

ANÁLISE *IN VITRO* DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DO QUIMIOTERÁPICO DOCETAXEL EM OÓCITOS BOVINOS

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

¹ Universidade Federal de Pelotas – isadoraarlopez@gmail.com

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

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

1. INTRODUÇÃO

Câncer é o nome geral dado a um conjunto de mais de 100 doenças, que possuem em comum o crescimento desordenado de células que tendem a invadir tecidos e órgãos vizinhos (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2011). Atualmente, é considerado um dos mais complexos problemas de saúde pública que o sistema de saúde brasileiro enfrenta, dada a sua magnitude epidemiológica, social e econômica (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2011). A principal ferramenta clínica para o controle de malignidades invasivas é a utilização de medicamentos específicos que acarretam na morte celular de células cancerígenas - denominada quimioterapia (JOHNSTONE; RUEFLI; LOWE, 2002). Tal estratégia possui como vantagem a ação em todo o corpo, atingindo também as células metastáticas (AMERICAN CÂNCER SOCIETY, 2010).

Dentre os principais quimioterápicos utilizados atualmente destaca-se o docetaxel. Representando um dos mais poderosos agentes contra o câncer local ou metastático, é amplamente utilizado como padrão ouro no tratamento de câncer de mama, pulmão de células não pequenas e de ovário, apresentando um alto nível de atividade e de sensibilidade (GLIGOROV; LOTZ, 2004). Tal agente antineoplásico atua promovendo a agregação da tubulina em microtúbulos estáveis e inibindo a sua dissociação, o que conduz a uma marcada redução de tubulina livre, causando a parada do ciclo celular em G2M (SCHIFF et al., 1979).

Contudo, assim como outras drogas quimioterápicas, o docetaxel possui efeitos colaterais e tóxicos, dentre os quais destaca-se a toxicidade reprodutiva (ZHAO; ASTRUC, 2012; LOPES et al., 2014). Assim, a infertilidade é uma grande preocupação após a quimioterapia, logo, é de suma importância caracterizar os danos específicos causados por um medicamento no sistema reprodutivo para possibilitar a descoberta e implementação de estratégias de proteção adequadas.

Sabe-se que protocolos de produção *in vitro* de embriões (PIVE) são importantes plataformas para avaliar a toxicidade reprodutiva (POCAR et al., 2003; LAZZARI et al., 2008; VAN WOUDENBERG et al., 2012). Nesse sentido, a etapa de maturação oocitária *in vitro* (MIV), em especial, constitui um importante modelo para a elucidação dos mecanismos subjacentes à formação de um oócito competente (GANDOLFI; BREVINI, 2010).

Dessa forma, considerando o impacto da infertilidade na vida do paciente oncológico, o objetivo do presente estudo foi avaliar a ação toxicológica do docetaxel, utilizando um *range* de concentrações relatadas na literatura por inibir 50% da proliferação celular em linhagens neoplásicas, durante a etapa de maturação de oócitos bovinos *in vitro*.

2. METODOLOGIA

2.1. Maturação *in vitro*

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) considerados grau A e B de acordo com as categorias de classificação definidas por COSTA (1994) foram selecionados para o estudo. Após a seleção os CCOs foram distribuídos em 7 grupos contendo de 10 a 20 estruturas, dispostos em gotas de 100 μ l de meio MIV cobertas com óleo mineral (InVitroBrasil S/A, São Paulo, Brasil). Dessa forma, os 7 grupos experimentais foram identificados por: Docetaxel 1nM, 5nM, 10nM, 50nM, 100nM, um grupo controle positivo contendo etanol a 5% e um grupo controle sem nenhum tratamento. Posteriormente, as placas contendo os CCOs foram encubadas em estufas de cultivo (Heal Force- HF-160 W) a 5% de CO₂ e 38,5°C, onde permaneceram durante 22 a 24h.

