

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM TRETINOÍNA NANOENCAPSULADA NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS

LUCAS, Caroline¹; HAAS, Cristina Sangoi¹; LEON, Priscila Marques Moura de¹; BECK, Ruy Carlos Ruver²; COLLARES, Tiago¹

¹Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese Animal, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas

²Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
carol_gl@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

A maturação oocitária é uma parte integrante do ciclo reprodutivo que permite gerar oócitos maduros capazes de sustentar o desenvolvimento pré-implantacional e completo de embriões (Hanna *et al.*, 2012). O melhoramento dos protocolos de maturação *in vitro* (MIV) através da suplementação com diferentes hormônios, vitaminas e outras moléculas, permite maior eficiência na fertilização e embriogênese (Lima *et al.*, 2006).

A suplementação com ácidos retinóicos vem demonstrando o efeito benéfico no processo de maturação citoplasmática, agindo no desenvolvimento inicial embrionário (Deb *et al.*, 2011) e competência oocitária (Hidalgo *et al.*, 2003). A tretinoína (TTN, ácido retinóico *all-trans* - ATRA) é um retinóide natural e metabólito ativo da vitamina A (Ourique *et al.*, 2008), que ainda é pouco estudado em relação à sua atividade e suplementação na MIV.

Estudos vêm demonstrando a presença de subtipos α e β do receptor retinóide X (RXR α , RXR β) para a TTN no oócito, em blastocistos eclodidos e nas células do *cumulus* (Mohan *et al.*, 2001; Mohan *et al.*, 2002). Além disso, Barekati *et al.* (2008), observou o aumento das taxas de maturação e competência em oócitos desnudos de camundongos maturados *in vitro* na presença de ácidos retinóicos, sugerindo efeito benéfico destas moléculas sobre o processo de MIV.

Uma das alternativas para a avaliação da ação deste composto é a utilização de testes colorimétricos que permitem quantificar, através da emissão de fluorescência, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). O aumento do estresse oxidativo observado nos processos de manipulação *in vitro* causa a fragmentação de DNA, a oxidação de proteínas e peroxidação lipídica, interferindo na embriogênese (Hashimoto *et al.*, 2000).

Nexte contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a presença EROs nos complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) bovinos submetidos ao processo de MIV em meio suplementado com diferentes concentrações de tretinoína livre e nanoencapsulada.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

2.1 Obtenção dos complexos *cumulus*-oócitos (CCOs)

Os ovários utilizados para a obtenção dos CCOs foram coletados de fêmeas bovinas abatidas em frigorífico localizado na cidade de Pelotas/RS. Os CCOs foram aspirados dos folículos com tamanhos entre 2 a 8 mm de diâmetro.

A seleção dos CCOs foi realizada de acordo com as características morfológicas (Loos *et al.*, 1989), avaliando-se o número de camadas e grau de

compactação das células do *cumulus*, homogeneidade do citoplasma e integridade da zona pelúcida. Apenas os oócitos considerados viáveis foram selecionados.

2.2 Delineamento experimental

Foram estabelecidos 10 grupos experimentais, de acordo com a suplementação do meio de MIV, com diferentes concentrações de tretinoína livre e nanoencapsulada, além dos grupos controles (maturado somente na presença de nanocápsulas, somente com o meio de MIV e imaturo); cada grupo experimental foi composto de \pm 60 oócitos. Para os grupos da tretinoína livre e nanoencapsulada, foram utilizadas as concentrações de 0,25, 0,5 e 1 μ M. Da mesma forma, foi realizado o grupo controle com as mesmas concentrações das soluções de nanocápsula.

2.3 Maturação *in vitro*

As placas contendo os CCOs foram submetidas a MIV em estufas de cultivo a 5% de CO₂ e 38,5°C, durante 22-24 h. Após este período, os CCOs foram desnudados em solução de 80UI de hialuronidase Tipo I-S (Sigma®- Aldrich, Alemanha).

