

## AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO GÁLICO E ÁCIDO TÂNICO NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS

PEDRO HENRIQUE DALA NORA QUATRIN<sup>1</sup>; LAURA DE VARGAS MAIOCCHI<sup>2</sup>;  
PÂMELLA DA COSTA<sup>3</sup>; HANDRYA ROLDÂN CORRÊA AVILA<sup>4</sup>; NATHALIA  
STARK PEDRA<sup>5</sup>; PRISCILA MARQUES MOURA DE LEON<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [quatrinp@gmail.com](mailto:quatrinp@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [lauradevargasmaiocchi@gmail.com](mailto:lauradevargasmaiocchi@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [pamelladacosta2002@gmail.com](mailto:pamelladacosta2002@gmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [avilahandrya@gmail.com](mailto:avilahandrya@gmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – [nathaliastark@hotmail.com](mailto:nathaliastark@hotmail.com)

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – [primleon@gmail.com](mailto:primleon@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

A maturação *in vitro* (MIV) de oócitos exige condições ideais de cultivo para ocorrer as transformações químicas e biológicas para posterior fecundação e formação do embrião. Essas condições incluem temperatura, composição do meio de cultivo, gases e suplementação proteica relacionadas a fatores de crescimento (GUEMRA et al., 2013). O desenvolvimento de novas tecnologias de otimização da MIV é importante para suprir a demanda de embriões no setor pecuarista, tornando uma alternativa para aumentar as taxas de sucesso das técnicas e contornar problemas reprodutivos (VIANA et al., 2018). Seguindo essa lógica, são necessários avanços para alcançar o processo de produção *in vitro* de embriões (PIV), com oócitos de qualidade para que se desenvolvam até o estágio de blastocisto (ADONA et al., 2011).

As técnicas de manipulação *in vitro* para a PIV de embriões devem superar o desafio associado à retirada de oócitos do seu ambiente natural. O meio fisiológico, no interior do folículo, fornece defesas naturais contra agentes oxidantes e riscos potenciais, ao mesmo tempo que oferece os nutrientes essenciais para o seu desenvolvimento. Nesse sentido, se faz indubitável a utilização de agentes antioxidantes como uma estratégia para mitigar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), que representam um impasse durante a fertilização *in vitro* de embriões. As ERO's são produzidas pelo próprio metabolismo e enzimas, que quando o quantitativo oxidante supera a capacidade antioxidante, ocorre o processo chamado de estresse oxidativo; resultando em danos nos componentes intracelulares podendo induzir até mesmo a apoptose (WANG et al., 2002).

A suplementação dos meios de cultivo de oócitos com agentes antioxidantes contribuem para uma menor taxa de estresse oxidativo das células e promovem maiores taxas de sucesso. Nesse viés, o ácido gálico (AG), um composto fenólico encontrado naturalmente em sementes de uvas, frutas vermelhas e folhas de chá verde e além disso, possui efeitos terapêuticos baseados em propriedades antioxidantes decorrentes da ação de enzimas, como a superóxido dismutase (SOD), que causa uma dismutação dos radicais em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e posteriormente é desintoxicado em água e oxigênio pela glutathiona peroxidase (SILVA et al., 2021; KALA, 2017; RE CART et al., 2021).

O ácido tânico (AT) é um composto polifenólico encontrado em uma variedade de plantas, por exemplo, frutas vermelhas, café, nozes e feijão (BONA et al., 2020). Suas propriedades farmacológicas exercem um papel poderoso contra o estresse oxidativo e favorecendo a redução das ERO, e também há o aumento de níveis de glutathiona (GSH) durante a MIV (YIN et al., 2021).

Como descrito por YIN et al. (2021), SILVA et al. (2021) e LEE et al. (2021), os compostos de AG e AT trouxeram resultados positivos no processo de MIV em algumas espécies de mamíferos. No entanto, há uma carência de informações sobre os efeitos desses compostos quando utilizados em meios de cultura para a MIV de oócitos bovinos. Ademais, o objetivo deste trabalho é a avaliação da taxa de maturação *in vitro* de oócitos, para inferência do potencial antioxidantes e protetor celular dos compostos ácido gálico e ácido tânico suplementados durante o processo de MIV de oócitos bovinos.

## 2. METODOLOGIA

**2.1 Coleta e seleção de oócitos:** Os ovários bovinos foram coletados em um matadouro local da região de Pelotas/RS, e foram transportados para o laboratório dentro de 1 hora em solução salina fisiológica (0,9% de cloreto de sódio) e mantidos em uma temperatura aproximada de 37,5 C°.

Os complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) foram aspirados de folículos germinativos com tamanho entre 2 a 8 mm, utilizando com agulha de calibre 18G acoplada a uma seringa descartável de 10 mL, o conteúdo aspirado foi mantido a 37,5 C° (BONI et al., 1999).

