

RELAÇÃO DA LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE DURANTE A MATURAÇÃO OOCITÁRIA COM O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL EM BOVINOS

JOAO A. A. RINCON¹; MARIANA H. REMIÃO²; JORGEA PRADIEÉ³; LÍGIA M. C.
PEGORARO³; MARCIO N. CORRÊA¹; AUGUSTO SCHNEIDER⁴

¹Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC), UFPEL - joaoal13@hotmail.com

²Grupo de Pesquisa em Oncologia Celular e Molecular (GPO), CDTec, UFPEL

³Embrapa Clima Temperado

⁴Faculdade de Nutrição, UFPEL – augustoschneider@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A lipoproteína de alta densidade (HDL) é reconhecida principalmente pelo seu papel na saúde cardiovascular (FUJIMOTO et al., 2010). Entretanto, estudos recentes indicam que também existe uma relação entre o HDL e a fertilidade. O HDL é a única lipoproteína presente no fluido folicular (FF), responsável por fornecer colesterol como substrato para a esteroidogênese (JASPARD et al., 1996). Além disso, o HDL possui propriedades: anti-inflamatória, antioxidante e citoprotetora (DRAGANOV et al., 2005). Estudos indicam que seu potencial anti-inflamatório e antioxidante derivam de sua composição lipídica, porção de Apolipoproteína AI (ApoAI) e presença de enzimas como a paraoxonase 1 e 3 (PON1 e PON3) (FUJIMOTO et al., 2010). A transferência da ApoAI e da PON1 do sangue para o FF ocorre junto ao HDL, visto que estão correlacionados positivamente nos dois compartimentos, em humanos (BROWNE et al., 2008) e em bovinos (SCHNEIDER et al., 2013).

A atividade metabólica normal no folículo ovariano pode resultar em estresse oxidativo (AGARWAL et al., 2005), que por sua vez, é uma das principais causas da baixa eficiência da maturação oocitária *in vitro* (MIV) e consequente desenvolvimento embrionário inicial, principalmente por induzir o bloqueio da maturação oocitária e comprometimento da qualidade embrionária (WANG et al., 2002). Tanto *in vivo* quanto *in vitro*, somente oócitos maduros são capazes de retomar a meiose, adquirir a habilidade de serem fecundados e atingir o estágio de blastocisto (FAIR et al., 1996). Portanto, a maturação oocitária é um dos mecanismos chave no sucesso de programas reprodutivos.

Estudos prévios têm associado negativamente a concentração intrafolicular e sanguínea de colesterol HDL (C-HDL) e de ApoAI com o grau de fragmentação de embriões humanos no dia 3 após a inseminação *in vitro* (BROWNE et al., 2008). Inclusive foi associada positivamente a atividade de PON1 e concentração de ApoAI com o número de blastômeros e qualidade embrionária (BROWNE et al., 2008). Da mesma forma, o nosso grupo de pesquisa demonstrou que quando adicionada PON1 recombinante em doses crescentes durante a MIV de oócitos bovinos, há um efeito positivo linear sobre o desenvolvimento embrionário no dia 7 de cultivo (RINCON et al., 2016). Desta maneira, objetivou-se avaliar o efeito da adição de doses crescentes de HDL durante a MIV de oócitos bovinos sobre o desenvolvimento embrionário inicial.

2. METODOLOGIA

Estudos prévios indicam que em bovinos, a concentração intrafolicular de C-HDL varia de 0,2 a 1,0 mg/mL com média de 0,5 mg/mL (SCHNEIDER et al., 2013; CAMPOS et al., 2017). Sendo assim, foram definidas as seguintes

concentrações de HDL durante a MIV: 0 (controle), 0,5 e 1,5 mg/mL de proteína HDL (P-HDL, SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, MO, USA). Os meios de maturação (MIV), fecundação (FIV) e cultivo (CIV) foram adquiridos comercialmente (Progest® Biotecnologia em reprodução Animal, Botucatu, SP, Brasil).