2.6 Quantificação das espécies reativas de oxigênio

A formação de espécies reativas de oxigênio foi avaliada nos oócitos desnudados após a maturação *in vitro* segundo Morado *et al.* (2009). Os oócitos foram incubados em gotas de PBS (*phosphate buffer saline*) contendo diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (Sigma-Aldrich®) durante 30 min. O DCFDA (diacetato 2',7'-diclorofluoresceína) penetra nas células sendo hidrolisado por esterases e transformado no composto não fluorescente 2',7' -diclorofluoresceína (DCFH), impermeável à membrana celular (Hashimoto *et al.*, 2000). Este, em presença de EROs é rapidamente oxidado e transformado em diclorofluoresceína (DCF) que emite fluorescência quando excitado em 503 nanômetro.

Após transcorrido o tempo determinado, as emissões fluorescentes dos oócitos foram registradas utilizando uma câmara digital ligada a um microscópio invertido de fluorescência. A intensidade emitida foi quantificada através do software Cell[^]F, o qual gerou dados numéricos de intensidade de fluorescência, em pixels.

2.7 Análise estatística

Os resultados dos testes colorimétricos foram analisados por Two-way ANOVA, sendo considerados significantes valores de $P \leq 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados, representados no gráfico (Fig. 1), mostraram maior produção de EROs no grupo controle maturado, não havendo diferenças entre os tratamentos e os controles imaturo e nanocápsulas. No entanto, foi visto que tanto tretinoína nanoencapsulada como livre a 1 μ M, protegem a célula de maneira mais eficaz contra os danos oxidativos, diminuindo a produção de EROs. A utilização de concentrações mais baixas possui função inversa, sendo notado o aumento do estresse oxidativo nessas condições.

A ação antioxidante dos retinóides já foi descrita anteriormente, demonstrando que estes compostos são considerados importantes reguladores das

vias de sinalização das reações de redução-oxidação (redox) (Olson, 1993), e que ácidos retinóicos *all-trans* protegem contra a apoptose induzida pela presença de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em células mesangiais e fibroblastos (Konta *et al.*, 2001).

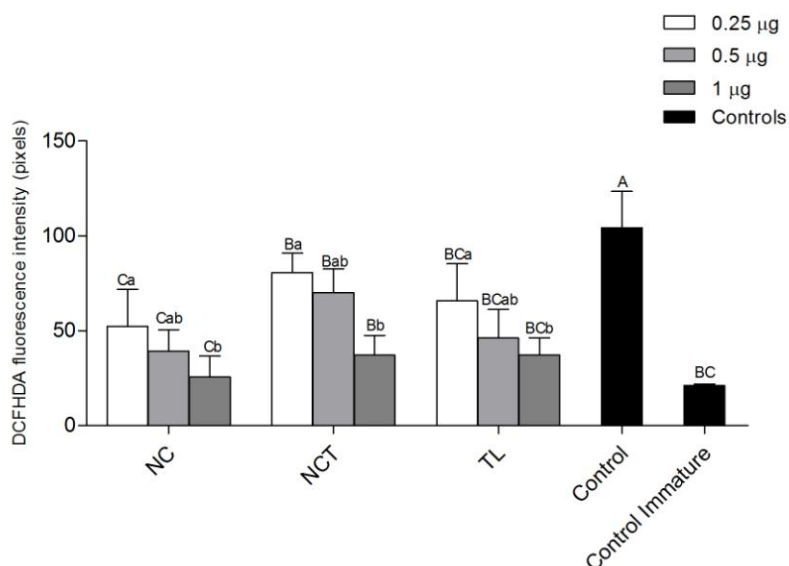


Figura 1. Gráfico da produção de EROs nos tratamentos e grupos controles (maturados, imaturos e nanocápsulas). *NC= somente nanocápsulas; *NCT= tretinoína nanoencapsulada, *TL= tretinoína livre.

