



EXPANSÃO DAS CÉLULAS DO CUMULUS NA AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DE RESVERATROL NANOENCAPSULADO POR NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO

MORGANA ALVES BORGES¹; ISADORA ANDRÉ ROSA LOPES²; ANA LAURA DA SILVA FEIJÓ²; JÚLIA DAMÉ PASCHOAL²; MARIANA HÄRTER REMIÃO²; TIAGO VEIRAS COLLARES³

¹Universidade Federal de Pelotas – ab.morgana@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – isadoralopes@msn.com

²Universidade Federal de Pelotas – sf.analaura@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – juliadfp@outlook.com

²Universidade Federal de Pelotas – marri.hr@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – collares.t@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos é uma biotecnologia reprodutiva amplamente utilizada como uma estratégia de melhoramento genético, gerando milhares de embriões anualmente de animais de alto valor genético para fins comerciais (BRACKETT et al. 1993). A Maturação *in vitro* (MIV), Fecundação *in vitro* (FIV) e o Cultivo *in vitro* (CIV), são as três principais etapas que compreendem a PIVE. A qualidade dos embriões produzidos *in vitro* é significativamente influenciada pelo microambiente de maturação dos oócitos, tornando-os altamente vulneráveis ao estresse oxidativo (GUERIN et al 2001).

É descrito na literatura que elevadas concentrações de substratos metabólitos que não são produzidos *in vivo* geram um aumento no processo de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), do mesmo modo que a demasiada manipulação sob exposição a luz e submissão a altas concentrações de oxigênio aos quais os oócitos são expostos durante a MIV (AGARWAL et al 2006). Além disso, o desequilíbrio que é gerado com o estresse oxidativo pode modificar a expressão de genes que estão envolvidos no controle da interação espermatozoide-oócito (AITKEN, 1987; GONÇALVES, 2010), bem como ocasionar danos a membrana e ao DNA, induzindo deste modo a apoptose celular ou a peroxidação lipídica (TAKAHASHI et al 2012).

A fim de compreender os mecanismos celulares e reprodutivos correlacionados a maturação oocitária e ao desenvolvimento embrionário, diversas pesquisas relatam a utilização de moléculas antioxidantes na suplementação do meio de maturação de oócitos *in vitro* (HYUN et al 2012). Resultados positivos tem sido demonstrado, como no caso do resveratrol, que é uma molécula antioxidante encontrada em diversas plantas e alimentos como por exemplo em sementes de uva (JANG et al 1997). Ademais, o resveratrol possui propriedade antiinflamatória, bem como, pode influenciar a expressão gênica de diversos genes relacionados a síntese de DNA, proliferação celular e apoptose (LEE et al 2010). Contudo, este composto possui duas conformações isoméricas: cis (Z) e trans (E). Por ser uma molécula fotossensível, sua isoforma trans é biologicamente mais estável quando protegida da luz, porém quando exposta, sofre um processo de isomerização inviabilizando a sua aplicação comercial (TRELA et al 1996).

Uma alternativa promissora a esta problemática é a nanoencapsulação do resveratrol, a qual, pode resolver as pontuais limitações assegurando a estabilidade da molécula e conservando por mais tempo as propriedades detalhadas acima (WANG et al 2014).

Desta forma, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a toxicidade do antioxidante resveratrol, nanoencapsulado ou não, na concentração de 2 μ M frente ao ensaio de expansão das células do complexo *cumulus oophorus* (CCOs).

2. METODOLOGIA

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Câncer, situado no Campus Capão do Leão, o qual pertence ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Ovários bovinos provenientes de abatedouro local foram transportados até o laboratório em um recipiente térmico. Após a assepsia dos mesmos com solução salina a 0,9% previamente aquecida, os folículos entre 2 e 8 mm foram puncionados utilizando agulha acoplada a uma bomba de sucção a vácuo. O líquido puncionado foi mantido em tubo cônico a 35°C, lavado com PBS (phosphate buffer saline) e filtrado com ajuda de filtro coletor de embriões. Após, foram selecionados em lupa estereomicroscópica somente os CCOs classificados como grau 1, denominados assim por possuírem o citoplasma homogêneo e no mínimo três camadas de células compactas.