Para obtenção dos *complexos cumulus oócitos* (COCs), foram aspirados folículos com diâmetro de 3 a 8 mm, de ovários de vacas provenientes de abatedouros locais. Foram selecionados COCs de grau I, II e III (DE LOOS et al., 1991) e distribuídos aleatoriamente em três grupos ($n = 50$ COCs/grupo) conforme a adição de P-HDL no meio de MIV: G_0 (0 mg/mL); G_1 (0,5 mg/mL) e G_2 (1,5 mg/mL). A maturação ocorreu em estufa com 5% de CO_2 e 39 °C durante 22 horas. Após a MIV, os COCs foram transferidos ao meio FIV e procedida a inseminação, com concentração de 1×10^6 espermatozoides/mL. Os COCs foram incubados com os espermatozoides em estufa com as mesmas condições que a MIV durante 20 horas. O dia da inseminação foi considerado como o dia 0 de cultivo. Após a FIV, os prováveis zigotos foram desnudados das células do cumulus mediante sucessivas pipetagens e, transferidos a gotas de meio de CIV sob óleo mineral. O cultivo embrionário ocorreu em estufa com 5% de CO_2 à 39 °C durante 7 dias. No dia 3 e no dia 5 foi realizada a troca de 70% do meio de cultivo por meio de cultivo fresco. Ao sétimo dia (D7) foi avaliada a taxa de desenvolvimento embrionário (blastocistos / inseminados). Desta forma foram realizadas 8 repetições, totalizando 400 COCs/grupo.

Para contagem total de células/blastocisto, em $D7 \pm 10$ embriões/grupo foram fixados por 30 min (0,5% de glutaraldeído em PBS), corados por 15 min (PBS acrescido de 1 mg/mL de PVA e 5 µg/mL de Hoechst 33342, SIGMA®), lavados por 5 min em PBS e transferidos a lâminas contendo PBS-Glicerol (1:1) acrescido de 0,5 µg/mL de Hoechst. A fluorescência foi registrada utilizando câmera digital DP72 (Olympus® Shinjuku-ku, Tokyo, Japão) ligada ao microscópio de fluorescência invertido IX 71 (Olympus®) equipado com filtro UV de 330-395 nm. As imagens fluorescentes foram analisadas utilizando o software Cell[^]F (Olympus®). Desta forma foram conduzidas 3 repetições, totalizando 30 embriões/grupo.

A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) através de análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para a comparação de médias. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão. Foi considerada diferença estatística $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A adição de 1,5 mg/mL P-HDL (G_2) durante a MIV afetou negativamente o desenvolvimento embrionário no dia 7 de cultivo ($P = 0,005$), como mostrado na Figura 1. A taxa de blastocisto do G_0 e do G_1 foi $29,9 \pm 2,3\%$ e $32,9 \pm 3,5\%$ respectivamente, não diferindo entre si. No entanto, a taxa de blastocisto do G_2 ($17,9 \pm 3,0\%$) foi menor do que G_0 e G_1 ($P < 0,05$).

A adição de P-HDL durante a MIV também afetou o número total de células/blastocisto no dia de 7 de cultivo embrionário ($P = 0,038$). Não houve diferença entre G_0 e G_1 , $122,9 \pm 6,96$ e $139,6 \pm 7,79$ respectivamente. Porém, o G_2 ($106,5 \pm 8,96$) apresentou menor número de células em comparação com G_1 ($P < 0,05$), e não diferiu de G_0 (Figura 1).

Apesar das propriedades anti-inflamatória, antioxidante e citoprotetora do HDL (DRAGANOV et al., 2005) o P-HDL em altas concentrações durante a maturação oocitária pode afetar negativamente o desenvolvimento embrionário inicial em bovinos, visto que diminuiu a taxa de blastocisto no dia 7 de cultivo.