Após cerca de 15 minutos, o precipitado foi coletado e levado para um microscópio estereoscópio, para realizar a seleção de oócitos em estágio de vesícula germinativa (VG). Os CCOs foram classificados, como descrito por DE LOSS et al. (1989), e as estruturas que estavam em condições de prosseguirem para a etapa de maturação, íntegros, com citoplasma homogêneo e com células do *cumulus* compactas (Grau 1 e Grau 2) prosseguiram para as etapas subsequentes. Durante o processo de seleção, os oócitos foram mantidos em meio de lavagem (TCM Hepes suplementado com 10% de soro equino) (BONI, 2002).

**2.2 Maturação *in vitro* de oócitos:** Dispostos em gotículas de 100 µL de meio TCM199 (suplementado com 10% de soro equino, 0,2 mM de piruvato de sódio, 1 µg/mL de hormônio folículo-estimulante (FSH), 5 µg/mL de hormônio luteinizante (LH) ), de 10 - 20 oócitos foram transferidos para cada gota e incubados em uma estufa a 37,5 C° com atmosfera umidificado e com 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas (BONI, 2002).

Seguindo o protocolo de MIV descrito, foram testadas a suplementação do meio com os compostos ácido gálico (grupo AG) e ácido tânico (grupo AT) em uma concentração final de 10 µg/mL. Além disso, um grupo controle foi incluído, no qual nenhum composto foi adicionado.

Ao final do período de cultivo, os oócitos foram retirados da gota de MIV, foram avaliados em relação ao grau de expansão da células do *cumulus* indicando a ocorrência da maturação citoplasmática. Em seguida, foram desnudados por sucessivas pipetagens para que fosse avaliada a taxa de maturação pela visualização do corpúsculo polar (CP), indicativo da maturação nuclear, indicando que os CCOs atingiram o estágio de metáfase II (MII). A aparência geral do CCOs também foi avaliada em lupa estereomicroscópica.

**2.3 Análise Estatística:** Todos os experimentos foram apresentados como média ± erro padrão da média (E.P.M.). As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software GraphPad Prism v.8.0.2. Foi realizado um teste qui-quadrado. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente, foi estabelecida uma rotina cuidadosa para garantir o controle eficiente da coleta, classificação dos meios e manutenção na estufa de cultivo. Essa estratégia planejada proporcionou uma base sólida para o desenvolvimento de nosso estudo. No que diz respeito aos resultados da primeira fase dessa rotina, de um total de 28 oócitos coletados, 18 destes alcançaram a maturação esperada, o estágio de MII, resultando em taxa de MIV de 64,23%.

Na segunda rotina, foi realizada a coleta e seleção dos oócitos, seguida pela MIV destes CCOs, juntamente com a suplementação do meio utilizando Ácido Gálico (AG) e Ácido Tânico (AT). Esse conjunto de procedimentos envolveu a análise de três grupos distintos: o Grupo AG, o Grupo AT e o Grupo Controle (GC). Foram distribuídos nessa rotina um total de 72 CCOs entre os três tratamentos. Cada um dos grupos, AG, AT e GC receberam 23, 21 e 28 CCOs respectivamente, divididos em duas gotas de cultivo para cada tratamento.

Com relação a característica de expansão das células do *cumulus*, ao término do período de cultivo, os resultados mostraram que no Grupo AG 17 (17/23) oócitos apresentavam *cumulus* expandido, indicando 73,91% de maturação citoplasmática. Enquanto que, no mesmo grupo de tratamento AG, apenas 4 COCs atingiram o estágio MII (17,39% de maturação nuclear). Com a suplementação de AG foi observado 13,04% de degenerados (3/23 CCOs). A expansão das células do *cumulus* aproximou-se do esperado; no entanto, a influência de um composto específico obstruiu a capacidade dos CCOs de retomar ou concluir a meiose, levando a um bloqueio da maturação nuclear.

No Grupo AT, observamos 11 (11/21) oócitos com *cumulus* expandido, indicando uma taxa de maturação citoplasmática de 52,38%. Com este tratamento, sete COCs alcançaram o estágio MII, resultando em 33,33% de maturação nuclear. Enquanto que, com a suplementação com AT foi observado apenas 1 degenerado entre os 21 CCOs (4,76% de degeneração). Por fim, no GC, identificamos 19 (19/28) oócitos com *cumulus* expandido, resultando em 67,85% de maturação nuclear, e 7,14% de degeneração (2/28 CCOs degenerados). De acordo com Guo *et al.* (2021), também foi registrado um nível superior de maturação dos oócitos em comparação com o composto empregado, que no caso era o ácido perfluorooctanóico. Além disso, as taxas de MIV indicaram também no composto AT um efeito de bloqueio na evolução meiótica. Portanto, torna-se essencial aprofundar o entendimento desse fenômeno para explorar o uso do composto em diferentes etapas do cultivo e outras concentrações.