Posteriormente, os CCOs selecionados foram lavados em meio de lavagem (In Vitro Brasil S/A, São Paulo, Brasil). Os CCOs foram distribuídos em 4 grupos contendo de 15 a 20 estruturas, dispostos em gotas 100 μ l de meio MIV (In Vitro Brasil S/A, São Paulo, Brasil), o qual cada gota foi suplementada com uma concentração de 2 μ M de resveratrol livre, resveratrol nanoencapsulado, nanocápsulas de núcleo lipídico vazias e um grupo controle sem tratamento. Em seguida, os CCOs foram encubados durante 22 a 24 horas em uma atmosfera controlada com 5% de CO₂ a 38,5°C para maturação nuclear e citoplasmática.

Após a MIV, procedeu-se a análise de expansão das células do cumulus conforme descrito por MAREI et al (2010). A avaliação se deu através da utilização de um microscópio invertido IX 71 (Olympus Co.), e as células foram classificadas como não expandidas, parcialmente expandidas e totalmente expandidas (Figura 1). Todas as imagens foram obtidas utilizando câmera digital DP72 (Olympus Corporation, Shinjuku-ku, Tóquio, Japão) acoplada ao microscópio.

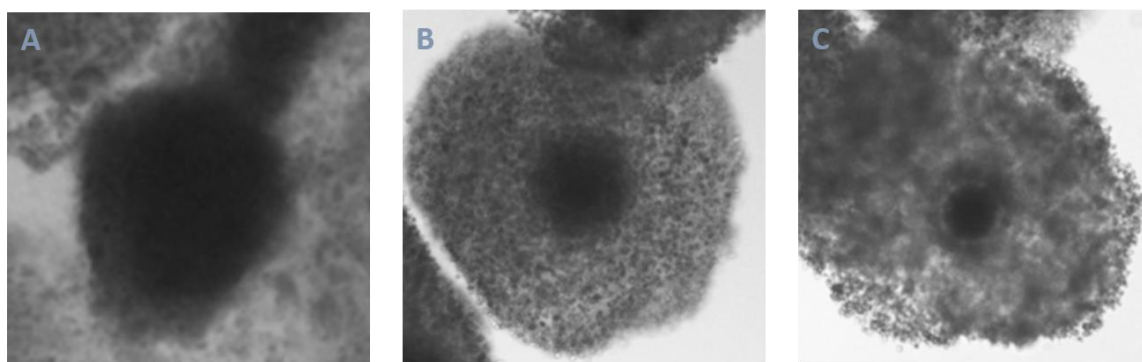


Figura 1. Avaliação da expansão das células do complexo cumulus oophorus, classificadas como: Não expandidas (A), parcialmente expandidas (B) e totalmente expandidas (C).

Para análise estatística foi utilizado a análise de variância Two-way ANOVA utilizando o programa GraphPad Prism. Os resultados foram obtidos com valores

médios de cada grupo de dados, e o grau de significância estatística para todas as análises foi definida em $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstram que após o período de maturação *in vitro* o grupo controle obteve uma taxa percentual de 7,89% de oócitos que não expandiram suas células do CCOs, 86,84% que tiveram uma expansão parcial e 5,26% uma expansão total. Em relação aos tratamentos, os grupos não apresentaram células do CCOs sem expansão, sendo assim, o grupo resveratrol livre 2 μM obteve uma taxa percentual de 74,19% de células com expansão parcial, 25,80% de expansão total. Já o grupo tratado com nanocápsulas de núcleo lipídico vazias 2 μM obteve uma taxa percentual de 79,31% de células com expansão parcial e 20,68% de células com expansão total. E o grupo que recebeu o tratamento com resveratrol nanoencapsulado 2 μM obteve uma taxa percentual de 82,60% de células com expansão parcial e 17,39% de células com expansão total.

