

AVALIAÇÃO DA EXPANSÃO DE CÉLULAS DO *CUMULUS* DE OÓCITOS DE QUALIDADE A E B EM MEIO DE MATURAÇÃO *IN VITRO* SUPLEMENTADO COM RESVERATROL

ISADORA ANDRÉ ROSA LOPES¹; ANA LAURA DA SILVA FEIJÓ²; JÚLIA DAMÉ FONSECA PASCHOAL²; MARIANA HÄRTER REMIÃO²; MORGANA ALVES BORGES²; TIAGO VEIRAS COLLARES³.

¹Universidade Federal de Pelotas – isadoralopes@msn.com

²Universidade Federal de Pelotas – sf.analaura@gmail.com, juliadfp@outlook.com,
ab.morgana@hotmail.com, marri.hr@hotmail.com

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

1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotécnica da reprodução que possui três principais etapas: a maturação *in vitro* (MIV) dos oócitos, a fertilização *in vitro* (FIV) dos oócitos e o cultivo *in vitro* (CIV) dos zigotos formados. Apesar de a PIVE vir sendo aperfeiçoada ao longo dos anos, as taxas de produção de blastocistos em meios de cultivo simples permanecem baixas (CHEUQUEMAN et al., 2015). Isso ocorre devido a vários fatores, dentre eles o fato de os meios de cultivo que não conseguirem mimetizar por completo o ambiente folicular e intrauterino, e a manipulação *in vitro* das estruturas. Dessa forma, o melhoramento dos protocolos de PIVE através da suplementação com diferentes fármacos, vitaminas e outras moléculas torna-se necessário para aumentar a eficiência dos meios e permitir que os oócitos imaturos adquiram competência para a fertilização e consigam concluir a embriogênese com êxito (ABE; HOSHI, 2003; DUQUE et al., 2002; HIDALGO et al., 2003; TAHAEI et al., 2011).

O oócito em crescimento deriva a maioria dos seus substratos para metabolismo energético e biossíntese das células somáticas circundantes, denominadas células do *cumulus*, enfatizando a importância da intercomunicação. Tal comunicação ocorre por meio de uma rede extensiva de canais transmembrana conhecidos como junções gap. As funções fisiológicas das junções gap no folículo são diversas, fornecendo suporte nutricional, transmitindo sinais elétricos e transportando moléculas mensageiras das células foliculares ao oócito (UYAR et al., 2013).

A ausência das células do *cumulus* é prejudicial para obtenção de embriões bovinos através da FIV, pois diminui a taxa de maturação e fertilização oocitária além de prejudicar desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto. Ainda, as células do *cumulus* atuam na atração, seleção e capacitação espermática, e previnem o endurecimento precoce da zona pelúcida, sendo, portanto, importantes na fecundação (CAMPOS, 2011).

A expansão do *cumulus* é outro aspecto crucial nos estágios finais do desenvolvimento folicular. Os oócitos obtidos a partir de folículos com expansão do *cumulus* prejudicada têm potencial limitado para implantação, após serem fecundados (VEECK, 1999). Como a qualidade das células do *cumulus* varia de acordo com a classificação dos oócitos, as condições de cultivo *in vitro* podem desempenhar um papel importante durante a maturação e o desenvolvimento embrionário (OCHOTA et al., 2016). Já foi relatado que oócitos de qualidade mais baixa podem aumentar as taxas de maturação e produzir mais blastocistos de melhor qualidade, quando cultivados com adição dos antioxidantes SOD e taurina

(OCHOTA et al., 2016). Sabe-se que maturação inadequada do oócito, seja ela nuclear ou citoplasmática inviabiliza a fecundação e aumenta a ocorrência de polispermia, partenogênese e bloqueio do desenvolvimento embrionário (XU; BRACKET, 1988). Nesse sentido, com o intuito de aprimorar o meio utilizado durante a MIV, a suplementação de resveratrol (3,4,5-tri-hidroxi-trans-stilbene) se mostra interessante, uma vez que esta molécula é conhecida por ser um potente antioxidante que atua mantendo os níveis de enzimas antioxidantes como glutathione peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) e melhorando a distribuição e função das mitocôndrias que são fundamentais para a maturação dos oócitos (SILVA et al., 2015).

Visto isso, nosso objetivo foi avaliar o efeito do antioxidante resveratrol na concentração de 1 μM , sob a expansão das células do *cumulus* em oócitos de qualidade A e B.

2. METODOLOGIA

Ovários bovinos foram obtidos de abatedouro local, e aspirados os folículos com tamanho entre 2 a 8 milímetros de diâmetro com auxílio de uma agulha acoplada a uma bomba de sucção a vácuo. Em lupa estereomicroscópica, os complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) grau A e B foram selecionados para o estudo. As categorias de classificação dos CCOs foram definidas segundo COSTA (1994): Grau I (A), CCOs compactos com mais de três camadas de células do *cumulus* e oócito com citoplasma homogêneo; Grau II (B), CCOs compactos com três ou menos camadas de células do *cumulus* e oócitos com citoplasma ligeiramente heterogêneo. Grupos de 15 a 20 CCOs foram transferidos para gotas de 100 μL de meio de maturação *in vitro* (In Vitro Brasil, Campinas, Brasil) e mantidos em estufa a 38,5 °C, com 5% de CO_2 , por 24 horas. O meio de maturação foi suplementado com resveratrol, na concentração de 1 μM . Os CCOs foram distribuídos igualmente entre os grupos: RA (resveratrol em oócitos grau A), RB (resveratrol em oócitos grau B), CA (controle em oócitos grau A) e CB (controle em oócitos grau B).