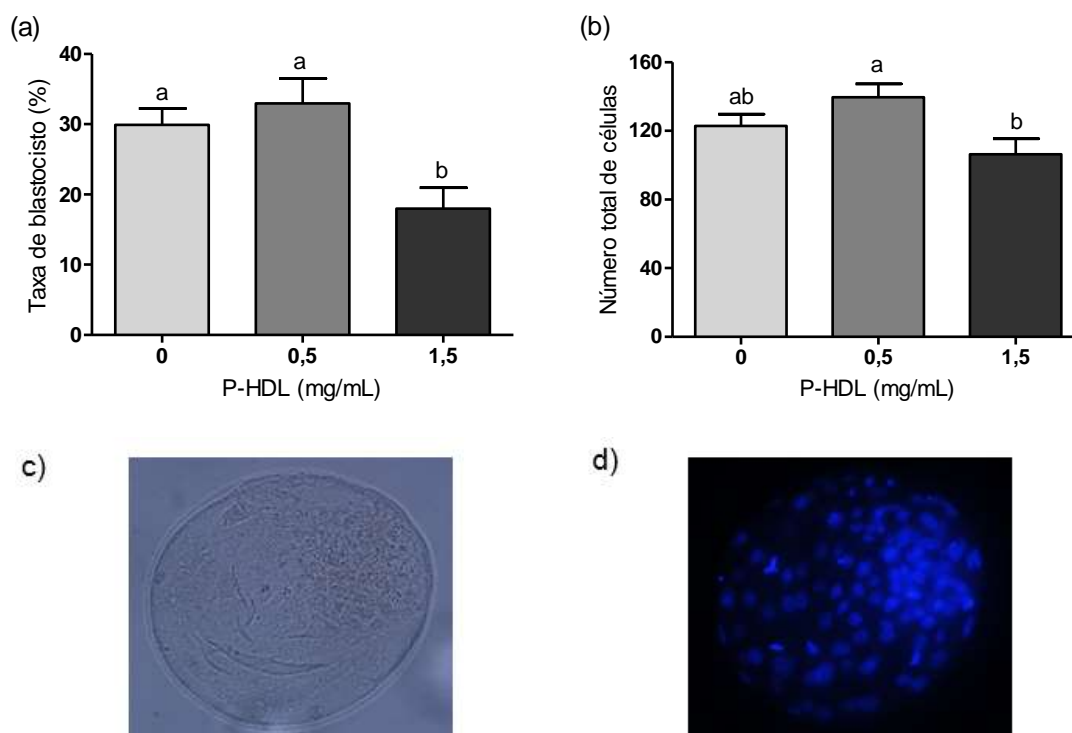


Figura 1. Em (a) taxa de blastocisto e em (b) número total de células/blastocisto, derivados de oócitos maturados *in vitro* com P-HDL durante 22h. Letras diferentes representam diferenças significativas ($P < 0,05$). Microfotografias (Escala: 100 μ m) representando em (c) embrião sem coloração e em (d) epifluorescência de embrião corado com Hoechst 33342 para contagem total de células.

Entretanto, estudos indicam que as propriedades do HDL são determinadas pela sua composição lipídica, presença de ApoA1, atividade de PON1 (FUJIMOTO et al., 2010) e níveis de micronutrientes lipofílicos (GOULINET e CHAPMAN, 1997). Além disso, o tamanho de partícula de HDL tem sido associado com seu potencial antioxidante (NOBECOURT et al., 2005). Neste sentido, JASPARD et al. (1997) sugerem que o HDL sofre um processo complexo de remodelação intrafolicular. Adicionalmente KIM et al. (2017) detectaram 15 componentes na molécula de HDL intrafolicular em mulheres e 26 tamanhos de partícula. Deste modo, o efeito negativo da maior dose P-HDL testada neste trabalho, provavelmente esteja associado à composição e tamanho desta partícula.

Uma dificuldade encontrada foi assemelhar os níveis de HDL intrafoliculares (*in vivo*) durante a maturação oocitária *in vitro*, visto que existem poucas referências de níveis de P-HDL. Contudo, utilizamos os níveis de C-HDL reportados na literatura como parâmetro para definir as doses de P-HDL durante a MIV, o que não garante que as reais condições *in vivo* estão sendo simuladas em nosso estudo.

4. CONCLUSÕES

Em conclusão, as altas doses de P-HDL durante a maturação oocitária podem afetar negativamente o desenvolvimento embrionário inicial em bovinos. No entanto, mais análises estão sendo realizadas para validar esses resultados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R.K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive biology and endocrinology**, v. 3, p. 28, 2005.

