

Efeitos da suplementação de ácido oleico e ácido esteárico no meio de maturação in vitro sobre a atividade mitocondrial, estresse oxidativo e peroxidação lipídica em oócitos e células do *cumulus* em bovinos

Pedro Henrique Silva Ribeiro⁽¹⁾⁽⁶⁾, Alan Maia Borges⁽²⁾, Victor Felipe Sophia da Costa Neves⁽³⁾, Naiara Zoccal Saraiva⁽⁴⁾ e Clara Slade Oliveira⁽⁵⁾

⁽¹⁾Estagiário, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾Docente, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. ⁽³⁾Bolsita (Pibic/CNPq), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁴⁾Pesquisadora, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁵⁾Analista, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁶⁾e-mail: vetpedroribeiro@gmail.com.

Resumo- Este estudo avaliou o impacto da suplementação com ácido oleico e ácido esteárico no meio de maturação in vitro (MIV) sobre o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica em oócitos e células do *cumulus* de bovinos. Utilizando três grupos de COCs (complexos *cumulus*-oócitos): Controle (TCM199 com 8% BSA), ácido esteárico (TCM199 com 8% BSA e ácido esteárico) e ácido oleico (TCM199 com 8% BSA e ácido oleico), foi observado que a suplementação com ácido oleico melhorou a atividade mitocondrial e reduziu a peroxidação lipídica nas células do *cumulus*, comparado aos grupos controle e ácido esteárico. Em contraste, não houve diferenças significativas na atividade mitocondrial ou na presença de espécies reativas de oxigênio nos oócitos entre os grupos. Esses resultados sugerem que o ácido oleico é eficaz na redução do estresse oxidativo e na peroxidação lipídica, beneficiando a qualidade oocitária.

Termos para indexação: lipídeos, peroxidação, ácido oleico, estresse oxidativo, células do *cumulus*.

Effects of Oleic Acid and Stearic Acid Supplementation in the In Vitro Maturation Medium on Oxidative Stress and Lipid Peroxidation in Bovine Oocytes and *Cumulus* Cells

Abstract- This study evaluated the impact of oleic acid and stearic acid supplementation in the in vitro maturation (IVM) medium on oxidative stress and lipid peroxidation in bovine oocytes and cumulus cells. Using three groups of cumulus-oocyte complexes (COCs): Control (TCM199 with 8% BSA), Stearic Acid (TCM199 with 8% BSA and stearic acid), and Oleic Acid (TCM199 with 8% BSA and oleic acid), it was observed that oleic acid supplementation improved mitochondrial activity and reduced lipid peroxidation in cumulus cells compared to the control and stearic acid groups. In contrast, there were no significant differences in mitochondrial activity or reactive oxygen species presence in oocytes between the groups. These results suggest that oleic acid effectively reduces oxidative stress and lipid peroxidation, benefiting oocyte quality.

Index terms: Lipids, peroxidation, oleic acid, oxidative stress, *cumulus* cells.

Introdução

Durante os estágios do desenvolvimento folicular, ocorrem alterações no perfil lipídico tanto no gameta quanto nas células do *cumulus* que o acompanham. Durante a “Maturação in vitro” (MIV), o perfil e a fonte lipídica impactam diretamente no perfil lipídico dos oócitos e sua competência de desenvolvimento (Borges; Vireque, 2019). Dado que os lipídios endógenos participam do metabolismo energético, alterações no conteúdo lipídico pelo uso de indutores artificiais do metabolismo lipídico pode ter impacto na competência dos oócitos (Sturmeijer et al., 2009).

A enzima esteroil-CoA desaturase 1 (stearoyl-CoA desaturase 1 - SCD1) é responsável pela conversão de ácido esteárico (AE) em ácido oleico (AO), e sua atividade é fundamental para a regulação do conteúdo lipídico celular. A expressão e a atividade da SCD1 têm sido associadas à competência oocitária e ao desenvolvimento embrionário (Aardema et al., 2011, 2017).

Leroy et al. (2005) demonstraram que a maturação in vitro de oócitos na presença de ácido palmítico e ácido esteárico, resultou em redução na taxa de fertilização e na competência oocitária. Todavia, Fayezi et al. (2018) determinaram que o ácido oleico, atua como componente metabólico direto e regulador do estresse oxidativo nos oócitos. Portanto, este ácido graxo monoinsaturado pode ter um impacto significativo na maturação de oócitos e desenvolvimento embrionário.

