

TRIAGEM TOXICOLÓGICA DE MOLÉCULAS COM POTENCIAL QUIMIOTERÁPICO UTILIZANDO ESPERMATOZÓIDES COMO MODELO DE ESTUDO

ANA LAURA FEIJÓ¹; MORGANA BORGES¹; ISADORA LOPES¹; JULIA DAMÉ¹; MARIANA H. REMIÃO¹; TIAGO COLLARES¹

¹ Universidade Federal de Pelotas- Grupo de Pesquisa em Oncologia Celular e Molecular – GPO/ Laboratório De Biotecnologia do Câncer, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec)- sf.analaura@gmail.com; collares.t@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Por questões de bioética, como o princípio dos 3Rs (refinamento, redução, substituição), a triagem de moléculas em sistemas alternativos tem sido cada vez mais requisitada, visando a redução do uso animal (BEKER et al., 2012; SCHOLZ e GENSCHOW, 1999; TESSARO et al., 2015). Dentre as principais estratégias utilizadas estão os testes *in silico* e o cultivo de células *in vitro* (GRIESINGER et al., 2015).

Outra alternativa que vem sendo utilizada para testes toxicológicos nos últimos anos é a utilização de células espermáticas, uma vez que essas possuem a particularidade de demonstrar motilidade, sendo assim de fácil avaliação. (SILVA et al., 2017; VICENTE-CARRILLO et al., 2015; MAYEVSKY et al., 1983.)

A biotina é uma vitamina hidrossolúvel, composta por um anel ureído fundido com um anel tetrahidrotiofeno e um substituinte de ácido valérico, que pode atuar como coenzima para carboxilases em seres humanos, apresentando assim, função em várias reações metabólicas. (ZEMPLINI et al., 2009). Além disso, experimentos realizados pelo nosso grupo de pesquisa comprovam um possível efeito quimioterápico presente em suas propriedades, sendo essas ressaltadas quando a molécula sofre modificações químicas. (dados não publicados).

Sendo assim o objetivo do trabalho foi verificar se existe alteração de porcentagem de motilidade dos espermatozoides nos tempos 0, 1, 2 e 4 h, quando o sêmen bovino é incubado com três diferentes tipos de biotina, sendo uma a convencional e duas modificadas.

2. METODOLOGIA

2.1 Das biotinas

As biotinas foram sintetizadas e cedidas pelo Grupo de Pesquisa LabSelen-NanoBio da Universidade Federal de Santa Maria. As moléculas foram diluídas em dimetilsulfóxido a 2,5% para obtenção de uma solução a 0,02 M. Diluições seriadas foram feitas em meio Opti-MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para que a solução de trabalho estivesse a 10^{-4} nM.

2.2 Preparo do sêmen

Palhetas de sêmen de cinco touros diferentes, de capacidade reprodutiva conhecida, foram descongeladas em banho-maria a 35 °C por 30s e o conteúdo depositado em 2 mL de meio Opti-MEM previamente aquecido a 35 °C. As amostras foram centrifugadas duas vezes durante 5 min a 750 rpm, com remoção do sobrenadante a cada centrifugação e adição de novo meio após a primeira rodada.

Após a segunda centrifugação, o *pellet* foi coletado para ser feita a contagem de concentração em câmara de *Newbauer*. Foi utilizada uma concentração de 500.000 espermatozoides/ 100 μ L.

2.3 Análise das amostras

Os grupos testados foram: biotina convencional, biotina modificada nomeada 164, biotina modificada nomeada 178, e um grupo controle sem tratamento. As células espermáticas foram avaliadas quanto à sua motilidade através do sistema CASA (computer-assisted sperm analysis - AndroVision®, Minitube, Germany) sob microscopia óptica. Foi avaliada a motilidade total nos tempos 0, 1, 2 e 4 h, sendo as amostras mantidas em aquecimento até o momento da análise.

O teste estatístico utilizado foi análise de variância de duas vias, seguido de teste de Tukey. Os resultados foram descritos com os valores médios para cada grupo de dados \pm SEM (erro padrão da média), onde o grau de significância estatística em todas as análises foi definido em nível de probabilidade de $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da avaliação de motilidade realizada nos espermatozóides incubados, foi observado que os grupos testados não apresentaram diferença estatística quando comparados no tempo 0 h.

Já no tempo 1 h o grupo com a presença da biotina 178 apresentou uma diminuição estatisticamente significativa na porcentagem de motilidade dos espermatozoides em relação aos demais grupos. Esta diminuição foi mais acentuada no tempo de 2 h e se manteve no tempo de 4 h. Os demais grupos, biotina convencional e biotina 164, não apresentaram diferença estatística no percentual de motilidade em relação ao grupo controle desde o tempo 0 h até o tempo 4h.

Uma diminuição natural da motilidade dos espermatozoides foi observada em todos os grupos devido o tempo de incubação.

