

EFEITO DA TRETINOINA SOBRE A MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS

**REMIÃO, Mariana Härter¹; KOMNINO, Eliza Rossi¹; CAMPOS, Vinicius Farias¹;
COLLARES, Tiago¹; DESCHAMPS, João Carlos¹**

¹Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese Animal, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas
marri.hr@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma biotécnica amplamente utilizada na reprodução de bovinos para a multiplicação de animais de mérito genético superior e que se destacam por expressar características econômicas importantes. Sabe-se que a qualidade dos oócitos maturados *in vitro* exerce influência significativa sobre a fecundação, o desenvolvimento embrionário, e sobre o estabelecimento e a manutenção da prenhez. A maturação é, portanto, uma das mais importantes etapas da produção *in vitro* de embriões.

Espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas naturalmente durante o metabolismo celular. Em condições *in vitro*, a produção destas substâncias pode ser potencializada, como no caso do cultivo sob altas tensões de oxigênio (Abedelahi et al., 2010); excesso de glicose no meio de maturação (Hashimoto et al., 2000); e choque térmico por elevação da temperatura (Sakatani et al., 2004). Alguns antioxidantes naturais existem no interior das células para evitar esses danos oxidativos. Dentre eles se destacam as enzimas catalase e glutathione peroxidase, e peroxidases (Maia et al., 2003), que são bastante eficientes no combate às ROS, porém muitas vezes não são suficientes para evitar os danos que elas causam.

O ácido retinóico (RA), também conhecido por tretinoína, é um metabólito da vitamina A, necessário no processo de reprodução nos mamíferos. O RA é considerado um importante composto no desenvolvimento de vertebrados e já foram descritas evidências da sua relação com o desenvolvimento folicular; a maturação dos oócitos; o crescimento do embrião; a diferenciação celular; e a funcionalização dos tecidos fetais (Nasiri et al., 2010; Thahaei et al., 2010). Diferentes tipos de RA são importantes na formação embrionária dos vertebrados. No processo *in vitro*, a adição de retinol aumentou a viabilidade de embriões de ovelha (Almiñana et al., 2008), e sua adição no meio de maturação aumentou a taxa de desenvolvimento de oócitos bovinos (Figuriredo et al., 1994).

Esses e outros estudos demonstram o efeito benéfico que a vitamina A parece ter sobre a maturação *in vitro* de oócitos. Porém ainda não existem dados suficientes sobre esses efeitos, principalmente em bovinos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do ácido retinóico na maturação de oócitos bovinos *in vitro*, por 24 horas nas concentrações de 0, 1, 3 e 6 μ M de RA.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Os oócitos foram avaliados quanto à maturação, ao grau de expansão das células do *cumulus*, à degeneração, à produção de espécies reativas de oxigênio, e à viabilidade de membrana.

Ovários provenientes de abatedouro local, foram transportados em recipiente térmico até o laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese Animal, localizado no Centro de Desenvolvimento Tecnológico da UFPEL. Os complexos *cumulus* oócitos (CCOs) foram aspirados dos folículos com tamanhos entre 2-8 mm de diâmetro. O conteúdo folicular foi aspirado com auxílio de seringa de 20 ml e agulha 40 x 12, e colocado em tubo cônico de 50mL. O líquido folicular foi filtrado e lavado com PBS (phosphate buffer saline) em filtro coletor de embriões (Nutricell, Campinas-SP), e o depósito celular formado foi colocado em placa de petri para procura dos CCOs em lupa estereomicroscópica. Posteriormente, os oócitos foram avaliados quanto ao número de camadas e grau de compactação das células do *cumulus*, homogeneidade do citoplasma e integridade da zona pelúcida, sendo selecionados apenas os oócitos considerados viáveis. Grupos de 15 até 20 CCOs foram maturados em estufa a 38,5°C, com 5% de CO₂, durante 22 a 24 h.

A solução-estoque de ácido retinóico foi preparada em uma concentração de 3 mM, utilizando-se o etanol 96% como diluidor. A partir desta solução foram calculados os volumes necessários para suplementar o meio de maturação em cada grupo testado, nas devidas concentrações. A quantidade máxima de etanol contida no meio de maturação foi de 0,2%.

