

EFEITO DA LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE DURANTE A MATURAÇÃO OOCITÁRIA SOBRE O STATUS OXIDATIVO DE OÓCITOS BOVINOS

GIULIANA A. FERRONATO¹; JOAO A. A. RINCÓN^{1,4}; MORGANA A. BORGES²;
AUGUSTO SCHNEIDER³; LÍGIA M. C. PEGORARO⁴; MÁRCIO N. CORRÊA^{1,5}

¹Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC), UFPel
giulianaferronato@hotmail.com

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

³Faculdade de Nutrição, UFPel

⁴Embrapa Clima Temperado

⁵Faculdade de Veterinária, UFPel, marcio.nunescorreia@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A lipoproteína de alta intensidade (HDL) é a única lipoproteína presente no fluido folicular (FF) e tem uma possível relação com a fertilidade, visto que fornece colesterol como substrato para a esteroidogênese (JASPARD et al., 1996). Além disso, o HDL possui propriedades anti-inflamatória, antioxidante e citoprotetora (LUND-KATZ e PHILLIPS, 2010), derivadas da sua composição lipídica, presença da Apolipoproteína AI (ApoAI) e enzimas como a paraoxonase 1 e 3 (PON1 e PON3) (FUJIMOTO et al., 2010). Um dos componentes mais importantes do HDL é a ApoAI, visto que participa na biogênese, remodelação e catabolismo da molécula (SANTOS-GALLEGO et al., 2008). 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).

Processos metabólicos normais no folículo ovariano podem resultar em estresse oxidativo, podendo interferir com a maturação do oócito (AGARWAL et al., 2005). Sendo que, apenas oócitos maduros conseguem retomar a meiose para adquirir a habilidade de serem fecundados, atingir o estágio de blastocisto e gerar uma gestação (FAIR et al., 1996). Além disso, quando os oócitos são removidos do folículo ovariano e submetidos ao cultivo *in vitro*, o equilíbrio oxidativo se vê comprometido. Neste sentido, estudos indicam que aumento do estresse oxidativo causa bloqueio do desenvolvimento e da qualidade oocitária (WANG et al., 2002). Sendo assim, a maturação oocitária é um dos mecanismos chave no sucesso de programas reprodutivos.

Estudos em humanos mostram uma relação positiva entre a atividade de PON1 e concentração de ApoAI com a qualidade embrionária (BROWNE et al., 2008). Também foi reportado que a adição de PON1 recombinante durante a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos possui efeito positivo no desenvolvimento embrionário inicial (RINCON et al., 2016). A ApoAI está diretamente relacionada com a quantidade de colesterol-HDL (C-HDL) (SANTOS-GALLEGO et al., 2008), à vista disso, tem sido associada negativamente a concentração de ApoAI no FF com o grau de fragmentação de embriões humanos no dia 3 após a inseminação *in vitro* (BROWNE et al., 2008).

Contudo, JASPARD et al. (1997) sugere que o HDL pode sofrer transformações metabólicas intrafoliculares em relação à síntese de hormônios e transporte reverso de colesterol. Baseado no anteriormente exposto, acredita-se que o HDL possa exercer um efeito antioxidante no fluido folicular, podendo resultar numa melhoria na qualidade oocitária e por consequência no desenvolvimento embrionário. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o

efeito do HDL no status oxidativo de oócitos bovinos maturados *in vitro* com doses crescentes de HDL.

2. METODOLOGIA

Estudos prévios indicam que 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), em vista disso foram definidas as concentrações de 0 (controle), 0,5 e 1,5 mg/mL de proteína HDL (P-HDL, SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, MO, USA) no meio de maturação (Progest Biotecnologia em reprodução Animal, Botucatu, SP, Brasil).

Foram coletados ovários bovinos provenientes de abatedouros locais para aspiração dos folículos. Os complexos *cumulus* oócitos (COCs) foram aspirados a partir de folículos com 3-8 mm de diâmetro e selecionados de acordo com a sua morfologia (DE LOOS et al., 1991). Os COCs foram distribuídos aleatoriamente em três grupos (n = 50 COCs/grupo) conforme a adição de P-HDL no meio de MIV (0, 0,5 e 1,5 mg/mL). A MIV ocorreu em estufa com 5% de CO₂ e 39 °C durante 22 horas.

Para a mensuração dos níveis de espécies reativas oxigênio (EROs) e os níveis de glutathiona endógena (GSH), após a MIV os oócitos foram desnudados das células do cumulus, com hialuronidase (1 mg/mL) (SIGMA-ALDRICH®), seguido de sucessivas pipetagens, lavados 3 vezes em gotas de PBS-PVP, incubados em gotas de 100 µL de PBS-PVP contendo 10 µM de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCHF-DA), para EROs, e 10 µM de 4-clorometil-6,8-difluoro-7-hidroxycoumarin (Cell-Tracker Blue CMF2HC Molecular Probes; Beyotime Institute of Biotechnology) para GSH, durante 30 min no escuro, posteriormente foram lavados 3 vezes em gotas de 70 µL de PBS-PVP. A fluorescência foi avaliada através do microscópio fluorescência invertido IX 71 (Olympus® Shinjuku-ku, Tokyo, Japão), e as imagens obtidas foram analisadas utilizando o software Cell[^]F (Olympus®) para mensuração da intensidade de pixels. Assim, foram conduzidas 3 repetições, totalizando 60-75 oócitos/grupo.

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

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A adição de 0, 0,5 e 1,5 mg/mL de P-HDL durante a MIV não influenciou os níveis de EROS (27,50±1,78; 28,74±2,08 e 26,47±2,36, respectivamente, $P > 0,05$) nem de glutathiona endógena (29,83±1,64; 32,59±1,70 e 30,53±1,21; respectivamente, $P > 0,05$), conforme mostrado na Figura 1.