Conforme descrito por MAREI et al. (2010), o grau de expansão do *cumulus* foi avaliado subjetivamente sob uma lupa estereomicroscópica após 24h de maturação como não expandido (camada de células compactadas), parcialmente expandido (a camada externa das células foi afrouxada) ou totalmente expandido (todas as células *cumulus* foram afrouxadas).

Para análise estatística, os resultados foram comparados utilizando teste do qui-quadrado com auxílio do software SPSS. 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

O presente trabalho demonstrou que não houve diferença estatística entre os grupos testados sobre a expansão de células do *cumulus*. Dessa forma o resveratrol nesta concentração não traz benefícios para este parâmetro avaliado, seja em oócitos grau A ou B (Tabela I). Entretanto outras concentrações e outros parâmetros, como maturação *in vitro*, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e glutathione (GSH), criotolerância, fertilização e taxa de produção de blastocisto podem ser investigados.

Já foi relatado na literatura, por KORDOWITZKI et al. (2015), que a suplementação de 1 μM resveratrol durante MIV e FIV parece melhorar a



competência de desenvolvimento de oócitos, os quais, quando cultivados em meio de maturação suplementado com tal concentração mostraram desprendimento distinto de células *cumulus*.

Em maiores concentrações, o resveratrol também demonstrou proteção na maturação *in vitro* de oócitos porcinos pós estresse térmico (LI, 2016), induziu secreção de progesterona e apresentou efeito antioxidante, provavelmente de maneira dependente da sirtuin-1(WANG, 2014), bem como induziu a síntese mitocondrial e autofagia em oócitos derivados de folículos pré-antrais de vacas envelhecidas (SUGIYAMA, 2015).

Tabela 1. Análise de expansão de células do *cumulus* após a MIV. A tabela apresenta o número de estruturas encontradas e a porcentagem em relação ao número total do grupo.

Grupos	Sem expansão(%)	Parcialmente expandido(%)	Totalmente expandido(%)
Controle A	5 (7,57)	34 (51,51)	27 (40,90)
Resveratrol A	8 (11,26)	44 (61,97)	19 (26,76)
Controle B	9 (13,84)	32 (49,23)	24 (36,92)
Resveratrol B	6 (8,21)	39 (53,42)	28 (38,35)

4. CONCLUSÕES

A suplementação de resveratrol em meio de maturação de oócitos *in vitro* não demonstrou influência na expansão das células do *cumulus*, mas pode vir a influir em demais fatores. Com isso espera-se que estudos futuros possam ser realizados para avaliar tal potencial.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHEUQUEMAN, C. et al. Supplementation of IVF medium with melatonin: effect on sperm functionality and in vitro produced bovine embryos. **Andrologia**, v. 47, n. 6, p. 604-615, 2015.

ABE, Hiroyuki; HOSHI, Hiroyoshi. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. **Journal of Reproduction and Development**, v. 49, n. 3, p. 193-202, 2003.

DUQUE, Paloma et al. Enhancement of developmental capacity of meiotically inhibited bovine oocytes by retinoic acid. **Human Reproduction**, v. 17, n. 10, p. 2706-2714, 2002.

HIDALGO, C. O. et al. Pregnancies and improved early embryonic development with bovine oocytes matured in vitro with 9-cis-retinoic acid. **Reproduction**, v. 125, n. 3, p. 409-416, 2003.

TAHAEI, Leila Sadat et al. Effects of retinoic acid on maturation of immature mouse oocytes in the presence and absence of a granulosa cell co-culture system. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 28, n. 6, p. 553-558, 2011.



UYAR, Asli; TORREALDAY, Saioa; SELI, Emre. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. **Fertility and sterility**, v. 99, n. 4, p. 979-997, 2013.

CAMPOS, Carolina Oliveira et al. Influência da interação entre o oócito e as células da granulosa nos resultados dos procedimentos de reprodução assistida. **Femina**, v. 39, n. 4, p. 207-216, 2011.

VEECK, Lucinda L. (Ed.). **An atlas of human gametes and conceptuses: an illustrated reference for assisted reproductive technology**. Taylor & Francis, 1999.

OCHOTA, Małgorzata; PASIEKA, Anna; NIŻAŃSKI, Wojciech. Superoxide dismutase and taurine supplementation improves in vitro blastocyst yield from poor-quality feline oocytes. **Theriogenology**, v. 85, n. 5, p. 922-927, 2016.

XU, K. P.; GREVE, Torben. A detailed analysis of early events during in-vitro fertilization of bovine follicular oocytes. **Journal of reproduction and fertility**, v. 82, n. 1, p. 127-134, 1988.

SILVA, A. R. N. **Efeito do resveratrol na qualidade e desenvolvimento de embriões bovinos criopreservados ou conservados em meio holding**. 2015. 48 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

COSTA, EP da. Aspectos morfológicos (citológicos e ultraestruturais) e desenvolvimento de ovócitos de bovinos "in vitro". **Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais**, 1994.

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.

KORDOWITZKI, P. et al. Effects of resveratrol supplementation during in vitro maturation and in vitro fertilization on developmental competence of bovine oocytes. **Animal Reproduction**, v. 12, n. 3, p. 738-738, 2015.

LI, Yu et al. Resveratrol compares with melatonin in improving in vitro porcine oocyte maturation under heat stress. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 33, 2016.

WANG, Feng et al. Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization. **Fertility and sterility**, v. 101, n. 2, p. 577-586. e1, 2014.

SUGIYAMA, Miyako et al. Resveratrol-induced mitochondrial synthesis and autophagy in oocytes derived from early antral follicles of aged cows. **Journal of Reproduction and Development**, v. 61, n. 4, p. 251-259, 2015.