4 CONCLUSÃO

A tretinoína nanoencapsulada a 1 µM oferece maior proteção contra o estresse oxidativo aos CCOs maturados *in vitro*. A realização de estudos a nível molecular, através da utilização de marcadores da competência oocitária, surge como alternativa para esclarecer a função da tretinoína nanoencapsulada na maturação *in vitro* e no desenvolvimento embrionário.

5 REFERÊNCIAS

- BAREKATI, Z., GOURABI, H., VALOJERDI, M.R., YAZDI, P.E. Previous maternal chemotherapy by cyclophosphamide (Cp) causes numerical chromosome abnormalities in preimplantation mouse embryos. **Reproductive Toxicology**. v. 26, p. 278-28, 2008.
- DEB, G.K., DEY, S.R., BANG, J.I., CHO, S.J., PARK, H.C., LEE, J.G., KONG, I.K. 9-cis retinoic acid improves developmental competence and embryo quality during *in vitro* maturation of bovine oocytes through the inhibition of oocyte tumor necrosis factor-alpha gene expression. **Journal of Animal Science**. v. 89, p. 2759-2767. 2011
- HANNA, C.B., YAO, S., WU, X., JENSEN, J.T.. Identification of phosphodiesterase 9A as a cyclic guanosine monophosphate-specific phosphodiesterase in germinal vesicle oocytes: a proposed role in the resumption of meiosis. **Fertility and Sterility**, 2012.

HASHIMOTO, S., MINAMI, N., TAKAKURA, R., YAMADA, M., IMAI, H., KASHIMA, N. Low oxygen tension during in vitro maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus-oocyte complexes. **Molecular reproduction and development**, v.57, p. 353-360, 2000.

HIDALGO, C.O., DIEZ, C., DUQUE, P., FACAI, N., GOMEZ, E. Pregnancies and improved early embryonic development with bovine oocytes matured in vitro with 9-cis-retinoic acid. **Reproduction**. v. 125, p. 409-416, 2003.

KONTA, T., XU, Q., FURUSU, A., NAKAYAMA, K., KITAMURA, M. Selective roles of retinoic acid receptor and retinoid x receptor in the suppression of apoptosis by all-trans-retinoic acid. **The Journal of biological chemistry**. v. 276, p. 12697-12701, 2001.

LIMA, P.F., OLIVEIRA, M.A., SANTOS, M.H., REICHENBACH, H.D., WEPPERt, M., PAULA-LOPES, F.F., NETO, C.C., GONCALVES, P.B. Effect of retinoids and growth factor on in vitro bovine embryos produced under chemically defined conditions. **Animal Reproduction Science**, v.95, p. 184-192, 2006.

LOOS F, VAN VLIET C, VAN MAURIK P & KRUIP T. Morfology of immature bovine oocytes. **Gamete Research**.197-204, 1989.

MOHAN, M., MALAYER, J.R., GEISERT, R.D., MORGAN, G.L. Expression of retinol-binding protein messenger RNA and retinoic acid receptors in preattachment bovine embryos. **Molecular reproduction and development**, v.60, p. 289-296, 2001.

MOHAN, M., MALAYER, J.R., GEISERT, R.D., MORGAN, G.L. Expression patterns of retinoid X receptors, retinaldehyde dehydrogenase, and peroxisome proliferator activated receptor gamma in bovine preattachment embryos, **Biology of reproduction**, v.66, p.692-700, 2002.

MORADO, S.A., CETICA, P.D., BECONI, M.T., DALVIT, G.C. Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation in vitro, **Reproduction, fertility and development**, v. 21, p. 608-614, 2009.

OLSON, J.A. Vitamin A and carotenoids as antioxidants in a physiological context. **Journal of nutritional science and vitaminology**, v.39, p.57-65, 1993.

OURIQUE, A.F., POHLMANN, A.R., GUTERRES, S.S., BECK, R.C. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study, **International journal of pharmaceutics**, v.352, p.1-4, 2008.