

Meio condicionado de células-tronco mesenquimais da geleia de Wharton promove o desenvolvimento e reduz a produção de espécies reativas de oxigênio após cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos

Conditioned medium from Wharton's jelly mesenchymal stem cells promotes development and reduces production of reactive oxygen species after in vitro culture of goat preantral follicles

A.F.B. Silva¹, L. Miglio¹, V.C. Bernardelli², R.F. Silva¹, L.F. Lima¹, J.R. Figueiredo¹

*¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – UECE, Fortaleza, CE, Brasil. ²Instituto de Ciências Biomédicas – UFU, Uberlândia, MG, Brasil

INTRODUÇÃO

Folículos pré-antrais (FOPAs) cultivados *in vitro* têm menor capacidade de desenvolvimento do que aqueles crescidos *in vivo*. Durante o cultivo *in vitro* (CIV), os FOPAs são expostos à concentração supra-fisiológica de oxigênio (20%), ocasionando o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e promovendo o estresse oxidativo (EO). O EO durante o CIV prejudica o desenvolvimento dos FOPAs ao danificar suas estruturas celulares e moleculares. Para transpor essa limitação, vem-se testando a adição de diferentes substâncias ao meio de CIV, como meios condicionados (MC) oriundos do CIV de células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da geleia de Wharton (MC-CTMGW). O MC-CTMGW é rico em substâncias secretadas por essas células, como: fatores de crescimento, anti-apoptóticos e antioxidantes. No entanto, não havia relatos sobre seu efeito no meio de CIV de FOPAs caprinos. Diante disso, objetivou-se investigar o efeito da adição do MC-CTMGW durante o CIV de FOPAs caprinos inclusos em tecido ovariano.

