

METABOLISMO REDOX DAS CÉLULAS DO CUMULUS OOPHORUS HUMANO E SUA RELAÇÃO COM A QUALIDADE OOCITÁRIA

Aluna: Eloisa Toscan Massignam (graduanda em Biomedicina/UFRGS)

Orientador: Prof. Dr. Fabio Klamt (PPG-Bioquímica/UFRGS)

Introdução

As células do *cumulus oophorus* são um subgrupo especializado das células da granulosa que circundam o oócito no folículo antral. Essas células participam diretamente da maturação do oócito e se comunicam com ele por meio de junções comunicantes, existindo grande interação entre o metabolismo dessas células e do oócito propriamente dito. Nesse contexto, as células do *cumulus oophorus* exercem papel fundamental na proteção do oócito contra danos irreversíveis causados pelo estresse oxidativo, que é uma produção exacerbada (além da taxa considerada saudável e importante na maturação oocitária) de espécies reativas de oxigênio pelo folículo. Assim, a análise metabólica das células do *cumulus oophorus* pode refletir diretamente o estado ou os processos metabólicos que estão ocorrendo no oócito, sendo o estudo do perfil redox dessas células promissor no estabelecimento de possíveis biomarcadores de qualidade oocitária; além de serem células de fácil acesso para pesquisa, visto que são descartadas após os procedimentos de reprodução assistida.