Com isso, fica evidente que a modulação lipídica pode aprimorar a qualidade oocitária. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar os efeitos da adição de precursores e produtos da enzima SCD1 (ácido esteárico e ácido oleico) ao meio de MIV sobre o estresse oxidativo de oócitos e células do *cumulus* em bovinos.

As informações contidas nesse documento contribuem para o alcance do Objetivo de Desenvolvimento Sustentável (ODS) de números 8 (Empregos dignos e crescimento econômico: Promover o crescimento econômico sustentado, inclusivo e sustentável, emprego pleno e produtivo, e trabalho decente para todos).

Material e métodos

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, MG), sem a utilização de animais. Os complexos *cumulus*-oócitos (COCs) foram obtidos de ovários provenientes de abatedouro local. Os COCs foram recuperados de folículos medindo 2-8 mm por meio de aspiração folicular e seleção de estruturas com *cumulus* compacto não atrésico, com mais de duas camadas de células e citoplasma homogêneo.

Os COCs foram divididos aleatoriamente em três grupos para a maturação in vitro (MIV), em placas de quatro poços sem óleo mineral: Controle, cultivados em meio TCM199 suplementado com 8% BSA (Albumina Sérica Bovina); Ácido esteárico, cultivados em meio similar ao controle, acrescido de 25 μM ácido esteárico; e Ácido Oléico, cultivados em meio similar ao controle, acrescido de 200 μM ácido oleico.

As placas foram incubadas por 24 horas a 38,5 °C, 5% de CO₂ em ar atmosférico e alta umidade. Cada condição experimental foi replicada três vezes.

Às 23 horas de MIV, foram acrescentadas as sondas MitoTracker™ (1:100) e CellROX™ (1:100). A sonda BODIPY™ 581/591 C11 (3:100) no meio de maturação contendo os COCs

para os três grupos. Após 1 hora, os oócitos foram desnudados em solução de hialuronidase por pipetagens vigorosas.

Para cada estrutura, uma imagem foi gerada em cada canal e analisada no programa ImageJ, para quantificação da intensidade de fluorescência (pixels). Nos oócitos, foi selecionada a área total das células (comando ROI, region of interest). As médias de expressão de oxidação, peroxidação e área foram comparadas entre grupos utilizando o software Graphpad Instat por meio dos testes de kruskal wallis para dados não paramétricos, e as comparações múltiplas foram realizadas por meio do teste de Dwass-Steel-Critchlow-Fligner.

Para quantificação dos níveis de peroxidação lipídica, as intensidades de fluorescência foram analisadas e calculou-se a razão da intensidade no canal Texas Red® (lipídios não peroxidados) para a intensidade no canal GFP (lipídios peroxidados) de acordo com as orientações do fabricante, ou seja, a proporção de lipídios não peroxidados em relação aos lipídios peroxidados.

Resultados e discussão

A análise de atividade mitocondrial e estresse oxidativo foi realizada em triplicata com 192 oócitos (n=42-77 por grupo) e 630 células do *cumulus* (n= 210 por grupo). A análise de peroxidação foi realizada em triplicata com 327 oócitos (n=69-120 por grupo) e 663 células do *cumulus* (n= 214-226 por grupo). Os resultados das análises estão apresentados na Tabela 1.

Na avaliação dos oócitos, não houve diferença (p= 0,3) entre os grupos na avaliação da sonda MitoTracker, ou seja, a atividade mitocondrial dos oócitos não diferiu entre os grupos, bem como, não houve diferença (p= 0,056) entre os grupos na avaliação da sonda CellROX. Assim, não foram detectadas diferenças estatísticas nos níveis de estresse oxidativo entre os grupos. A área dos oócitos analisados também não diferiu (p=0,55), ou seja, todos os grupos apresentam oócitos com área semelhante. Nas análises de peroxidação lipídica, os grupos AE e AO apresentaram, respectivamente, razões 37,71% (p= 0,034) e 14,83% (p= 0,037) maiores em relação ao C. Quando comparados entre si o grupo AE e AO não apresentaram diferença estatística (p: 0,084). Uma razão alta de vermelho sobre verde sugere que há mais lipídios não peroxidados em comparação com os peroxidados, indicando um menor nível de peroxidação lipídica. Este resultado indica que, apesar da adição dos lipídeos aos meios de maturação, e conseqüentemente maior incorporação lipídica, houve menores índices de peroxidação quando comparado ao grupo controle, em teoria com menor quantidade de lipídeos.