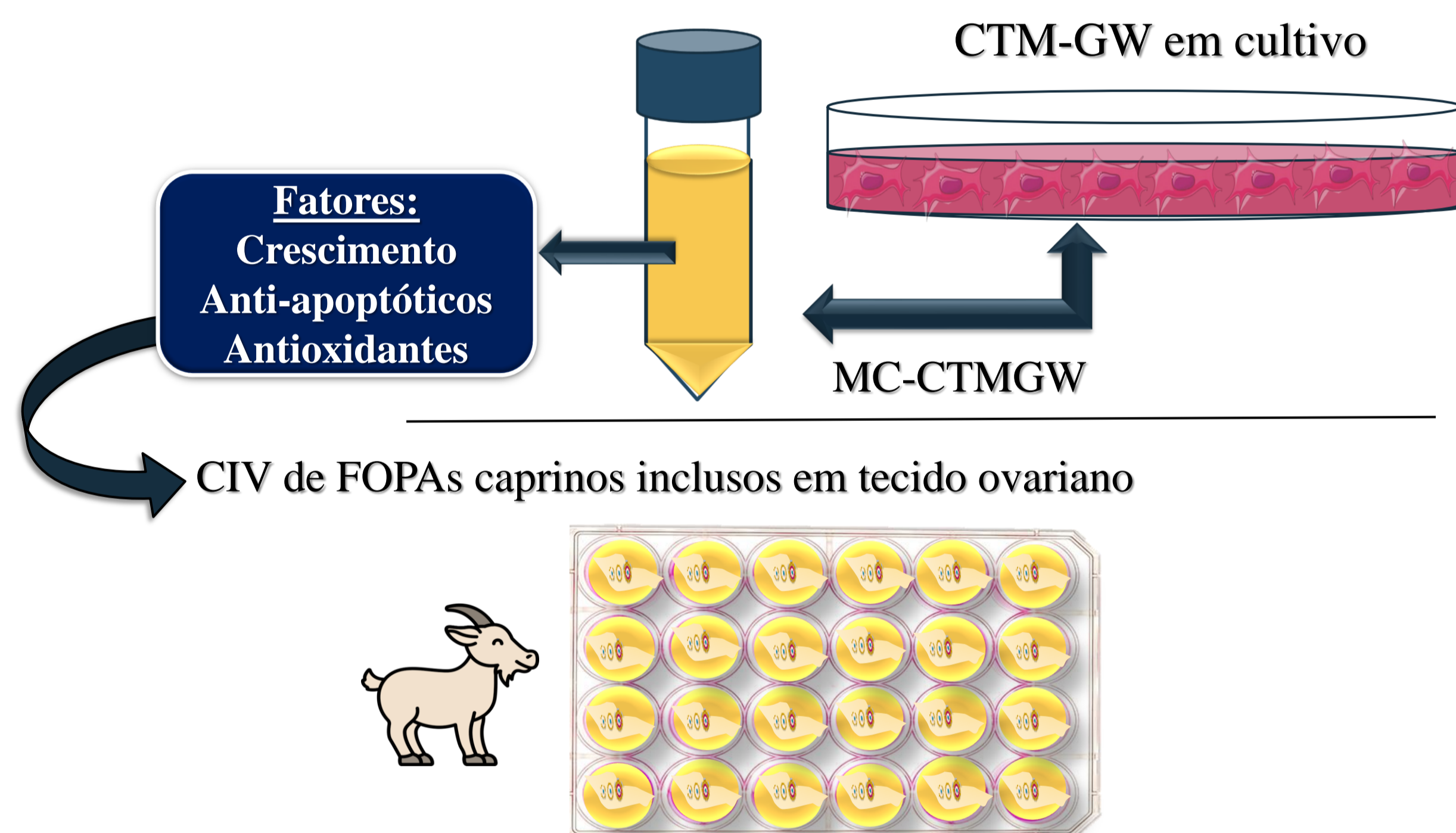


Fig 1. Utilização de MC-CTMGW no CIV de FOPAs caprinos. Fonte: Autores

METODOLOGIA

CTM-GW foram coletadas de cordões umbilicais de fetos caprinos (n=3) e submetidas a um ensaio de biocompatibilidade em meio de base Alfa Meio Essencial Mínimo modificado (α -MEM) com suplementos de células-tronco, a fim de que atingissem 80% de confluência na terceira passagem, para a obtenção do MC. Posterior a obtenção do MC, o córtex de ovários caprinos (n=6) foi dividido em fragmentos (n=15), sendo fragmentos (n=5) encaminhados à análise histológica (controle não cultivado). Os fragmentos remanescentes foram destinados ao CIV por 7 dias nos seguintes tratamentos: 1) α -MEM⁺ (meio folicular) e 2) α -MEM⁺ + MC (meio folicular + meio condicionado - v/v). Ao final, os parâmetros avaliados foram sobrevivência e desenvolvimento (histologia) e níveis de EROs (meios coletados). As variáveis foram analisadas por ANOVA unidirecional seguida dos testes de Fisher LSD e T não pareado. O nível de significância foi de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tratamentos cultivados reduziram (P<0,05; Tabela 1) o percentual de FOPAs normais, enquanto aumentaram (P<0,05) o de FOPAs em desenvolvimento quando comparado ao controle não cultivado. Além disso, o maior (P<0,05) percentual de FOPAs em desenvolvimento e menor nível de EROs (P<0,05; Fig. 2) foram observados no α -MEM⁺ + MC. Estudo anterior mostrou que durante a produção *in vitro* de embriões em bubalinos, a substituição do meio de CIV por 50% de MC-CTMGW melhorou a taxa de formação de blastocistos e qualidade embrionária, comprovada pelo aumento do número de células totais nos blastocistos. Outrora, FOPAs ovinos isolados cultivados com 50% de MC-CTMGW tiveram taxas de crescimento superiores, bem como níveis inferiores de EROs intracelulares nos oócitos obtidos após o CIV nessas condições.

Tabela 1. Percentual (\pm EPM) de folículos normais e em desenvolvimento antes (controle não cultivado) e após CIV por 7 dias em α -MEM⁺ e α -MEM⁺ + MC.

Tratamentos	Folículos Normais	Folículos em desenvolvimento
Controle não cultivado	93,3 \pm 1,3	29,5 \pm 2,4
	Dia 7	Dia 7
α -MEM ⁺	41,2 \pm 4,3 ^{A*}	44,1 \pm 2,2 ^{A*}
α -MEM ⁺ + MC	49,1 \pm 6,2 ^{A*}	62,5 \pm 2,2 ^{B*}

*Indica diferença quando comparado ao controle não cultivado (P < 0,05). ^{A,B} Indica diferença entre tratamentos cultivados.