Após a seleção, os oócitos foram cultivados nas concentrações de 0, 1, 3 e 6 µM e ainda, em um controle, contendo 0,2% de etanol 96% em meio de maturação. Os oócitos foram mantidos de 22 a 24 horas em estufa a 38,5°C com 5% de CO₂. Ao final desse período, os oócitos foram avaliados para os seguintes parâmetros: taxa de maturação, grau de expansão das células do *cumulus*, taxa de degeneração, produção de espécies reativas de oxigênio e viabilidade de membrana. Para a análise destes três últimos, as células foram submetidas a métodos de coloração específicos. O protocolo de coloração para ROS foi seguido de acordo com Sakatani et. al. 2008, e a coloração utilizada para avaliar maturação e viabilidade de membrana foi seguida de acordo com Somfai et. al. 2007.

O grau de expansão de células cumulus foi avaliado subjetivamente após 24 h de MIV sob estereomicroscópio; COCs foram classificados como não expandidos, parcialmente expandidos (apenas a camada mais externa das células do cumulus expandida), ou totalmente expandida (todas as células do cumulus expandidas) de acordo com Marei et al. 2010.

A taxa de degeneração dos oócitos ao final do período de maturação foi avaliada subjetivamente com a observação dos oócitos, previamente desnudados, em microscópio de campo invertido (Olympus BX51).

Os dados gerados na coloração de ROS foram analisados no software Cell[^]F, o qual gerou dados numéricos de intensidade de fluorescência, em pixels. Para análise dos resultados obtidos aplicou-se o Teste one-way ANOVA em um nível de significância de 95%.

Para os dados da maturação e viabilidade de membrana, utilizou-se o protocolo de coloração baseado na utilização conjunta dos corantes Hoescht, Iodeto de propídeo e diacetato de fluoresceína conforme Somfai et. al. 2007. Os oócitos foram analisados em microscópio de fluorescência Olympus BX51, nos filtros de 340 nm e 450 nm. No filtro de 340 nm foi possível a visualização da extrusão do cospúsculo polar, indicando que a célula estava maturada. Já no filtro de 450nm foi possível observar as células coradas com verde, indicando membrana íntegra, e coradas com vermelho, indicando membrana lesada.

Os dados numéricos gerados na avaliação da maturação, degeneração e viabilidade de membrana foram analisados através do Teste Exato de Fischer.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados quanto à maturação *in vitro* e expansão das células do *cuasmulus* foram bastante satisfatórios nas diferentes concentrações de RA. O controle do etanol não apresentou diferença estatística em relação ao cultivo de 0 μ M, demonstrando que o diluente não foi danoso à maturação *in vitro* de oócitos bovinos. O mesmo resultado foi observado no cultivo de oócitos de camundongos com RA diluído em etanol (Nasiri et. al. 2010).

Quanto ao grau de expansão das células do cúmulus, observou-se que todos os grupos foram totalmente expandidos, porém naqueles cultivados com 3 μ M e 6 μ M de RA, percebeu-se uma incidência maior de oócitos atrésicos. Não houve diferença entre o grau de expansão dos CCOs dos grupos controle do etanol e cultivo sem RA (0 M), entretanto estes grupos apresentaram menor expansão do que aqueles CCOs cultivados com 1 μ M e 3 μ M de RA.

Na coloração de ROS, de acordo com o software Cell[^]F, houve uma maior fluorescência nos oócitos tratados com 6 μ M de RA, quando comparada aos outros grupos, que não diferiram entre si. O nível de fluorescência está diretamente relacionado à quantidade produzida de ROS pela célula.

Quanto às taxas de degeneração e maturação dos oócitos, não houve diferença estatística entre os grupos. Quanto à viabilidade de membrana, os grupos 3 μ M e 6 μ M apresentaram maior incidência de dano de membrana do que os demais grupos (Tab. 1).

Grupo	Dano de Membrana (%)	Taxa de maturação(%)	Taxa de degeneração (%)
0 μ M	(1/6) 17 ^a	(19/27) 70,3 ^a	(13/27) 31,6 ^a
1 μ M	(0/21) 0 ^a	(15/16) 93,7 ^a	(9/30) 30 ^a
3 μ M	(3/11) 27,2 ^b	(28/31) 90,3 ^a	(17/26) 65,3 ^a
6 μ M	(6/16) 37,5 ^b	(29/20) 68,9 ^a	(13/27) 48,1 ^a
Ctrl.etanol	(0/8) 0 ^a	(25/22) 88 ^a	(10/20) 50 ^a

Tabela 1 - Tabela demonstrando os dados, em porcentagem, das taxas de dano de membrana, maturação, e degeneração.