2.2. Ensaio colorimétrico de redução do MTT

A citotoxicidade em oócitos bovinos foi determinada pelo ensaio do brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) de acordo com Beker van Woudenberg et al. (2012) com pequenas modificações. Vinte horas após o início da MIV, os COCs foram transferidos para gotas de 100 μ L de PBS-PVP (1 μ g/ml de polivinilpirrolidona em PBS) e as células do *cumulus* foram removidas com sucessivas pipetagens, posteriormente os oócitos desnudos foram lavados em mais 2 gotas de 100 μ L de PBS-PVP. Em seguida, os oócitos foram reincubados na placa de MIV em seus respectivos grupos experimentais, onde em cada gota de 100 μ L meio MIV foi adicionado 2 μ L de solução de MTT para atingir uma concentração final de 0,5mg/mL, e realocados na estufa para completar as 2h restantes de MIV a 38,5°C e 5% de CO₂. Passado o tempo de reincubação, os oócitos foram avaliados sob estereomicroscópio, onde os oócitos que apresentaram coloração roxo escuro foram classificados como viáveis e os oócitos claros como não viáveis.

2.3. Teste de viabilidade de membrana

Após 24h de MIV, os oócitos foram submetidos à coloração utilizando o kit LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity (Live/Dead – Viability/Cytotoxicity Kit – Molecular Probes Inc.), com pequenas modificações nas instruções do fabricante. As células do *cumulus* dos COCs foram removidas por sucessivas pipetagens com o auxílio de hialuronidase (160 UI/ml), após, os oócitos foram lavados em gotas de 100 μ L de solução de PBS-PVP, e posteriormente corados utilizando o kit LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity. Passado o tempo de incubação com os corantes, os oócitos foram lavados mais 2 gotas de 100 μ L de PBS-PVP, e então alocados em lâminas e avaliados em microscópio confocal (LeicaMicrosystems-TCS SP8), onde os oócitos que apresentaram coloração verde foram classificados como viáveis e os oócitos vermelhos como não viáveis.

2.4. Análises estatísticas

A análise estatística utilizada para avaliar a viabilidade e toxicidade oocitária foi o teste Qui-quadrado seguido de Teste exato de Fisher, realizados com auxílio do software STATISTICX. O grau de significância estatística em todas as análises foi definido em um nível de probabilidade de $p<0.05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no ensaio de redução do MTT (Tabela 1) e viabilidade de membrana (Tabela 2) demonstram que o quimioterápico docetaxel não possuiu efeito tóxico em nenhuma das concentrações testadas, uma vez que não diferiu estatisticamente do controle ($p>0,05$). Havendo apenas diferença estatística

significativa quando o grupo controle positivo foi comparado aos demais, assim comprovando a eficácia do procedimento experimental.

Tabela 1. Viabilidade mitocondrial de oócitos bovinos maturados na presença ou ausência de Docetaxel.

Grupos experimentais	Oócitos totais	Oócitos não viáveis
Controle	41	1 ^b
Controle positivo (Etanol 5%)	48	48 ^a
Docetaxel 1nM	44	1 ^b
Docetaxel 5nM	42	3 ^b
Docetaxel 10nM	40	5 ^b
Docetaxel 50nM	46	1 ^b
Docetaxel 100nM	40	3 ^b

Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística significativa.

Tabela 2. Viabilidade celular de oócitos bovinos maturados na presença ou ausência de Docetaxel.

Grupos experimentais	Oócitos totais	Oócitos não viáveis
Controle	42	5 ^b
Controle positivo (Etanol 5%)	44	44 ^a
Docetaxel 1nM	44	4 ^b
Docetaxel 5nM	42	1 ^b
Docetaxel 10nM	44	3 ^b
Docetaxel 50nM	38	1 ^b
Docetaxel 100nM	41	3 ^b

Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística significativa

Alm et al. (1998) demonstraram que quando oócitos bovinos foram expostos à baixas concentrações de pesticidas, o efeito foi evidente não durante a maturação do oóцит, mas apenas no desenvolvimento da mórula ou do estágio de blastocisto. Campagna et al. (2001) encontraram resultados semelhantes expondo oócitos suínos a uma mistura de pesticidas, observando não apenas uma diminuição na taxa de blastocisto, mas também na qualidade dos mesmos. Dessa forma acredita-se que o período de 24h decorrentes da maturação pode ser insuficiente para avaliar danos, dependendo do composto e concentrações utilizados, embasando uma possível explicação para os resultados encontrados no presente trabalho.

