



Uso de modelo de capilaridade – cumulus oophorus no selecionamento de espermatozóides sem fragmentação do DNA para injeção intracitoplasmática (ICSI)

Palavras-Chave: Células do cumulus; Swim up; Seleção de espermatozóides

Autores:

Marina Bertolini Matheus – PUC-Campinas

Dr. Ubirajara Ferreira – FCM-UNICAMP

Dr. Wagner Eduardo Matheus - FCM-UNICAMP

Dr. Mauro Bibancos de Rose - PUC-Campinas

INTRODUÇÃO:

A fecundação é o fenômeno que ocorre quando o espermatozóide se une ao ovócito para a formação de um zigoto. Para que ocorra, é crucial que o espermatozóide capacitado penetre os envoltórios ovulares possibilitando o encontro do gameta feminino e masculino. A interação oócito-espermatozóide eficiente é o que garante o sucesso na formação do blastocisto, mas para isso é necessário uma integralidade do DNA espermático.

A camada do cumulus oophorus, apesar de ainda estar sendo estudado, atua tanto no aporte metabólico quanto na maturação do oócito, além de participar na reação acrossômica, revelando sua importância no processo da fecundação. Ao servir como uma barreira que seleciona e induz a reação acrossômica, o cumulus oophorus também atua como método de selecionamento espermático contribuindo para o preparo seminal. Em 2004, foi desenvolvido o primeiro modelo capilar com cumulus para avaliar o efeito no espermatozóide. Posteriormente avaliado, mostrou uma morfologia normal dos gametas masculinos que atravessaram a membrana.

O espermatozóide é selecionado tanto por sua motilidade quanto por sua morfologia para que haja um sucesso na fecundação do óvulo. Paralelamente, a fragmentação do DNA seminal é um preditor negativo da fertilização e vem sendo documentada como um dos desafios para obter bons resultados na reprodução assistida. Nesse contexto, o atual estudo tem como objetivo avaliar se a barreira capilar celular do cumulus poderia ser um novo passo laboratorial para o selecionamento de espermatozóides com baixa fragmentação do DNA trazendo um novo critério para a maior competência espermática.

OBJETIVO:

Dado que os trabalhos que tratam do papel da barreira do cumulus abordam o papel desse na maturação e no aporte metabólico do oócito, normalmente não retratam o papel no selecionamento espermático; este trabalho tem como objetivo avaliar barreira capilar celular do cumulus poderia ser um novo passo laboratorial para o selecionamento de espermatozóides com baixa fragmentação do DNA trazendo um novo critério para a maior competência espermática na injeção intracitoplasmática.

METODOLOGIA:

Amostras seminais e cumulus oophorus estão sendo obtidas de pacientes atendidos no Fertility Medical Group. As amostras estão sendo descartadas após a denudação dos oócitos e as amostras seminais após sua análise. Consentimento informado e comitê de ética do Hospital do Coração (HCOR) (CFM, 1992, CNS 1996).

Ao todo 70 pacientes estão sendo selecionados.

Amostras Seminais

Amostras seminais estão sendo obtidas por pacientes que acordaram em ser doadores para o estudo. Depois da liquefação a 37 °C, a análise seminal básica está sendo feita de acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010). Posteriormente o processamento por técnica de swim-up. Apenas amostras com contagens normais estão sendo consideradas no estudo. Baseado na concentração das amostras, estão sendo deixadas ajustadas amostras com 10 milhões/ml em meio HTF modificado (Irvine Scientific, USA) suplementado com 10% synthetic serum substitute (SSS, Irvine Scientific) pré aquecido a 37 ° C.

Coleta dos cumulus oophorus

Todos os pacientes possuem dificuldades para engravidar e estão em tratamento de FIV com estimulação ovariana e com protocolo padrão da clínica. Os oócitos estão sendo recuperados pela aspiração folicular e o cumulus removido mecanicamente usando 2 agulhas (13 mm x 0.45 mm).

Com a pipeta de vidro, células do cumulus serão separadas na placa em meio citado anteriormente. Usados apenas oócitos com aparência de expandidos e assim selecionados.