Já na avaliação das células do *cumulus*, não houve diferença entre os grupos na avaliação da sonda CellROX (p:< 0.466), ou seja, não houve diferença significativa nos níveis de estresse oxidativo entre os grupos. Porém, houve diferença entre o grupo AO e os demais na avaliação da sonda MitoTracker, indicando uma maior atividade mitocondrial (p < 0.001) em células do *cumulus* do grupo Oleico quando comparado aos outros grupos, 36,16% em relação ao grupo AE e 34,27% em relação ao grupo C. O resultado da análise de peroxidação lipídica nas células do *cumulus* demonstra que as células do grupo AO apresentaram razão estatisticamente mais alta quando comparado aos grupos AE e C sendo 32,53% (p < 0,001) e 31,49% (p < 0.001) respectivamente. Assim, nas células do *cumulus*, a adição de Ácido Oleico proporcionou uma diminuição na peroxidação lipídica. Corroborando com os resultados de Aardema e colaboradores em 2011 que afirmam que o ácido oleico pode mitigar os efeitos negativos dos ácidos graxos saturados, promovendo uma melhor qualidade oocitária e potencial de desenvolvimento.

Tabela 1. Avaliações de atividade mitocondrial, estresse oxidativo e peroxidação lipídica realizadas em oócitos e células do *cumulus* de COCs maturados in vitro.

	Oócitos			Células do <i>cumulus</i>		
	Atividade Mitocondrial (Mitotracker)	Estresse Oxidativo (CellRox)	Peroxidação lipídica (Bodipy C11) ⁽¹⁾	Atividade Mitocondrial (Mitotracker)	Estresse Oxidativo (CellRox)	Peroxidação lipídica (Bodipy C11)*
Controle	16,678	13,576	3.79 ^A	26,955 ^B	33,509	1.06 ^B
Acido Esteárico	11,903	12,297	2.59 ^B	26,581 ^B	34,960	1.10 ^B
Ácido Oléico	17,309	12,289	1.52 ^B	36,192 ^A	35,565	1.52 ^A

⁽¹⁾Para peroxidação lipídica, o valor de mediana está apresentado. Letras diferentes nas colunas representam diferença estatística.

Conclusões

Oócitos maturados na presença de ácido oleico, produto da enzima SCD1, apresentaram aumento na atividade mitocondrial e redução na peroxidação lipídica das células do *cumulus*. Esta evidência sugere que o ácido oleico pode atuar como um agente protetor contra o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica, fatores que comprometem a qualidade oocitária.

Agradecimentos

Ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq) e à Fapemig pelo auxílio financeiro. À Embrapa Gado de Leite, à orientadora Clara Slade Oliveira e equipe de Reprodução Animal, pela oportunidade de estágio, o que me proporcionou obter experiência e aprendizado; ao pesquisador Alan Maia Borges (UFMG) pelo acompanhamento, orientação e apoio.

Referências

- AARDEMA, H.; VOS, P. L.; LOLICATO, F.; ROELEN, B. A.; KNIJN, H. M.; VAANDRAGER, A. B.; HELMS, J. B.; GADELLA, B. M. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. **Biology of Reproduction**, v. 85, n. 1, p. 62-69, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.088815>.
- AARDEMA, H.; VAN TOL, H. T. A.; WUBBOLTS, R. W.; BROUWERS, J. F. H. M.; GADELLA, B. M.; ROELEN, B. A. J. Stearoyl-CoA desaturase activity in bovine cumulus cells protects the oocyte against saturated fatty acid stress. **Biology of Reproduction**, v. 96, n. 5, p. 982-992, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.146159>.
- BORGES, E. D.; VIREQUE, A. Updating the impact of lipid metabolism modulation and lipidomic profiling on oocyte cryopreservation. **European Medical Journal**, v. 4, n. 1, p. 79-87, 2019. DOI: <http://doi.org/10.33590/emj/10310074>.
- FAYEZI, S.; LEROY, J. L. M. R.; GHAFARI NOVIN, M.; DARABI, M. Oleic acid in the modulation of oocyte and preimplantation embryo development. **Zygote**, v. 26, n. 1, p. 1-13, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1017/s0967199417000582>.
- LEROY, J. L. M. R.; VANHOLDER, T.; MATEUSEN, B.; CHRISTOPHE, A.; OPSOMER, G.; KRUIF, A. de; GENICOT, G.; VAN SOOM, A. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. **Reproduction**, v. 130, n. 4, p. 485-495, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1530/rep.1.00735>.
- STURMEY, R. G.; REIS, A.; LEESE, H. J.; MCEVOY, T. G. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, Suppl 3, p. 50-58, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01402.x>.