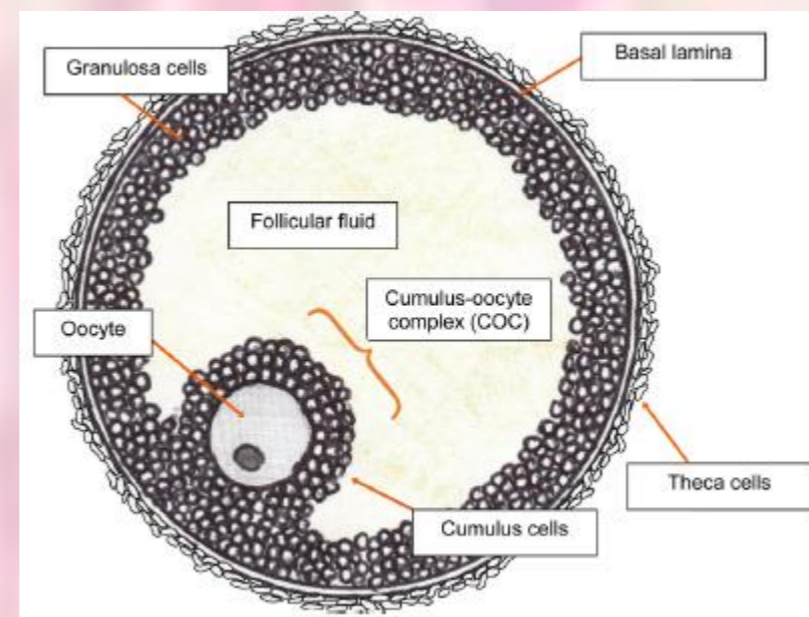


Fig. 1: Representação esquemática do folículo antral

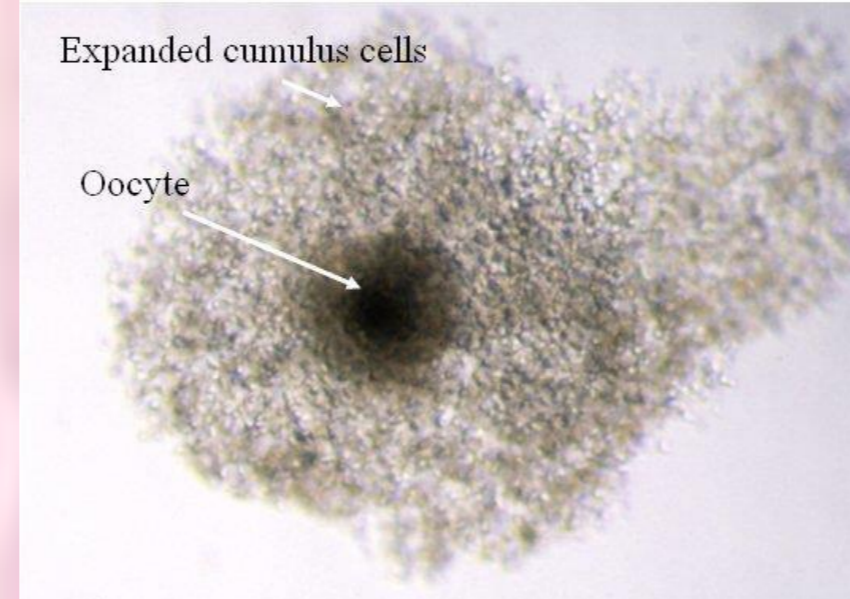


Fig. 2: Complexo cumulus-oócito

Objetivos

Este trabalho propõe uma análise detalhada do perfil redox das células do *cumulus oophorus* provenientes de pacientes submetidas a ciclos de reprodução assistida, comparando estes resultados para posterior associação com as diferenças observadas entre complexos *cumulus*-oócito e oócitos de alta e baixa qualidade.

Materiais e métodos

Neste trabalho, foram utilizadas células do *cumulus oophorus* humano, provenientes de pacientes que foram encaminhadas ao procedimento de ICSI (Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide), em clínicas de reprodução assistida da cidade de Porto Alegre – RS. Após a coleta dos oócitos, os complexos *cumulus*-oócitos foram desnudados a partir da exposição por 30 segundos à hialuronidase para retirar as células mais externas; o restante das células foi retirado mecanicamente. As células do *cumulus oophorus* isoladas foram lavadas uma vez em meio de cultura e outra vez em solução de congelamento (0,25 M sacarose, 1mM EDTA, 10 mM Tris HCl (pH 7,5), 20% glicerol, 0,1% fenilmetilsulfonil); após, foram transferidas a tubos do tipo *Eppendorf* contendo 100 µL de solução de congelamento e congeladas. Posteriormente, no estabelecimento do perfil redox dessas células, foi feita a quantificação de proteínas das amostras pelo método de Bradford e, então, foram realizadas as técnicas redox: tióis reduzidos (método de Ellman) – que reflete a oxidação de proteínas –, TRAP e TAR – que indicam a capacidade antioxidante total não enzimática e a reatividade antioxidante total – e análise da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo redox, como: catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) e glutatona S-transferase (GST). Todas as pacientes participantes do estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido previamente aprovado pelo Comitê de Ética desta Universidade, ante do início dos procedimentos. Os grupos amostrais foram divididos em células do *cumulus oophorus* provenientes de oócitos que tiveram formação de blastocisto ≥50% (alta qualidade) e células do *cumulus oophorus* provenientes de oócitos que tiveram formação de blastocisto <50% (baixa qualidade); cada grupo teve um n entre 5 e 20 pacientes. Os resultados foram apresentados como média +/- erro padrão e analisados pelo método não paramétrico de Mann-Whitney. Associações entre os parâmetros bioquímicos e as variáveis clínicas foram calculadas utilizando-se de coeficiente de Spearman. As diferenças são consideradas significativas se $P < 0.05$.