Além do resultado demonstrado neste trabalho, é evidenciado por LUCAS et al (2017) que altas doses de nanocápsulas de núcleo lipídico não afetam o desenvolvimento embrionário bovino *in vitro*, e BULCÃO et al (2014) complementa que os ensaios *in vivo* também não manifestaram efeitos tóxicos ao administrar este tipo de nanocápsula em camundongos.

Deste modo, a utilização de moléculas antioxidantes nanoencapsuladas na suplementação do meio MIV é uma nova abordagem para liberação controlada destes compostos. Utilizando nanocápsulas de núcleo lipídico, REMIÃO et al 2016 e LUCAS et al 2015 demonstraram aumento das taxas de produção e melhora na qualidade oocitária e embrionária após adicionarem melatonina e tretinoína, respectivamente, durante a MIV de bovinos.. Contudo, a suplementação do meio de maturação de oócitos bovinos *in vitro* com resveratrol nanoencapsulado não demonstra toxicidade sobre os parâmetros avaliados.

4. CONCLUSÕES

A suplementação do meio de maturação de oócitos bovinos *in vitro* com resveratrol nanoencapsulado não demonstra toxicidade sobre a expansão das células do complexo *cumulus oophorus*. Novos testes devem ser realizados a fim de serem testados outros parâmetros para garantir a seguridade do uso destas moléculas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, Ashok et al. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. **Fertility and sterility**, v. 86, n. 3, p. 503-512, 2006.

AGARWAL, Ashok et al. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. **Fertility and sterility**, v. 86, n. 3, p. 503-512, 2006.

AITKEN, R. John; CLARKSON, Jane S. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 81, n. 2, p. 459-469, 1987.

BRACKETT, B.G.; ZUELKE, K.A. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. **Theriogenology**, v.39, p.43-64, 1993.

BULCÃO, Rachel P. et al. In vivo toxicological evaluation of polymeric nanocapsules after intradermal administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 2, p. 167-177, 2014.

GONÇALVES, Fernanda da Silva et al. Effect of antioxidants during bovine in vitro fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 1, p. 129-135, 2010.

GUERIN, P.; EL MOUATASSIM, S.; MENEZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human reproduction update**, v. 7, n. 2, p. 175-189, 2001.

HYUN, Sang-Hwan; KWAK, Seong-Sung. The effects of resveratrol on oocyte maturation and preimplantation embryo development. **J Embryo Transf**, v. 27, p. 71-80, 2012.

JANG, Meishiang et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**, v. 275, n. 5297, p. 218-220, 1997.

LEE, Kiho et al. Effect of resveratrol on the development of porcine embryos produced in vitro. **Journal of Reproduction and Development**, v. 56, n. 3, p. 330-335, 2010.

LUCAS, Caroline et al. High doses of lipid-core nanocapsules do not affect bovine embryonic development in vitro. **Toxicology in Vitro**, 2017.

LUCAS, Caroline Gomes et al. Tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules decrease reactive oxygen species levels and improve bovine embryonic development during in vitro oocyte maturation. **Reproductive Toxicology**, v. 58, p. 131-139, 2015.

MAREI, Waleed F.; WATHES, D. Claire; FOULADI-NASHTA, Ali A. Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development. **Reproduction**, v. 139, n. 6, p. 979-988, 2010.

REMIÃO, Mariana Härter et al. Melatonin delivery by nanocapsules during in vitro bovine oocyte maturation decreased the reactive oxygen species of oocytes and embryos. **Reproductive toxicology**, v. 63, p. 70-81, 2016.

TAKAHASHI, Masashi. Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v. 58, n. 1, p. 1-9, 2012.

TRELA, Brent C.; WATERHOUSE, Andrew L. Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 5, p. 1253-1257, 1996.

WANG, Shu et al. Application of nanotechnology in improving bioavailability and bioactivity of diet-derived phytochemicals. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 25, n. 4, p. 363-376, 2014.