

**AÇÃO DO ANTIOXIDANTE RESVERATROL ADICIONADO NO MEIO DE
MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS**
**MARIA EDUARDA BICCA DODE¹; MARIANA HÄRTER REMIÃO¹; CAROLINE
GOMES LUCAS¹; WILLIAM BORGES DOMINGUES¹; NATHANIELE NEBEL
BARTHER¹; TIAGO COLLARES².**

¹Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese Animal, CDTec, UFPEL

²Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGB), Biotecnologia/Centro de
Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil
dudadode@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem sido amplamente utilizada, tanto com finalidades científicas quanto comerciais. A PIVE em bovinos tem contribuído nesses dois setores, demonstrando ser uma excelente ferramenta biotecnológica com resultados aplicáveis, não apenas para solucionar questões zootécnicas e veterinárias, mas também para um melhor entendimento da fisiologia da reprodução humana (SYLVESTRE et al., 2013). Ainda que os progressos sejam notáveis, muito ainda há a ser elucidado e aperfeiçoado, em vista que já é bastante descrita a qualidade superior de embriões produzidos *in vivo* e relação aos produzidos *in vitro*. (GOOVAERTS et al., 2012; WOCLAWEK-POTOCKA et al., 2013)

A PIVE é constituída basicamente de três etapas: a maturação *in vitro* (MIV), a fertilização *in vitro* (FIV), e o cultivo *in vitro* (CIV). A MIV é um processo chave, fundamental para o sucesso da PIVE. Os oócitos obtidos dos folículos não estão aptos à fecundação, e são denominados 'imaturos'. Em laboratório, esses gametas são estimulados a sofrer modificações nucleares e citoplasmáticas para que atinjam a maturação. Esse processo na espécie bovina leva em torno de 22 a 26 horas, onde a maturação nuclear consiste no desenvolvimento do ciclo celular até o estágio de metáfase II, enquanto a maturação citoplasmática está relacionada às organelas e padrões de transcrição, e a preparação para a transição materno-zigótica (GARCIA et al., 2012).

Porém, tem sido relatado que o sistema de cultivo *in vitro* de gametas e embriões causa certa vulnerabilidade destas células ao estresse oxidativo (WANG et al., 2013). Com isso, sérios danos podem ser causados aos oócitos durante o período de maturação *in vitro*, resultando em uma maturação inapropriada. Isso teria como consequência uma baixa eficiência da técnica, reduzindo as taxas de produção *in vitro* de embriões (KWAK E HYUN, 2012). Uma das razões do estresse oxidativo é devido à presença de radicais livres (um átomo ou molécula que contém um ou mais elétrons não pareados). Estes radicais são produzidos durante o cultivo *in vitro* e causam danos às estruturas celulares, afetando a integridade de seus compartimentos e comprometendo processos fisiológicos (OLSON E SEIDEL, 2000).

Buscando minimizar os efeitos nocivos dos radicais livres e promover um incremento no número de embriões obtidos *in vitro*, várias moléculas naturais reconhecidas por seus efeitos antioxidantes vêm sendo adicionadas aos meios utilizados para a PIVE (WANG et al., 2013). Dentre essas moléculas, uma que vem sendo destacada é o resveratrol. O resveratrol é um polifenol de origem vegetal que apresenta várias funções celulares, sendo reconhecida por sua atividade anticâncer, antidiabética e benefícios cardiovasculares (KWAK E HYUN,

2012). Acredita-se que o resveratrol amplia a estabilidade das mitocôndrias, contribuindo para uma maior eficiência dos processos oxidativos (TAKEO et al., 2014).

Estudos de Wang et al. (2013) demonstraram que a presença do resveratrol no meio de maturação de oócitos diminuiu a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) tanto em suínos quanto em bovinos. Takeo et al. (2014) sugere que o resveratrol quando adicionado ao meio de MIV na espécie bovina ajuda no processo de fertilização por afetar a função mitocondrial em oócitos.

Sabendo da importância do estudo de novas alternativas para diminuir a produção de radicais livres, nosso trabalho tem como objetivo verificar o efeito do resveratrol em relação , quando adicionado em três diferentes concentrações no meio de MIV de bovinos, sobre a viabilidade celular de oócitos.

2. METODOLOGIA

2.1 Punção, seleção e maturação *in vitro* dos oócitos

Ovários oriundos de um abatedouro bovino localizado na cidade de Pelotas/RS, foram coletados e transportados em um recipiente térmico até o laboratório de Embriologia Molecular/UFPEL. Os ovários foram lavados com solução salina a 0,9% aquecida e mantidos à 35°C. Os folículos de 2 a 8mm foram puncionados utilizando agulha 40x12 e seringas de 10 mL. Durante a punção, o líquido folicular foi sendo colocado em tubo de 50mL, mantido aquecido a 35 °C em banho seco.

O fluido puncionado foi filtrado e lavado com PBS (tampão salino fosfato) utilizando filtro coletor de embriões. O conteúdo filtrado foi transferido para uma placa de petri para seleção em lupa estereomicroscópica.