Resultados

Parâmetros detoxificantes

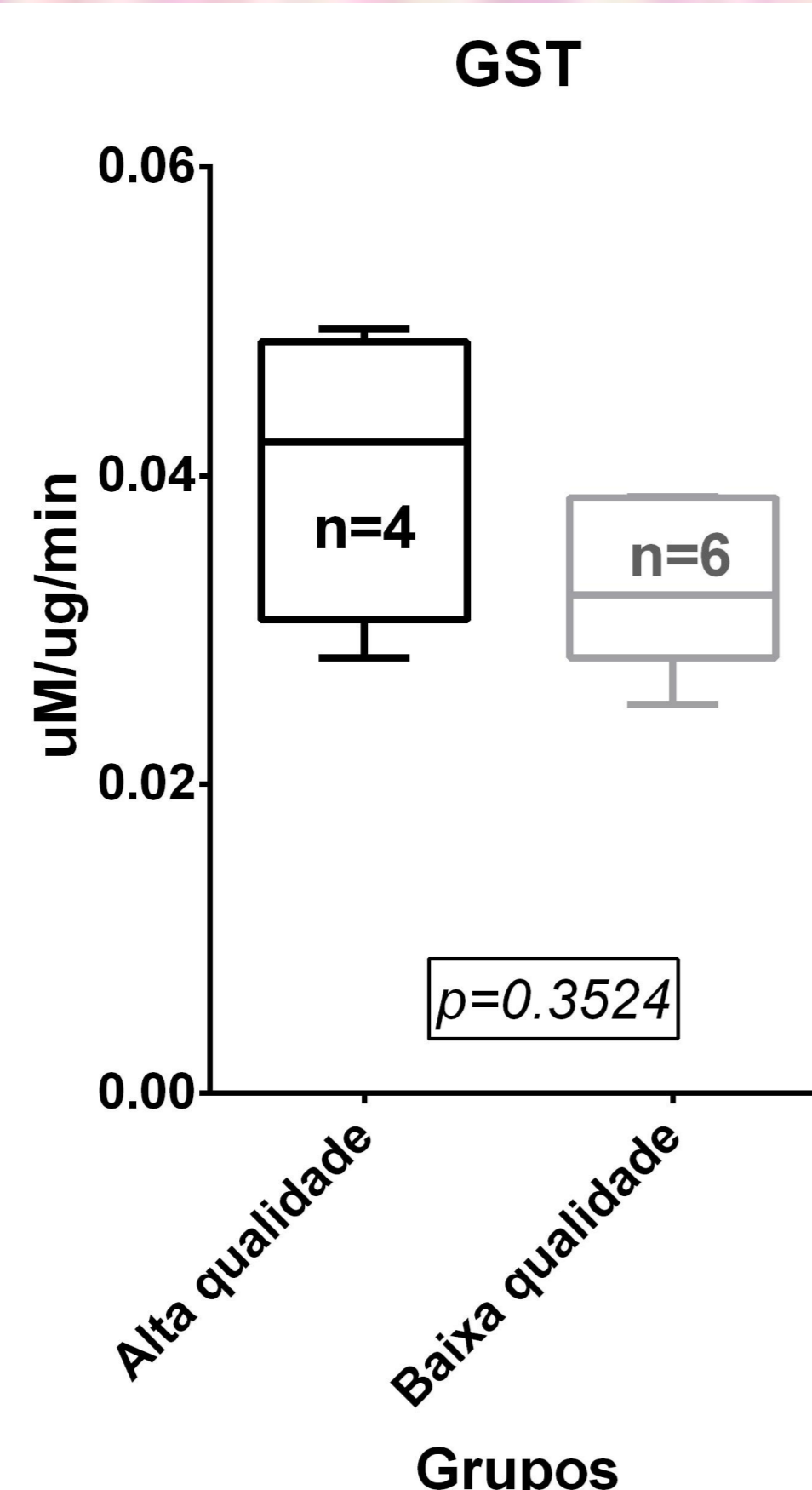


Fig. 3: Atividade de glutatona S-transferase em células do *cumulus oophorus* proveniente de oócitos de baixa e alta qualidade (GST). As células do *cumulus oophorus* foram obtidas e processadas conforme descrito na seção Materiais e métodos; sendo descongeladas no dia do experimento. A quantificação baseia-se na formação do conjugado do reagente CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) com a glutatona reduzida adicionada, reação catalisada pela GST presente na amostra; a taxa de formação desse produto é proporcional à atividade da enzima e é acompanhada a 340 nm. Os resultados foram apresentados como média +/- erro padrão e analisados pelo método não paramétrico de Mann-Whitney. Associações entre os parâmetros bioquímicos e as variáveis clínicas foram calculadas utilizando-se de coeficiente de Spearman. As diferenças são consideradas significativas se $P < 0.05$, representadas pelo símbolo *. Em todos os parâmetros n conforme a figura.

