúcleos em pacientes masculinos e femininos aumentaram em comparação com as frequências médias de micronúcleos de controles saudáveis de homens e mulheres. Além disso a influência genética desse defeito nas gerações futuras, não é bem definido. Podendo caracterizar ou não deleção de genes que possuam características importantes para a sobrevivência da espécie.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados encontrados no presente trabalho, é possível concluir que o xenotransplante e a vitrificação são capazes de gerar danos a estrutura do DNA, propiciando a formação de micronúcleos em células do tecido ovariano de fetos bovinos.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINI, J. M. S. O teste do micronúcleo: seu uso no Homem. **Biotemas**, v. 6, n. 2, p. 1–19, 1993.
- BARTSCH, H.; NAIR, J. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: Role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 391, n. 5, p. 499–510, 2006.
- CHAVES, T. F.; NICOLAU, L. S. Genética e cariotipagem humana. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 4, 2013.
- COX, S.-L.; SHAW, J.; JENKIN, G. Transplantation of cryopreserved fetal ovarian tissue to adult recipients in mice. **Journal of Reproduction and Fertility**, n. 107, p. 315–322, 1996.
- DAÍ, J.; WU, C.; MUNERI, C. W.; NIU, Y.; ZHANG, S.; RUI, R.; ZHANG, D. Changes in mitochondrial function in porcine vitrified MII-stage oocytes and their impacts on apoptosis and developmental ability. **Cryobiology**, v. 71, p. 291–298, 2015.
- MILOSEVIC-DJORDJEVIC, O. et al. Chromosomal instability in peripheral blood lymphocytes of patients with reproductive failure assessed by micronucleus assay. **Reproductive Toxicology**, v. 63, n. 3, p. 367–375, 2012.
- FABRI, R.; PASQUINELLI, G.; KEANE, D.; MAGNANI, V.; PARADISI, R.; VENTUROLI, S. Optimizarion of protocols for human ovarian tissue cryoprsvation with sucrose 1,2- propanediol and human serum. **Reproductive BioMedicine Online**, 21, p. 819–828, 2010.
- FENECH, M. et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125–132, 2011.
- GERSEN, S. L.; KEAGLE, M. B. **The Principles of Clinical Cytogenetics**. 2. ed. [s.l.] Totowa, NJ, 2005.
- GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R. DE; FREITAS, V. J. DE F. **Biotécnicas Aplicadas a Reprodução Animal**. 2. ed., 2008.
- JÚNIOR, J. M. C. Melhoramento Genético Animal. In: **Livro EMBRAPA**, p. 197–208, 2010.
- KAGAWA, N.; SILBER, S.; KUWAYAMA, M. Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. **Reproductive biomedicine online**, v. 18, n. 4, p. 568–77, 2009.

- KLOBUTCHER, L. A. **The In Vitro Micronucleus Assay**. [s.l: s.n.].
- MACEDO, M. F. DE; BEZERRA, M. B. Xenotransplante de tecidos ovários em animais : Limitações , técnicas e inovações . Uma Revisão. p. 580–591, 2015.
- REXOAD, C. E.; CASIDA, L. E.; TYLER, W. J. Crow-rump flength of fetuses in purebred holstein-friesian cows. **Journal of Dairy Science**, v.57, n.3, p.346-347, 1974.
- RODRIGUES, A. P. R. et al. Avanços na criopreservação de tecido ovariano de cabras e ovelhas. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 8, n. SUPPL. 2, p. 284–291, 2014.
- ROSSETTO, C. F. R. Avaliação do Bandeamento Cromossômico por Digestão enzimática e Tratamento com Solução Tampão Citratado. p. 62, 2015.
- SHAFFER, L. G.; LUPSKI, J. R. Molecular Mechanisms for Constitutional Chromosomal Rearrangements in Humans. **Annual Review of Genetics**, v. 34, n. 1, p. 297–329, dez. 2000.
- SOSA, V. et al. Oxidative stress and skin cancer: An overview. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 28, n. 2, p. 110–115, 2013.
- STOPPER, H.; MULLER, S. O. Micronuclei as a Biological Endpoint for Genotoxicity: A Minireview. **Toxicology in Vitro**, p. 661–667, 1997.
- TANG, Z. et al. Active DNA end processing in micronuclei of ovarian cancer cells. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2018.
- TING, A. Y.; YEOMAN, R. R.; LAWSON, M. S. L.; ZELINSKI, M. B. In vitro development of secondary follicles from cryopreserved rhesus macaque ovarian tissue after slow-rate freeze or vitrification. **Human Reproduction**, v. 26, n. 9, p. 2461-2472, 2011.
- TRKOVÁ, M. et al. Increased micronuclei frequencies in couples with reproductive failure. **Reproductive Toxicology**, v. 14, n. 4, p. 331–335, 2000.
- WANG, F.; TIAN, X.; ZHANG, L.; HE, C.; JI, P.; LI, Y.; TAN, D.; LIU, G. Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, v.101, p.577-586, 2013.
- WU, J. C.; SANTI, D. V. The molecular structure of the complex of Hoechst 33258 and the DNA dodecamer d(CGCGAATTCGCG). **Nucleic acids research**, v. 16, n. 2, p. 703–717, 1988.