

ADIÇÃO DE LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS

MONIQUE M. FRATA¹; GIULIANA A. FERRONATO¹; JOAO A. A. RINCÓN²;
ISADORA A. R. LOPES³; JORGEA PRADIEÉ⁴; LÍGIA M. C. PEGORARO⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – moniquefrata@hotmail.com

²Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC), UFPEl

³Grupo de Pesquisa em Oncologia Celular e Molecular (GPO), CDTec, UFPEl

⁴Bolsista PosDoc CAPES – Embrapa Clima Temperado

⁵Embrapa Clima Temperado – ligia.pegoraro@embrapa.br

1. INTRODUÇÃO

Embora o papel da lipoproteína de alta densidade (HDL) seja conhecido no sistema cardiovascular (WANG et al., 2002; FUJIMOTO et al., 2010), pesquisas sugerem que também existe uma relação entre o HDL e a fertilidade. O HDL é a única lipoproteína presente no fluido folicular (FF), uma vez que a membrana folicular é semipermeável e impede a entrada de moléculas maiores, como a lipoproteína de baixa densidade (LDL) (BROWNE et al., 2008; FUJIMOTO et al., 2010). Desta forma, o colesterol é o substrato para a síntese de estradiol e progesterona (JASPARD et al., 1996).

Estudos indicam que o HDL possui propriedades anti-inflamatória, antioxidante e citoprotetora, que por sua vez, estão relacionadas com o tamanho e os componentes da molécula de HDL (LUND-KATZ e PHILLIPS, 2010). Os principais constituintes do HDL são apolipoproteína AI (ApoAI), colesterol, paraoxonase 1 (PON1) e fosfolipídios (FUJIMOTO et al., 2010). Portanto, essa lipoproteína pode funcionar como carreador de fatores importantes para a fertilidade (YESILALTAY et al., 2014). Neste sentido, estudos em humanos mostram uma relação positiva entre a atividade de PON1 e concentração de ApoAI com a qualidade embrionária (BROWNE et al., 2008). Além disso, em humanos (BROWNE et al. 2008) foi encontrada uma associação negativa da concentração intrafolicular e sanguínea de colesterol HDL (C-HDL) e de ApoAI com o grau de fragmentação de embriões .

Ainda, durante seu desenvolvimento no folículo, o oócito está sujeito a influências endócrinas e locais, que podem gerar estresse oxidativo. Assim, o potencial reprodutivo da fêmea é influenciado pelo estresse oxidativo resultante do metabolismo folicular, que pode interferir na integridade nuclear e citoplasmática do oócito (BROWNE et al., 2008). Esta por sua vez, é uma das principais causas da baixa eficiência da maturação oocitária *in vitro* (MIV) e consequente desenvolvimento embrionário inicial. Isso ocorre visto que ao retirar-se oócitos e embriões do ambiente natural para técnicas de reprodução assistida, seu sistema de defesa natural contra o estresse oxidativo é perdido (WANG et al., 2002). Sendo assim, ainda são necessários estudos para elucidar a relação entre o HDL e a reprodução.

Por outro lado, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma ferramenta de grande valor, uma vez que possibilita assemelhar eventos fisiológicos que ocorrem *in vivo* a través de experiências em condições controladas em laboratório. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de HDL durante a maturação de oócitos bovinos *in vitro* e sua influência sobre as taxas de maturação nuclear e de clivagem.

2. METODOLOGIA

Segundo a literatura, a concentração média de HDL no FF varia de 0,2 a 1,0 mg/mL (SCHNEIDER et al., 2013; CAMPOS et al., 2017). Sendo assim, estabeleceram-se as seguintes concentrações de proteína HDL (P-HDL): 0, 0,5 e 1,5 mg/mL de P-HDL (SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, MO, USA).

Para obtenção dos *complexos cumulus oócitos* (COCs), foram aspirados folículos com diâmetro de 2 a 8 mm de ovários bovinos provenientes de abatedouros locais. Os COCs foram selecionados quanto à morfologia e distribuídos aleatoriamente em três grupos (n=50 COCs/grupo), conforme a adição de P-HDL no meio de MIV (Progest® Biotecnologia em reprodução Animal, Botucatu, SP, Brasil): 0, 0,5 e 1,5 mg/mL de P-HDL. A MIV ocorreu em estufa com 5% de CO₂, à 39 °C, durante 22 horas. Após a MIV, os COCs foram transferidos ao meio de fecundação (Progest®) e realizada a inseminação com concentração de 1×10^6 espermatozoides/mL. Após 18 horas da inseminação, foram removidas as células do cúmulo dos prováveis zigotos e, transferidos ao meio de cultivo (Progest®). A determinação da taxa clivagem foi realizada no terceiro dia do cultivo (D3), através da avaliação visual em estereomicroscópio e contagem das estruturas que apresentavam divisão celular.

Para análise da taxa de maturação nuclear, 20-25 oócitos/grupo após a MIV foram desnudados das células do cumulus através da enzima hialuronidase (1 mg/mL) (SIGMA-ALDRICH®) e sucessivas pipetagens. Os oócitos desnudos foram fixados por 30 min em PBS suplementado com 0,5% de glutaraldeído, corados por 15 min em PBS acrescido de 1 mg/mL de PVA e 5 µg/mL de Hoechst 33342 (SIGMA-ALDRICH®), lavados por 5 min em PBS e transferidos às lâminas em gotas com cerca de 10 µL de PBS-Glicerol (1:1) acrescido de 0,5 µg/mL de Hoechst 33342. A fluorescência foi avaliada utilizando o microscópio de fluorescência invertido IX 71 (Olympus®, Shinjuku-ku, Tokyo, Japão) equipado com filtros UV de 330-385 nm. Foram considerados como oócitos maduros os que apresentaram extrusão do primeiro corpúsculo polar (metáfase II) e não maduros, os que não apresentaram esta característica. Assim, foram conduzidas 3 repetições, totalizando 60-75 oócitos/grupo.