Parâmetros antioxidantes enzimáticos

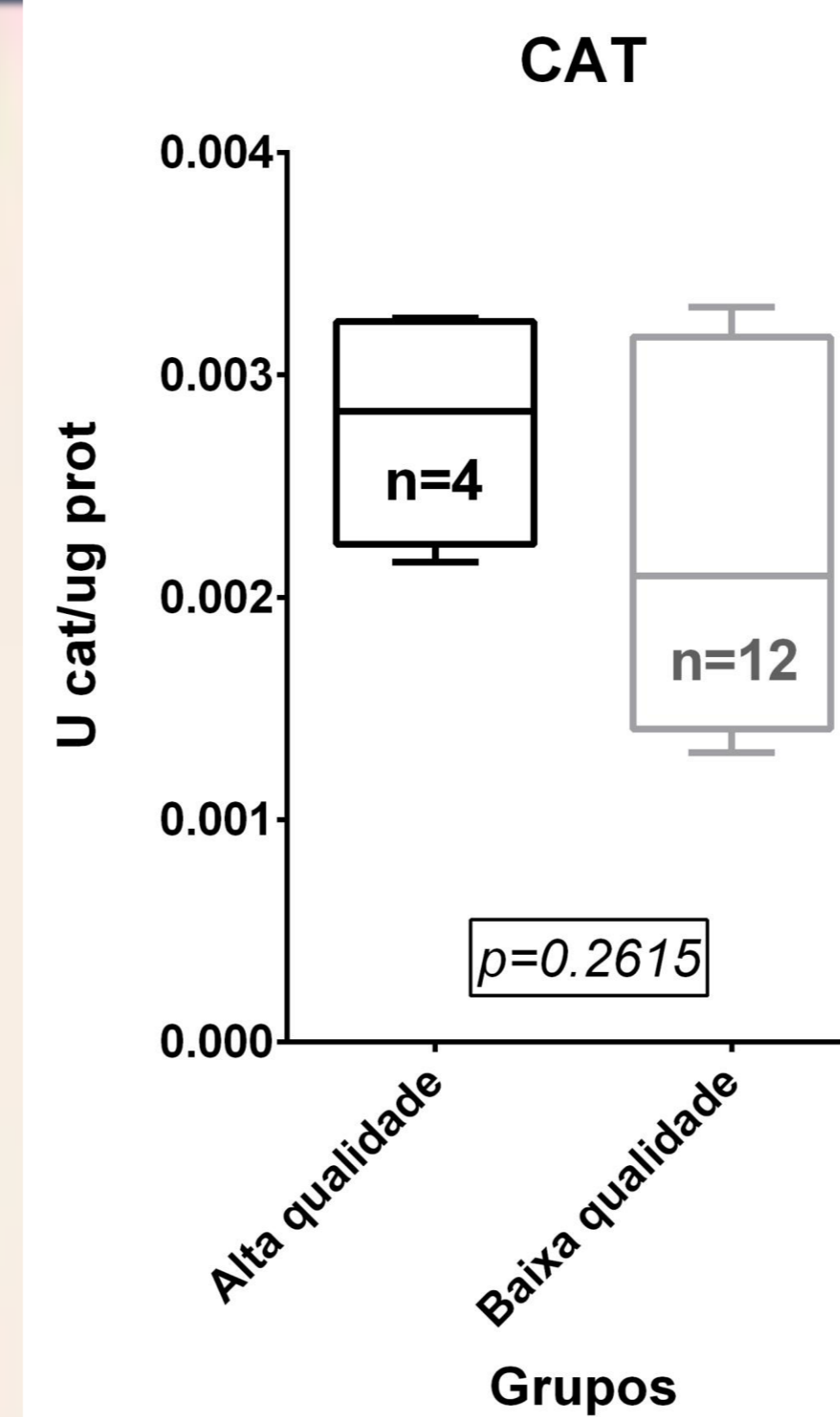


Fig. 4: Atividade de catalase em células do *cumulus oophorus* proveniente de oócitos de baixa e alta qualidade (CAT). As células do *cumulus oophorus* foram obtidas e processadas conforme descrito na seção Materiais e métodos; sendo descongeladas no dia do experimento. A quantificação da atividade da catalase é baseada no decaimento da quantidade de peróxido de hidrogênio adicionado, devido à reação catalisada pela enzima; e detectada espectrofotometricamente a 240 nm e 37 °C. Os resultados foram apresentados como média +/- erro padrão e analisados pelo método não paramétrico de Mann-Whitney. Associações entre os parâmetros bioquímicos e as variáveis clínicas foram calculadas utilizando-se de coeficiente de Spearman. As diferenças são consideradas significativas se $P < 0.05$, representadas pelo símbolo *. Em todos os parâmetros n conforme a figura.