Contrário ao esperado, a adição de P-HDL durante a maturação oocitária não apresentou efeito antioxidante, suportado pela mensuração de EROs e GSH. Entretanto, a remodelação de partículas de HDL dentro do folículo ovariano parece ser um processo complexo e dinâmico, no qual as propriedades antioxidantes podem mudar de acordo com sua estrutura e tamanho (KIM et al., 2017). Neste sentido, NOBECOURT et al. (2005) encontraram que partículas de HDL com menor tamanho tem maior potencial antioxidante em comparação com partículas de maior tamanho. Somado a isso, modificações estruturais na molécula de HDL podem alterar sua atividade antioxidante, decorrente da porção

de ApoA1 e presença de PONs (GAIDUKOV e TAWFIK, 2005; VAN LENTEN et al., 2006).

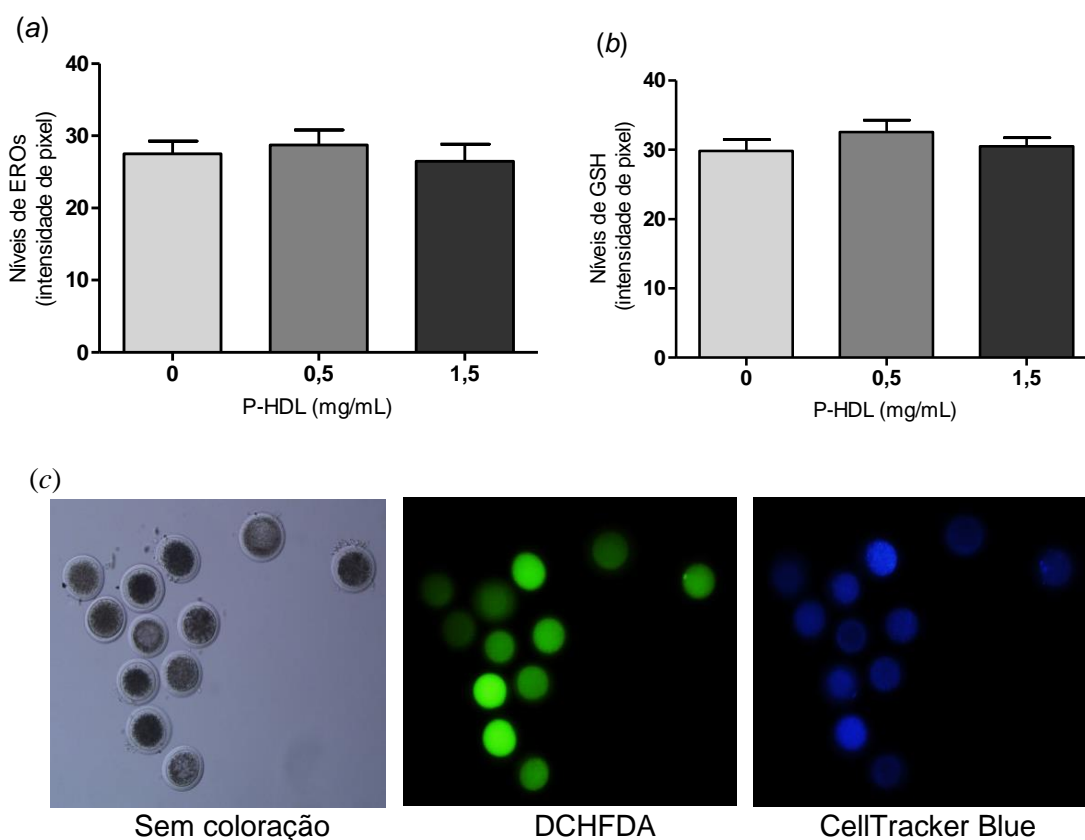


Figura 1. Níveis intracelulares de (a) espécies reativas oxigênio (EROs) e (b) glutatona (GSH) de oócitos maturados *in vitro* com diferentes concentrações de HDL. Em (c) microfotografias da epifluorescência de oócitos maturados *in vitro* corados com DCHFDA para EROS e com CellTracker Blue para GSH. Barra de escala = 200 µm.

Por outro lado, as concentrações de P-HDL que utilizamos 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.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que a adição das concentrações de 0,5 e 1,5 mg/mL de P-HDL no meio de MIV não alteram o status oxidativo de oócitos bovinos maturados *in vitro*. Entretanto, mais análises estão sendo conduzidas pela nossa equipe para validar esses resultados, assim como para elucidar os mecanismos de ação do HDL.

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.

DE LOOS, F.; KASTROP, P.; VAN MAURIK, P.; VAN BENEDEN, T.H.; KRUIP, T.A. Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes. **Molecular reproduction and development**, v. 28, n. 3, p. 255-9, 1991.

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.

GAIDUKOV, L.; TAWFIK, D.S. High affinity, stability, and lactonase activity of serum paraoxonase PON1 anchored on HDL with ApoA-I. **Biochemistry**, v. 44, n. 35, p. 11843-54, 2005.

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.

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.

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.

SANTOS-GALLEGO, C.G.; IBANEZ, B.; BADIMON, J.J. HDL-cholesterol: is it really good? Differences between apoA-I and HDL. **Biochemical pharmacology**, v. 76, n. 4, p. 443-52, 2008.

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.

VAN LENTEN, B.J.; REDDY, S.T.; NAVAB, M.; FOGELMAN, A.M. Understanding changes in high density lipoproteins during the acute phase response. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 26, n. 8, p. 1687-8, 2006.

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.