Os oócitos que apresentavam mais de três camadas de células do cumulus compactas e citoplasma homogêneo foram selecionados e colocados para maturação em meio MIV [meio de cultivo de tecidos 199 Hank's, FSH (100 ng/mL), LH (100 ng/mL) e 17 β -estradiol (1 mg/mL), e sulfato de amicacina], suplementado ou não com resveratrol nas concentrações de 0.5 μ M, 1 μ M, ou 2 μ M. Foram feitas 4 repetições, utilizando 84 ovários e um total de 180 oócitos distribuídos entre os tratamentos.

2.2 Ensaio de viabilidade de membrana

Para esse ensaio, os oócitos maturados na presença ou não das concentrações de 0.5, 1 e 2 μ M de resveratrol foram desnudados em gotas de hialuronidase (160U/mL) seguida de sucessivas pipetagens. Os oócitos foram lavados em gotas de PBS 3 vezes e colocados em gota contendo corantes do kit LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity (Invitrogen) para células de mamíferos, seguindo instruções do fabricante. Passados 30 minutos em temperatura ambiente, os gametas foram lavadas em PBS e visualizadas em microscópio de fluorescência (~ 495 nm), e capturadas imagens para a contagem do número de oócitos viáveis e inviáveis.

2.3 Análise dos dados

As taxas de clivagem, de desenvolvimento embrionário e do ensaio de viabilidade de membrana, foram comparadas entre os tratamento e o controle, através do teste de Qui-quadrado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de viabilidade celular mostrou que o tratamento com o resveratrol adicionado ao MIV não afeta os oócitos negativamente, demonstrando que o tratamento não é tóxico a ponto de desestabilizar a membrana celular. Os tratamentos tiveram resultados estatisticamente iguais ao controle ($p \geq 0,05$), apresentando baixas taxas de oócitos inviáveis (Tabela 1).

Tabela 1. Taxas de viabilidade celular nos tratamentos com resveratrol na MIV e no controle sem tratamento utilizando a técnica de Live/Dead.

Tratamentos	Número de oócitos avaliados	Taxa de viabilidade celular (%)
Controle	45	97,8
Resveratrol 0.5 μ M	39	92,3
Resveratrol 1 μ M	44	95,5
Resveratrol 2 μ M	45	97,8

Takeo et al. (2014) testou o resveratrol adicionado no meio MIV nas concentrações de 0 e 20 μ M, e encontrou um aumento das taxas de fertilização quando a molécula estava presente. Wang et al. (2013) testou o resveratrol na MIV de bovinos nas concentrações 0.1, 1, e 10 μ M, onde a concentração com melhores taxas de maturação e melhor qualidade de blastocisto foi a de 1 μ M. Ambos os trabalhos encontraram benefícios no processo de PIVE bovina com a adição de resveratrol no MIV. Porém, nenhum destes trabalhos testou quanto à viabilidade de membrana dos oócitos tratados, nos levando a concluir que novos testes devem ser realizados para que possa ser confirmado que a adição de resveratrol no meio é benéfica para a produção *in vitro* de embriões.

4. CONCLUSÕES

Os dados demonstram que a adição de resveratrol no meio de maturação *in vitro* de bovinos não causa danos à membrana celular dos oócitos tratados. Porém, novos testes como a quantificação de espécies reativas de oxigênio, o nível de glutathiona intracelular, o desenvolvimento embrionário, a quantidade de células por blastocisto e a expressão gênica de embriões devem ser realizadas para que possa ser avaliado se a adição da molécula durante a maturação traz algum tipo de benefício para a produção *in vitro* de embriões bovinos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GARCIA, et al. “Estado da arte da fertilização in vitro em bovinos.” **Biotechnologia da reprodução em bovinos: 1º Simposio internacional de reprodução animal aplicada**, p. 223-230, 2012.

GOOVAERTS, I G F et al. “Unravelling the Needs of Singly in Vitro-Produced Bovine Embryos: From Cumulus Cell Co-Culture to Semi-Defined, Oil-Free Culture Conditions.” **Reproduction, fertility, and development**, v.24, n. 8, p. 1084–92, 2012.

KWAK, S; HYUN, S. “The Effects of Resveratrol on Oocyte Maturation and Preimplantation.” **Reproduction, fertility, and development**, v.27, n. 2, p. 71–80, 2012.

OLSON, S.E.; SEIDEL jr, G.E.. Culture of in vitro-produced bovine embryos with vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients. **Biology of Reproduction**, v.62, p.248- 252, 2000.

SYLVESTRE, E et al. “Evolutionary Conservation of the Oocyte Transcriptome among Vertebrates and Its Implications for Understanding Human Reproductive Function.” **Molecular human reproduction**, v.19, n. 6, p. 369–79, 2013.

TAKEO, S et al. “Resveratrol Improves the Mitochondrial Function and Fertilization Outcome of Bovine Oocytes.” **The Journal of reproduction and development**, v. 60, n.2, p. 92–9, 2014.

WANG, F; TIAN, X; ZHANG, L et al. “Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization.” **Reproductive Biology** : e93641, 2013.

WOŁAWEK-POTOCKA, I et al. “Diverse Effects of Phytoestrogens on the Reproductive Performance: Cow as a Model.” **International journal of endocrinology** 2013: 650984, 2013.