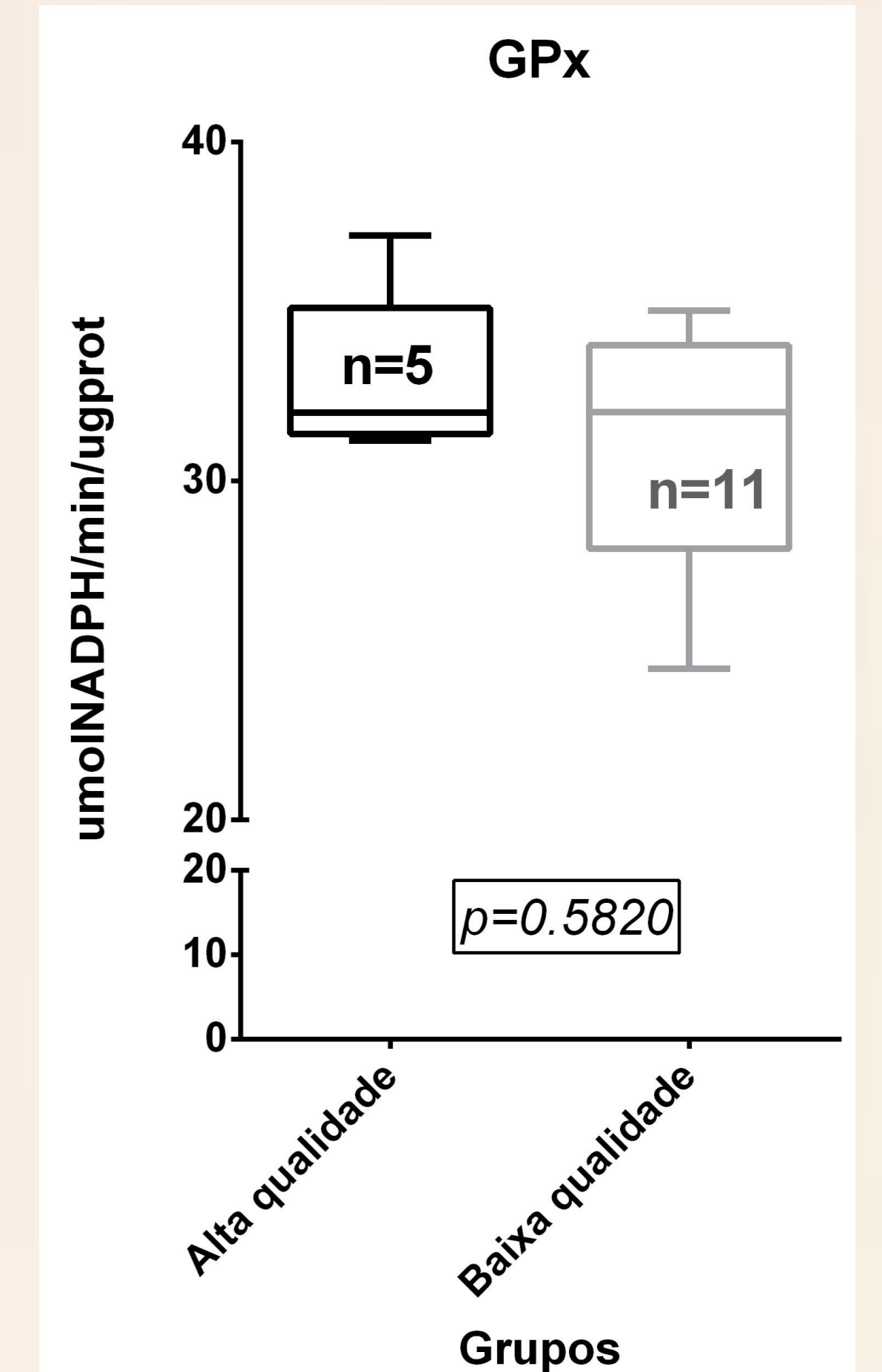


Fig. 5: Atividade de glutatona peroxidase em células do *cumulus oophorus* proveniente de oócitos de baixa e alta qualidade (GPx). As células do *cumulus oophorus* foram obtidas e processadas conforme descrito na seção Materiais e métodos; sendo descongeladas no dia do experimento. A quantificação baseia-se na oxidação do NADPH adicionado; assim a taxa de decaimento da absorção do NADPH (lida espectrofotometricamente a 340 nm) pela reação acoplada da GPx com glutatona redutase adicionada, que reduzem a glutatona oxidada à glutatona reduzida pela oxidação do NADPH, indica a atividade da GPx na amostra. Os resultados foram apresentados como média +/- erro padrão e analisados pelo método não paramétrico de Mann-Whitney. Associações entre os parâmetros bioquímicos e as variáveis clínicas foram calculadas utilizando-se de coeficiente de Spearman. As diferenças são consideradas significativas se $P < 0.05$, representadas pelo símbolo *. Em todos os parâmetros n conforme a figura.