BROWNE, R.W.; SHELLY, W.B.; BLOOM, M.S.; OCQUE, A.J.; SANDLER, J.R.; HUDDLESTON, H.G.; FUJIMOTO, V.Y. Distributions of high-density lipoprotein particle components in human follicular fluid and sera and their associations with embryo morphology parameters during IVF. **Human reproduction**, v. 23, n. 8, p. 1884-94, 2008.

CAMPOS, F.T.; RINCON, J.A.A.; ACOSTA, D.A.V.; SILVEIRA, P.A.S.; PRADIEÉ, J.; CORREA, M.N.; GASPERIN, B.G.; PFEIFER, L.F.M.; BARROS, C.C.; PEGORARO, L.M.C.; SCHNEIDER, A. The acute effect of intravenous lipopolysaccharide injection on serum and intrafollicular HDL components and gene expression in granulosa cells of the bovine dominant follicle. **Theriogenology**, v. 89, p. 244-249, 2017.

DRAGANOV, D.I.; TEIBER, J.F.; SPEELMAN, A.; OSAWA, Y.; SUNAHARA, R.; LA DU, B.N. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. **Journal of lipid research**, v. 46, n. 6, p. 1239-47, 2005.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Nucleus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. **Molecular reproduction and development**, v. 43, n. 4, p. 503-12, 1996.

FUJIMOTO, V.Y.; KANE, J.P.; ISHIDA, B.Y.; BLOOM, M.S.; BROWNE, R.W. High-density lipoprotein metabolism and the human embryo. **Human reproduction**, v. 16, n. 1, p. 20-38, 2010.

GOULINET, S.; CHAPMAN, M.J. Plasma LDL and HDL subspecies are heterogenous in particle content of tocopherols and oxygenated and hydrocarbon carotenoids. Relevance to oxidative resistance and atherogenesis. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 17, n. 4, p. 786-96, 1997.

JASPARD, B.; COLLET, X.; BARBARAS, R.; MANENT, J.; VIEU, C.; PARINAUD, J.; CHAP, H.; PERRET, B. Biochemical characterization of pre-beta 1 high-density lipoprotein from human ovarian follicular fluid: evidence for the presence of a lipid core. **Biochemistry**, v. 35, n. 5, p. 1352-7, 1996.

JASPARD, B.; FOURNIER, N.; VIEITEZ, G.; ATGER, V.; BARBARAS, R.; VIEU, C.; MANENT, J.; CHAP, H.; PERRET, B.; COLLET, X. Structural and functional comparison of HDL from homologous human plasma and follicular fluid. A model for extravascular fluid. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 17, n. 8, p. 1605-13, 1997.

KIM, K.; BLOOM, M.S.; BROWNE, R.W.; BELL, E.M.; YUCEL, R.M.; FUJIMOTO, V.Y. Associations between follicular fluid high density lipoprotein particle components and embryo quality among in vitro fertilization patients. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 34, n. 1, p. 1-10, 2017.

NOBECOURT, E.; JACQUEMINET, S.; HANSEL, B.; CHANTEPIE, S.; GRIMALDI, A.; CHAPMAN, M.J.; KONTUSH, A. Defective antioxidative activity of small dense HDL3 particles in type 2 diabetes: relationship to elevated oxidative stress and hyperglycaemia. **Diabetologia**, v. 48, n. 3, p. 529-38, 2005.

RINCON, J.A.A.; MADEIRA, E.M.; CAMPOS, F.T.; MION, B.; SILVA, J.F.; ABSALON-MEDINA, V.A.; BUTLER, W.R.; CORREA, M.N.; PEGORARO, L.; SCHNEIDER, A. Exogenous paraoxonase-1 during oocyte maturation improves bovine embryo development in vitro. **Reproduction in domestic animals**, 2016.

SCHNEIDER, A.; ABSALON-MEDINA, V.A.; ESPOSITO, G.; CORREA, M.N.; BUTLER, W.R. Paraoxonase (PON) 1, 2 and 3 expression in granulosa cells and PON1 activity in follicular fluid of dairy cows. **Reproduction in domestic animals**, v. 48, n. 6, p. 989-94, 2013.

WANG, X.; FALCONE, T.; ATTARAN, M.; GOLDBERG, J.M.; AGARWAL, A.; SHARMA, R.K. Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. **Fertility and sterility**, v. 78, n. 6, p. 1272-7, 2002.