Outro dado observado foi a taxa de partenogênese na concentração de 6 μ M de RA. Nesta concentração obteve-se frequência de 11%, enquanto nas demais não foi observado nenhum oócito partenogênético.

4 CONCLUSÃO

O ácido retinóico nas concentrações testadas não influencia as taxas de maturação, de expansão das células do *cumulus* e de degeneração em CCOs bovinos. Entretanto, as taxas de dano de membrana e produção de espécies reativas de oxigênio aumentam, em concentrações maiores, indicando a toxicidade do fármaco nessas concentrações. Estudos para avaliar o potencial de influência da RA sobre os índices de maturação *in vitro* e os parâmetros de qualidade dos oócitos, deverão utilizar concentrações inferiores a 1 μ M. Esta concentração, embora não tenha aumentado os índices de maturação, também não induziu dano de membrana e nem aumentou os níveis intracelulares de ROS, aparentemente não sendo tóxica para os oócitos. Outros estudos também poderão investigar a indução de partenogênese através do uso de concentrações mais elevadas de RA, já que na concentração de 6 μ M observou-se uma taxa de 11% de oócitos partenogênicos.

5 REFERÊNCIAS

ABEDELAKHI, A; SALEHNIA, M; ALLAMEH, AA; DAVOODI, D. Sodium selenite improves the *in vitro* follicular development by reducing the reactive oxygen species level and increasing the total antioxidant capacity and glutathione peroxide activity. **Human Reproduction**, v. 25, p. 977–985, 2010.

ALMIÑANA, C; GIL, MA; CUELLO, C; CABALLERO I; ROCA J; VAZQUEZ, JM; *In vitro* maturation of porcine oocytes with retinoids improves embryonic development. **Reprod Fertil Dev**, v. 20, p. 483–9, 2008.

FIGUIREDO, JR; HULSHOF, SCJ; VAN DEN HURK, R; NUSGENS B, BEVERS, MM; ECTORS, FJ. Preservation of oocyte and granulosa cell morphology in bovine preantral follicles cultured *in vitro*. **Theriogenology**, v. 41, p. 1333–46, 1994.

HASHIMOTO, S; MINAMI, N; YAMADA, M; IMAI, H. Excessive concentration of glucose during *in vitro* maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after *in vitro* fertilization: relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. **Mol Reprod Dev**, v. 56, p. 520–6, 2000.

LOTT, WN; ANCHAPARUTHY, VM; MCGUILLIARD, ML; MULLARKY, IK; GWAZDAUSKAS, FC. Influence of cysteine in conjunction with growth factors on the development of *in vitro*-produced bovine embryos. **Reprod Dom Anim**, v. 46, p. 585–594, 2011.

MAIA, MS. **Espécies reativas do metabolismo do oxigênio, antioxidantes e função espermática**. Abril de 2003. Monografia para a disciplina Seminários de Reprodução I – Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária/ Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, 2003.

MAREI, WF; WATHES, DC; FOULADI-NASHTA, AA. Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development. **Reproduction**, v. 6, p. 979-88, 2010.

NASIRI, E; MAHMOUDI, E; BAHADORI, MH; AMIRI, I; The effect of retinoic acid on *in vitro* maturation and fertilization rate of mouse germinal vesicle stage oocytes. **Cell Journal**, v. 13, p. 19-24, 2010.

SAKATANI, M; YAMANAKA, K; KOBAYASHI, S; TAKAHASHI, M. Heat shock-derived reactive oxygen species induce embryonic mortality in *in vitro* early stage bovine embryos. **J Reprod Dev**, v. 54, p. 496–501, 2008.

SOMFAI, T; OZAWA, M; NOGUCHI, J. Developmental competence of *in vitro*-fertilized porcine oocytes after *in vitro* maturation and solid surface vitrification: effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage. **Cryobiology**, v. 55, p. 115-26, 2007.

TAHAEI, LS; EIMANI, H; YAZDI, PE; EBRAHIMI, B; FATHI, R. Effects of retinoic acid on maturation of immature mouse oocytes in the presence and absence of a granulosa cell co-culture system. **J Assist Reprod Genet**, v. 6, p. 553-8, 2011.