Parâmetros antioxidantes não-enzimáticos

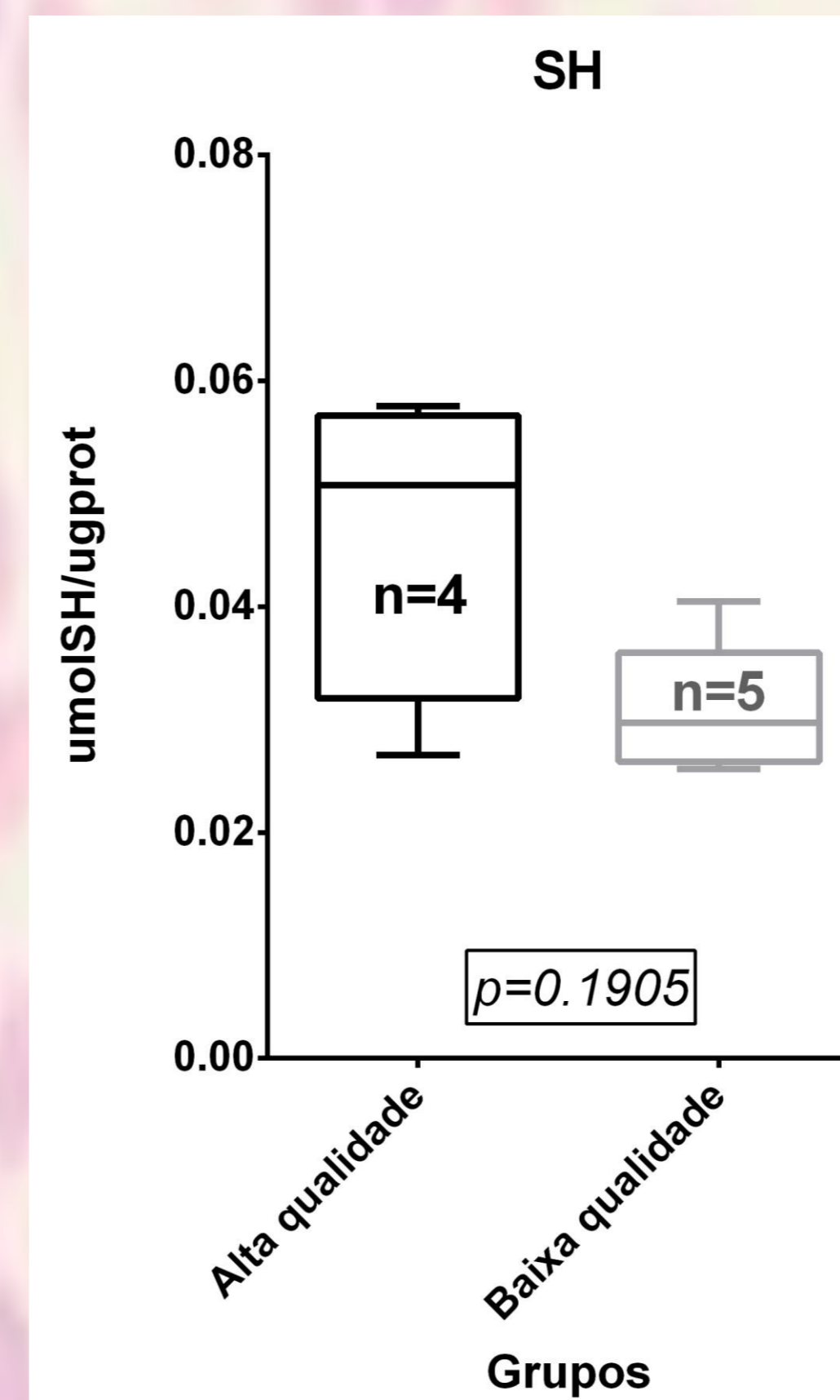


Fig. 6: Grupamentos tióis reduzidos em células do *cumulus oophorus* proveniente de oócitos de baixa e alta qualidade (SH). As células do *cumulus oophorus* foram obtidas e processadas conforme descrito na seção Materiais e métodos; sendo descongeladas no dia do experimento. A quantificação foi feita pelo método de Ellman, em que os grupos SH livres das proteínas reagem com o reagente DTNB (ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzóico), resultando na formação da proteína tionitrofenilada e um ânion - 2-nitro-5-tiobenzoato -, amarelado, que é detectada espectrofotometricamente a 412 nm. Os resultados foram apresentados como média +/- erro padrão e analisados pelo método não paramétrico de Mann-Whitney. Associações entre os parâmetros bioquímicos e as variáveis clínicas foram calculadas utilizando-se de coeficiente de Spearman. As diferenças são consideradas significativas se $P < 0.05$, representadas pelo símbolo *. Em todos os parâmetros n conforme a figura.