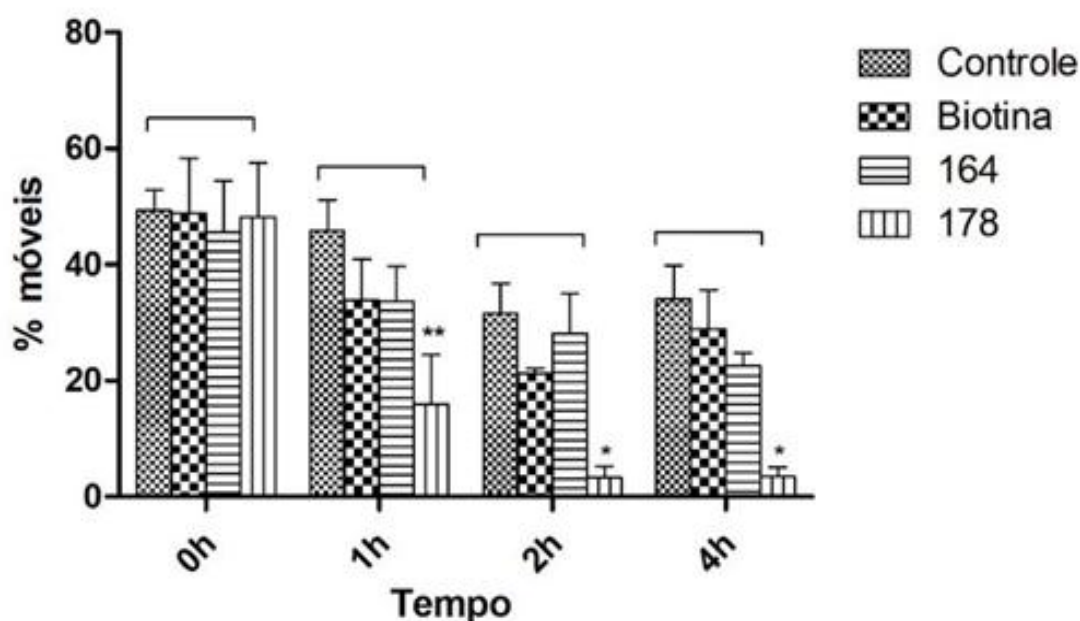


FIGURA 1. Os asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos testados ($P < 0,05$).

4. CONCLUSÕES

Dentre os três tipos de biotina testadas neste experimento, apenas a biotina 178 apresentou toxicidade em relação a motilidade total, quando comparada com as demais. A partir desta avaliação é possível perceber que dentre as moléculas utilizadas a 178 é a que parece ser mais tóxica para células de mamíferos e que testes simples de observação de motilidade espermática foi eficaz na diferenciação de tratamentos tóxicos de não tóxicos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEKER, A., WOUTENBERG, V., GRÖLLERS-MULDERIJ, M., SNEL, C., JEURISSEN, N., STIERUM, R. WOLTERBEEK, A.. The bovine oocyte in vitro maturation model : A potential tool for reproductive toxicology screening. **Reproductive Toxicology** 34, 251–260, 2012.

SCHOLZ, G., GENSCHOW, E. Embryotoxicity Screening Using Embryonic Stem Cells *in vitro* : Correlation to *in vivo*. **Teratogenicity Cells Tissues Organs** 203–211, 1999.

TESSARO, I., MODINA, S.C., CROTTI, G., FRANCIOSI, F., COLLEONI, S., LODDE, V., GALLI, C., LAZZARI, G., LUCIANO, A.M. Transferability and inter-laboratory variability assessment of the in vitro bovine oocyte fertilization test. **Reprod. Toxicol.** 51, 106–113. doi:10.1016/j.reprotox.2015.01.001, 2015.

GRIESINGER C, DESPREZ B, COECKE S, CASEY W, ZUANG V. Validation of alternative in vitro methods to animal testing: concepts, challenges, processes and tools, **Springer**. 856: 65-132, 2015.

SILVA, A., REMIRÃO, M.H., LUCAS, C.G., DOMINGUES, W.B., SILVEIRA, T., PASCHOAL, J.D. JORNADA, D.S., CORCINE, C.D., JUNIOR, A.S.V., PRADO, W.A., CAMPOS, V.F., SEIXAS, F.K. GUTERRES, S.S., POHLMANN, A.R., COLLARES, T. Effects of chitosan-coated lipidcore nanocapsules on bovine sperm cells. **Toxicol. in Vitro** 40, 214–222, 2017.

A. VICENTE-CARRILLO, V. LOITTO, K.E. MAGNUSSON, R. RIGLER, H. RODRIGUEZ-MARTINEZ. The CatSper receptor family is present in boar spermatozoa, **Reprod. Dom. Anim.** 49 (Suppl. 3) 194, 2014.

MAYEVSKY, A., BAR-SAGIE, D. and BARTOOV, B. Sperm cell motility as a new experimental model for toxicological studies. **Arch. Toxicol. Suppl.** 6:295-299, 1983.

ZEMPLINI, J; WIJERATNE, SS; HASSAN, YI. Biontin. **Biofactors**; 35 (1) 36- 46, 2009.