

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM TRETINOÍNA NANOENCAPSULADA NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

LUCAS, Caroline¹; REMIÃO, Mariana¹; HAAS, Cristina¹; KOMMNINOU, Eliza; DE LEON, Priscila¹, COLLARES, Tiago¹

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

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de estudos relacionados à produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos, vêm promovendo o aumento do padrão genético e da produção animal (CAMARGO et al., 2003). No entanto, a proporção de embriões que alcançam o estágio de blastocisto é raramente superior a 40%, sendo frequente o comprometimento da qualidade e competência embrionária (LONERGAN; FAIR, 2008).

O melhoramento dos protocolos de maturação *in vitro* (MIV) através da suplementação com diferentes hormônios, vitaminas e outras moléculas tornou-se uma necessidade para aumentar a eficiência dos meios de cultura e permitir que oócitos imaturos adquiram competência para a fertilização e embriogênese (ABE; HOSHI, 2003).

A suplementação com ácidos retinóicos (ARs) vem demonstrando efeitos benéficos na PIV. A tretinoína (TTN, ácido retinóico all-trans, ATRA), um retinóide natural, também chamada de ácido retinóico all-*trans*, é metabólito ativo da vitamina A (OURIQUE, et al., 2008), com ação importante na proliferação e diferenciação celular, e no desenvolvimento embrionário tanto em condições *in vivo* como *in vitro*. Diversos estudos têm demonstrado que TTN age no processo de maturação citoplasmática, no desenvolvimento inicial embrionário (Deb et al., 2011) e competência oocitária (Hidalgo et al., 2003), melhorando a qualidade dos embriões gerados.

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 embriões bovinos no estágio de 2 a 4 células submetidos ao processo de MIV em meio suplementado com diferentes concentrações de tretinoína livre (TTN) e nanoencapsulada (TTN-LNC).

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

2.1 Delineamento experimental

Foram estabelecidos 9 grupos experimentais, de acordo com a suplementação do meio de MIV, com diferentes concentrações de tretinoína livre e nanoencapsulada. Para os grupos da tretinoína livre e nanoencapsulada, foram utilizadas as concentrações de 0,25, 0,5 e 1 μM . Os grupos controles compostos por complexos *cumulus*-oócito (CCOs) maturados sem a presença de tratamento e CCOs tratados somente com LNC, também foram avaliados.

2.2 Produção de embriões *in vitro*

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 para a maturação *in vitro* (MIV).

Grupo de COCs (máximo 20) foram maturados em gotas de 90 μL do mesmo meio, sob óleo mineral a 38.5 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 no ar, com umidade máxima por 22-24 h. COCs foram lavadas três vezes em meio de fertilização TALP com 25 mM HEPES, em seguida, os oócitos foram transferidos em grupos de até 25 para cada gota de FIV. Zigotos rodeados por algumas camadas de células granulosas foram então transferidos para placas com gotas de 100 μL de meio e cultivadas por 7 dias no meio de cultura SOF a uma temperatura de 38.5 $^{\circ}\text{C}$ em uma atmosfera de 5% de CO_2 no ar com umidade máxima.

2.3 Quantificação das espécies reativas de oxigênio

A formação de espécies reativas de oxigênio foi avaliada nos embriões em estágio de 2 a 4 células segundo protocolo modificado de Morado *et al.* (2009). Os embriões 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 embriões foram registradas utilizando uma câmera 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.

2.4 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

O efeito de TTN e TTN-LNC na geração de EROs em embriões é mostrada na Fig. 1. Comparando com o grupo controle, os níveis de EROs foram menores nos embriões derivados de oócitos maturados na presença de TTN ou TTN-LNC. Ambos TTN-LNC como TTN protegem a célula de forma mais eficaz contra danos oxidativos reduzindo a produção de EROs. Uma redução significativa ($p < 0,05$) na produção de EROs foi detectada na presença de TTN-LNC em comparação com os controles. Nos grupos TTN e TTN-LNC, não ocorreu diferença entre as concentrações.

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, 19930). Além disso, segundo o estudo realizado por Guerin e colaboradores (2001), os retinóides exercem proteção contra os danos oxidativos, mantendo os níveis adequados de compostos e enzimas antioxidantes, confirmando os resultados encontrados ao se utilizar tretinoína nanoencapsulada e livre.

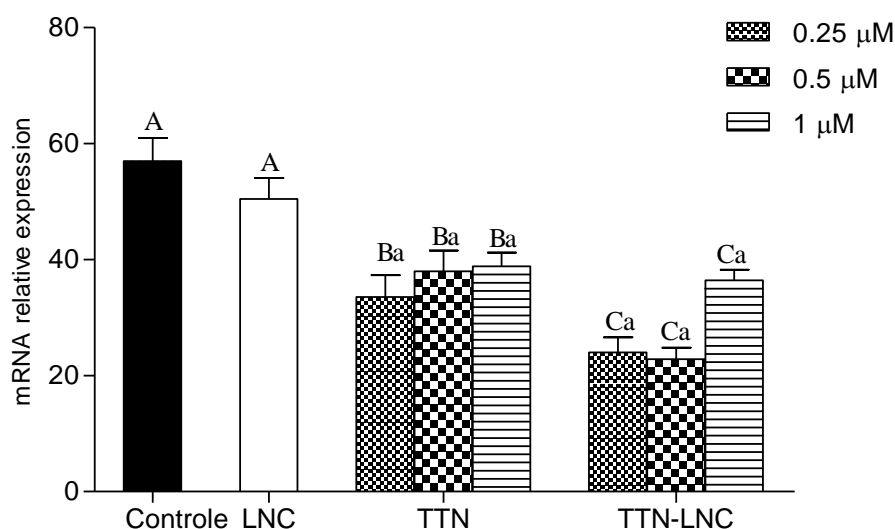


Figura 1. Gráfico da produção de EROs nos tratamentos e grupos controles (maturados, imaturos e nanocápsulas). *LNC= somente nanocápsulas; *TTN-LNC= tretinoína nanoencapsulada, *TTTN= tretinoína livre. Letras maiúsculas representam diferença significativa entre os grupos e letras minúsculas, entre as concentrações testadas, $P < 0,05$.

4 CONCLUSÃO

A tretinoína nanoencapsulada oferece maior proteção contra o estresse oxidativo aos embriões produzidos *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.