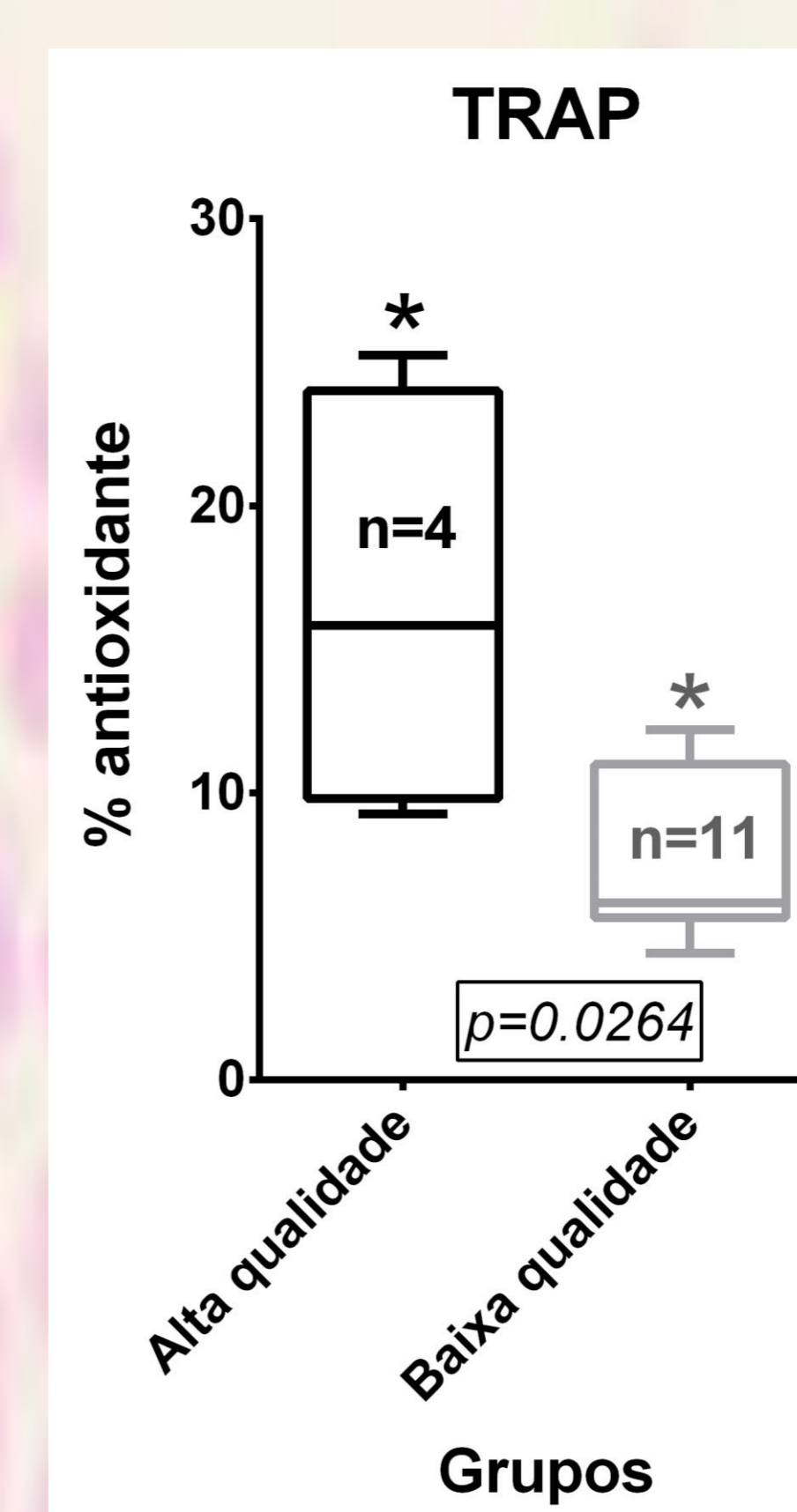


Fig. 7: Potencial reativo antioxidante total em células do *cumulus oophorus* proveniente de oócitos de baixa e alta qualidade (TRAP). As células do *cumulus oophorus* foram obtidas e processadas conforme descrito na seção Materiais e métodos; sendo descongeladas no dia do experimento. A determinação baseia-se na capacidade da amostra em quelar o radical peróxil presente no reagente ABAP (2,2'-azobis-(2-metilpropanoimidina) e medida por quimiluminescência, através do reagente luminol. Os resultados foram apresentados como média +/- erro padrão e analisados pelo método não paramétrico de Mann-Whitney. Associações entre os parâmetros bioquímicos e as variáveis clínicas foram calculadas utilizando-se de coeficiente de Spearman. As diferenças são consideradas significativas se $P < 0.05$, representadas pelo símbolo *. Em todos os parâmetros n conforme a figura.