Além disso, a hipótese de avaliar as células do cumulus conjuntamente com os oócitos para testes de toxicidade poderá prover uma informação significativamente relevante. Baseando-se no fato de células mitoticamente ativas, como os GCs, serem mais propensas e vulneráveis a danos decorrentes da administração de docetaxel do que oócitos. Por conseguinte, a morte dos oócitos seria proveniente do dano ao CG e perda das conexões do oóцит-GC (THOMSON et al., 2010). Ademais, provavelmente as concentrações necessárias para gerar dano apenas ao oóцит sejam mais altas que as necessárias para manifestar nos CCOs.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, sugere-se que o quimioterápico docetaxel não possua efeito citotóxico sobre oócitos bovinos dentre o range de

concentrações e parâmetros analisados. Assim, considerando que até o presente momento os trabalhos publicados sinalizam a necessidade de uma avaliação individualizada do oócito (sem as células do *cumulus*), este trabalho pôde subsidiar a hipótese da importância da avaliação concomitante das células do *cumulus* em ensaios toxicológicos reprodutivos para o docetaxel.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABC do câncer : abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro : Inca, 2011. 128 p. : il.
- ALM, Hannelore et al. Influence of organochlorine pesticides on maturation and postfertilization development of bovine oocytes in vitro. **Reproductive Toxicology**, v. 12, n. 5, p. 559-563, 1998.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Breast Cancer Staging 7th Edition. **American Joint Committee on Cancer**, p. 1-2, 2010.
- CAMPAGNA, Céline et al. Impaired maturation, fertilization, and embryonic development of porcine oocytes following exposure to an environmentally relevant organochlorine mixture. **Biology of reproduction**, v. 65, n. 2, p. 554-560, 2001.
- COSTA, EP da. Aspectos morfológicos (citológicos e ultraestruturais) e desenvolvimento de ovócitos de bovinos “in vitro”. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1994.
- GANDOLFI, Fulvio; BREVINI, Tiziana AL. RFD Award Lecture 2009. In vitro maturation of farm animal oocytes: a useful tool for investigating the mechanisms leading to full-term development. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 3, p. 495-507, 2010.
- GLIGOROV, Joseph; LOTZ, Jean Pierre. Preclinical pharmacology of the taxanes: implications of the differences. **The oncologist**, v. 9, n. Supplement 2, p. 3-8, 2004.
- JOHNSTONE, Ricky W.; RUEFLI, Astrid A.; LOWE, Scott W. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. **cell**, v. 108, n. 2, p. 153-164, 2002.
- LAZZARI, Giovanna et al. Development of an in vitro test battery for assessing chemical effects on bovine germ cells under the ReProTect umbrella. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 233, n. 3, p. 360-370, 2008.
- LOPES, Federica et al. Docetaxel induces moderate ovarian toxicity in mice, primarily affecting granulosa cells of early growing follicles. **MHR: Basic science of reproductive medicine**, v. 20, n. 10, p. 948-959, 2014.
- POCAR, Paola et al. Toxic effects of in vitro exposure to p-tert-octylphenol on bovine oocyte maturation and developmental competence. **Biology of reproduction**, v. 69, n. 2, p. 462-468, 2003.
- SCHIFF, Peter B.; FANT, Jane; HORWITZ, Susan B. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. **Nature**, v. 277, n. 5698, p. 665, 1979.
- THOMSON, Travis C.; FITZPATRICK, Katherine E.; JOHNSON, Joshua. Intrinsic and extrinsic mechanisms of oocyte loss. **Molecular human reproduction**, v. 16, n. 12, p. 916-927, 2010.
- VAN WOUDENBERG, Anna Beker et al. The bovine oocyte in vitro maturation model: a potential tool for reproductive toxicology screening. **Reproductive Toxicology**, v. 34, n. 2, p. 251-260, 2012.
- ZHAO, Pengxiang; ASTRUC, Didier. Docetaxel nanotechnology in anticancer therapy. **ChemMedChem**, v. 7, n. 6, p. 952-972, 2012.