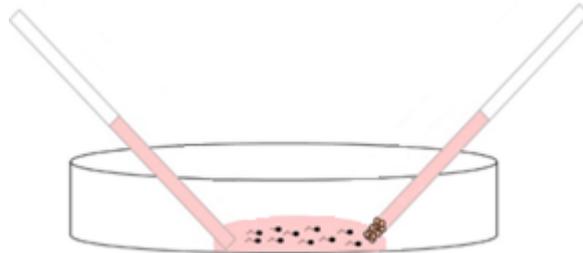
Modelo in vitro capilar-cumulus oophorus

O desenvolvimento desse modelo (Fig. 1; Hong et al., 2004). Estão sendo usados capilar de vidro com diâmetro de 1.1 mm e uma seringa de 1 ml. Conectando a seringa ao capilar, HTF (Irvine Scientific) suplementado com 10% synthetic serum substitute (SSS Irvine Scientific) aquecido a 37 ° C aspirados ao comprimento de 10 mm do fim do capilar, seguido de 1 cm de tecido de células do cumulus. A capilaridade está sendo feita pelo contato com a gota de 500 ul de espermatozóides em suspensão

previamente preparado (concentração de 10 milhões/ml) a ângulo de 45 °. O sistema está sendo coberto com óleo mineral (Ovoil, Vitrolife) e aquecido a 37° C por 1 hora.

A capilaridade contendo o meio suplementado servirá de controle.

Depois da incubação, o capilar será retirado a amostra será analisada evidenciando a diferença entre a amostra apenas com meio de cultura no capilar (pré e pós), apenas com swim up (pré e pós) e por



último com o sistema capilar-cumulus oophorus.

Figura 1: Representação *modelo capilar-cumulus oophorus* para seleção de espermatozoides.

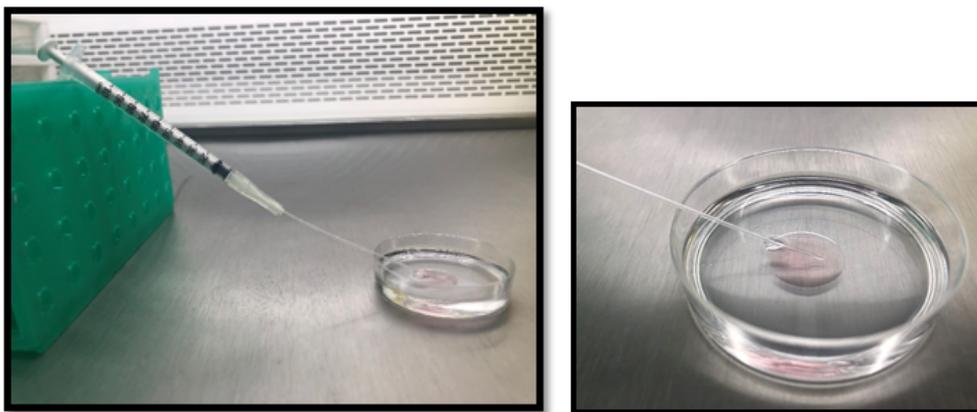


Figure 2: *Modelo Capilar-cumulus oophorus*

RESULTADOS ESPERADOS:

A partir dos resultados obtidos neste estudo, espera-se comprovar a eficácia do modelo cumulus-capilar para seleção de espermatozoides com maior potencial de fertilização e desenvolvimento embrionário. Caso possamos comprovar a superioridade deste método na seleção de espermatozoides, o mesmo poderá ser utilizado futuramente em estudos clínicos a fim de melhorar os resultados dos ciclos de fertilização in vitro.

BIBLIOGRAFIA:

Ávila, Isabela; Efeito de um meio condicionado por células do cumulus oophorus de bovinos na maturação e no potencial de desenvolvimento embrionário in vitro de oócitos desnudos; Repositório Escola de Veterinária da UFMG; Belo Horizonte; 2017.

Scanzani, Mayra; expansão do cumulus oophorus de oócitos bovinos maturados in vitro na presença de fosfatidilcolina ou ácido linoleico conjugado; Universidade de São Paulo Faculdade de Filosofia, Ciência e Letras de Ribeirão Preto Departamento de Biologia; 2013

Gottardi, F.P. et al. Efeito das células do cumulus e cisteamina durante o cultivo de maturação in vitro de oócitos bovinos sobre a maturação nuclear e aquisição da competência para desenvolvimento embrionário. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia [online]. 2012, v. 64, n. 2 [Acessado 20 Abril 2022] , pp. 245-252.

R.N. Chaves , A.B.G. Duarte, M.H.T. Matos, J.R. Figueiredo; Sistemas de cultivo in vitro para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos; Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.34, n.1, p.37-49, jan./mar. 2010.

Emílio César Martins Pereira, Alan Maia Borges , Eunice Oba; Maturação in vitro de oócitos bubalinos e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário; Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.40, n.2, p.43-50, abr./jun. 2016.