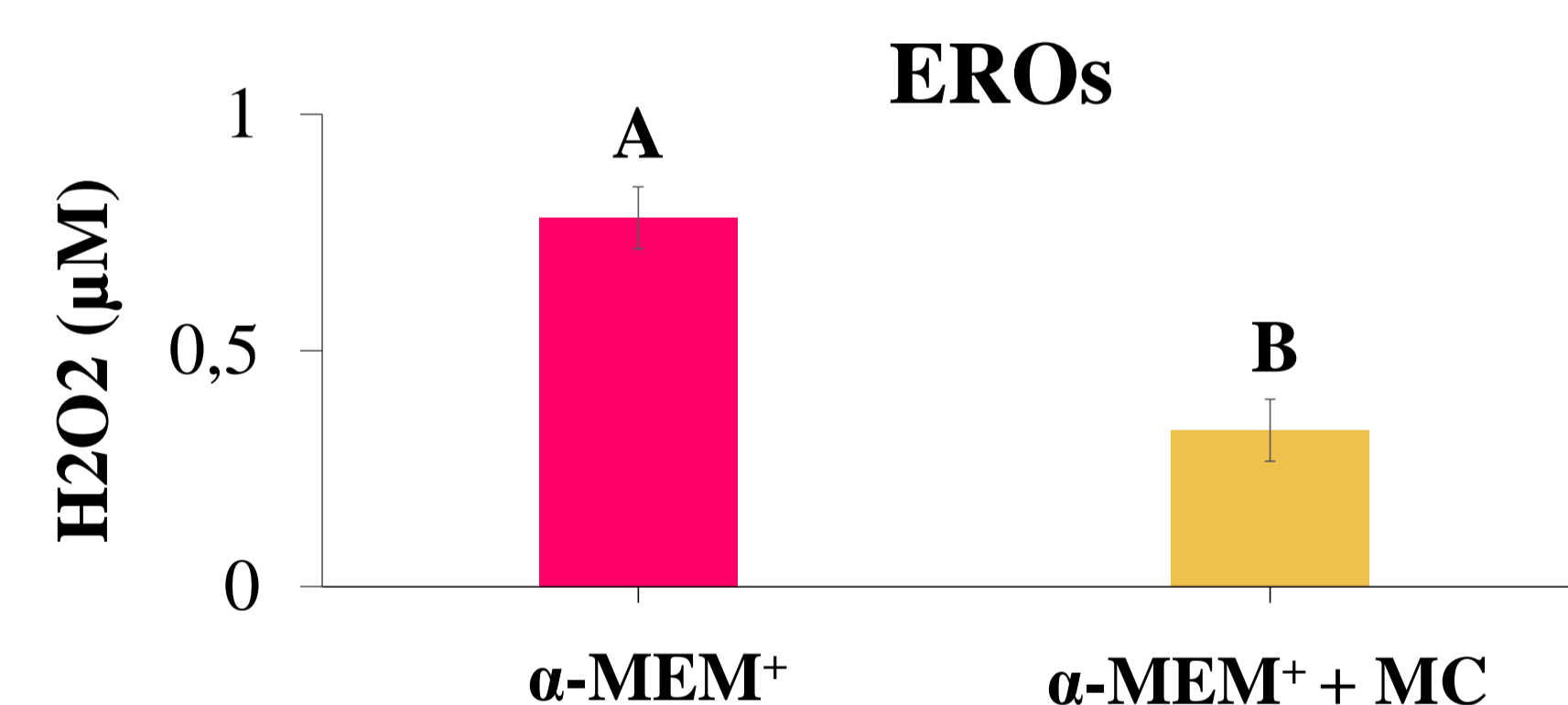


Fig 2. Produção de EROs (média \pm EPM) após CIV de FOPAs por 7 dias nos tratamentos α -MEM⁺ e α -MEM⁺ + MC. ^{A,B} Indica diferença entre tratamentos cultivados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, o MC-CTMGW melhora o desenvolvimento *in vitro* de FOPAs caprinos via redução de EROs.

REFERÊNCIAS

- BEZERRA, M. E. S et al. Conditioned medium of ovine Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells improves growth and reduces ROS generation of isolated secondary follicles after short-term *in vitro* culture. **Theriogenology**, v. 125, p. 56-63, 2019.
- BHARDWAJ, R et al. Stem cell conditioned media contains important growth factors and improves *in vitro* buffalo embryo production. **Animal Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 118-125, 2016.
- FIGUEIREDO, J. R.; LIMA, L. F. Tecnologia do ovário artificial: aplicações, estado da arte, limitações e perspectivas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, 2017.