A partir desses dados, podemos observar que a suplementação com ácido gálico e ácido tânico parece ter efeitos diferentes na maturação oocitária, com um grau de expansão das células do *cumulus* maior no grupo AT em comparação com o grupo AG. No entanto, ambas as taxas de maturação nos grupos suplementados (AG e AT) quando comparados com o grupo controle, não apresentaram diferença estatística significativa ( $p=0,6367$  e  $p=0,2712$ , respectivamente), sugerindo que a suplementação pode não proporcionar um benefício significativo durante a maturação dos oócitos bovinos. Com isso, considerando a flexibilidade que esses compostos oferecem em termos de aplicação, é importante explorar a possibilidade de utilizá-los nos momentos iniciais da coleta e seleção dos CCOs, quando as estruturas celulares estão muito expostas às condições ambientais do laboratório; ou até mesmo como forma de bloqueio da retomada da meiose, de forma a propiciar estudos na fase de crescimento oocitário. Em contraste, os grupos AG e AT apresentaram números menores de COCs e uma proporção significativa de COCs imaturos, com algumas

pequenas diferenças entre eles. O grupo AG pareceu ter uma proporção semelhante de COC compacto quando comparado ao grupo AT ( $p=0,3452$ ). Esses dados sugerem que a leve acidez do ambiente do grupo AG pode afetar o desenvolvimento do COC e a maturação oocitária, levando a diferenças em comparação com o grupo AT e o grupo controle. Alterações nas condições do meio de cultivo podem afetar o crescimento e desenvolvimento de gametas e embriões, e, portanto, a concentração do pH pode ter sido um fator que impediu a maturação nuclear dos COCs, conforme apontado por Viana et al. (2018). Análises e estudos adicionais são necessários para compreender completamente os efeitos destes compostos e otimizar a sua utilização em protocolos de MIV e PIV de embriões bovinos.

#### 4. CONCLUSÕES

Este estudo representa uma etapa inicial em nossas investigações. Essas substâncias têm um grande potencial para expansão de pesquisas, considerando a ampliação das concentrações testadas e a exploração da suplementação dos meios não apenas na coleta e maturação dos oócitos, mas também no meio de lavagem e de manutenção dos CCOs, bem como no processo de FIV in si. Futuras abordagens e explorações podem aprofundar nosso entendimento e aprimorar a eficácia dos procedimentos envolvidos na reprodução assistida, contribuindo assim para avanços valiosos na área da biotecnologia reprodutiva.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- GUEMRA, S. et al. Maturação in vitro de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 65, p. 1616-1624, 2013.
- ADONA, P. R. et al. Embryonic Development and Gene Expression in Oocytes Cultured In Vitro in Supplemented Pre-Maturation and Maturation Media. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 46, n. 1, p. e31-e38, 2011.
- VIANA, J. H. M. et al. A historical perspective of embryo-related technologies in South America. *Animal Reproduction*, v. 15, n. Suppl 1, p. 963, 2018.
- WANG, X. et al. 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. 1272-1277, 2002.
- SILVA, G. A. et al. Gallic acid promotes the in vitro development of sheep secondary isolated follicles involving the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Animal Reproduction Science*, v. 230, p. 106767, 2021.
- YIN, Z. et al. Tannin supplementation improves oocyte cytoplasmic maturation and subsequent embryo development in pigs. *Antioxidants*, v. 10, n. 10, p. 1594, 2021.
- SABRY, R. et al. Effects of bisphenol A and bisphenol S on microRNA expression during bovine (*Bos taurus*) oocyte maturation and early embryo development. *Reproductive Toxicology*, v. 99, p. 96-108, 2021.
- BONI, R. et al. Intercellular communication in in vivo-and in vitro-produced bovine embryos. *Biology of reproduction*, v. 61, n. 4, p. 1050-1055, 1999.
- BONI, R.; CUOMO, Annunziata; TOSTI, Elisabetta. Developmental potential in bovine oocytes is related to cumulus-oocyte complex grade, calcium current activity, and calcium stores. *Biology of Reproduction*, v. 66, n. 3, p. 836-842, 2002.
- RECART, V. M. et al. Gallic acid protects cerebral cortex, hippocampus, and striatum against oxidative damage and cholinergic dysfunction in an experimental model of manic-like behavior: Comparison with lithium effects. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 81, n. 2, p. 167-178, 2021.
- BONA, N. P. et al. Tannic acid elicits selective antitumoral activity in vitro and inhibits cancer cell growth in a preclinical model of glioblastoma multiforme. *Metabolic Brain Disease*, v. 35, p. 283-293, 2020.
- DE LOOS, F. et al. Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete research*, v. 24, n. 2, p. 197-204, 1989.
- KALA, M.; SHAIKH, Muhammad Vaseem; NIVSARKAR, Manish. Equilibrium between anti-oxidants and reactive oxygen species: a requisite for oocyte development and maturation. *Reproductive medicine and biology*, v. 16, n. 1, p. 28-35, 2017.
- LEE, A. W. T. et al. Single-cell RNA sequencing identifies molecular targets associated with poor in vitro maturation performance of oocytes collected from ovarian stimulation. *Human Reproduction*, v. 36, n. 7, p. 1907-1921, 2021.
- GUO, C. et al. Perfluorooctanoic acid inhibits the maturation rate of mouse oocytes cultured in vitro by triggering mitochondrial and DNA damage. *Birth Defects Research, [S.L.]*, v. 113, n. 14, p. 1074-1083, 19 abr. 2021. Wiley.