Os resultados da maturação nuclear foram analisados através do teste de chi-quadrado, a taxa de clivagem, a través de análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para a comparação de médias, no programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão. Foi considerada diferença estatística $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A adição de P-HDL não afetou a taxa de maturação nuclear (Figura 1), sendo as médias obtidas $70,59 \pm 3,25$, $73,68 \pm 6,15$ e $72,73 \pm 8,36$ ($P > 0,05$) para os grupos suplementados com 0, 0,5 e 1,5 mg/mL de P-HDL, respectivamente.

Na Figura 2, está demonstrada a taxa de clivagem, onde o grupo suplementado com 1,5 de P-HDL apresentou menor taxa de clivagem ($52,27 \pm 3,98\%$) do que o grupo 0 mg/mL ($68,89 \pm 2,34\%$) e o grupo 0,5 mg/mL ($70,59 \pm 3,30\%$) de P-HDL ($P < 0,05$). Em contrapartida, os grupos 0 e 0,5 mg/mL de P-HDL não diferiram entre si ($P > 0,05$). Esses resultados indicam que o P-HDL em altas concentrações pode afetar negativamente o desenvolvimento embrionário inicial, uma vez que diminuiu a taxa de clivagem na concentração mais alta testada neste trabalho. No entanto, existe uma associação positiva entre os níveis de C-HDL intrafolicular e maior qualidade embrionária (BROWNE et al. 2008).

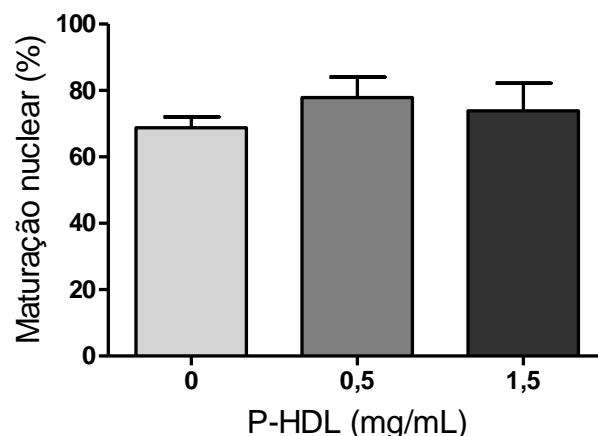


Figura 1. Taxa de maturação nuclear de oócitos maturados com diferentes concentrações de P-HDL.

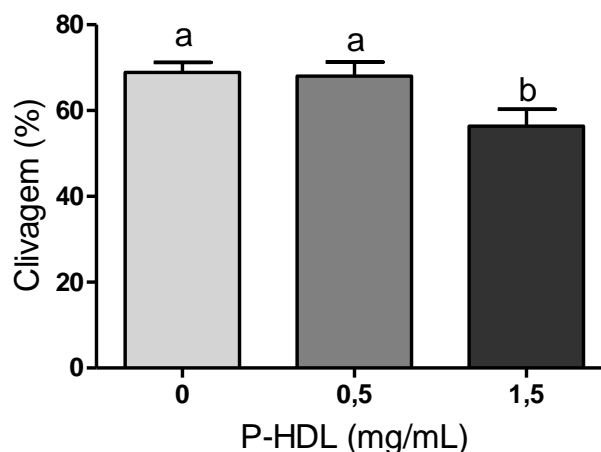


Figura 2. Taxa de clivagem proveniente de oócitos maturados com diferentes concentrações de P-HDL. Letras diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

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). Neste sentido, KIM et al. (2017) detectaram na molécula de HDL intrafolicular em mulheres: 15 componentes e 26 tamanhos de partícula. Adicionalmente, o tamanho de partícula de HDL tem sido associado com seu potencial antioxidante, onde partículas de HDL com menor tamanho possuem maior potencial antioxidante em comparação com partículas de maior tamanho (NOBECOURT et al., 2005).

Por outro lado, as concentrações de P-HDL que utilizamos durante a MIV foram definidas a partir de resultados obtidos de C-HDL, ou seja, da concentração de colesterol presente na molécula de HDL. Com isso, torna-se necessário determinar a composição proteica do HDL para saber como isto poderia afetar sua capacidade antioxidante. Sendo assim, o efeito negativo da maior dose P-HDL testada neste trabalho, provavelmente esteja associado à composição e tamanho da partícula.

4. CONCLUSÕES

De acordo com as condições deste estudo, observou-se que a maior suplementação de P-HDL (1,5 mg/mL) apresentou um efeito negativo na maturação oocitária, suportado pela diminuição da taxa de clivagem. No entanto, ainda estão sendo realizadas outras análises para elucidar os mecanismos pelos quais o HDL pode influenciar a fertilidade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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.

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.

LUND-KATZ, S.; PHILLIPS, M.C. High density lipoprotein structure-function and role in reverse cholesterol transport. **Sub-cellular biochemistry**, v. 51, p. 183-227, 2010.

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.

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.

YESILALTAY, A.; DOKSHIN, G.A.; BUSSO, D.; WANG, L.; GALIANI, D.; CHAVARRIA, T.; VASILE, E.; QUILAQUEO, L.; ORELLANA, J.A.; WALZER, D.; SHALGI, R.; DEKEL, N.; ALBERTINI, D.F.; RIGOTTI, A.; PAGE, D.C.; KRIEGER, M. Excess cholesterol induces mouse egg activation and may cause female infertility. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 46, p. E4972-80, 2014.