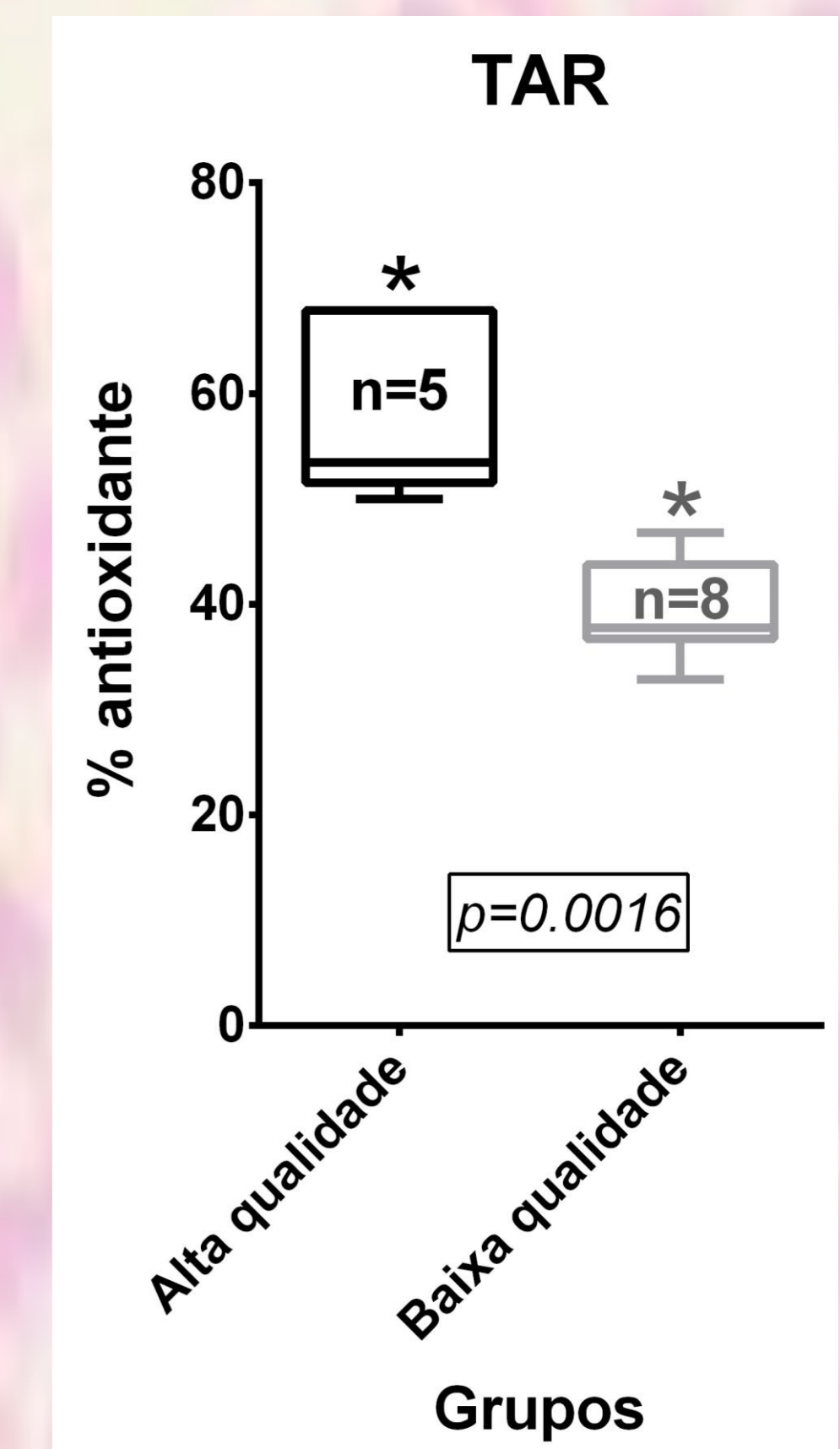


Fig. 8: Reatividade antioxidante total em células do *cumulus oophorus* proveniente de oócitos de baixa e alta qualidade (TAR). As células do *cumulus oophorus* foram obtidas e processadas conforme descrito na seção Materiais e métodos; sendo descongeladas no dia do experimento. A determinação baseia-se na capacidade da amostra em quelar o radical peróxil presente no reagente ABAP (2,2'-azobis-(2-metilpropanoimidina) e medida por quimiluminescência, através do reagente luminol. Os resultados foram apresentados como média +/- erro padrão e analisados pelo método não paramétrico de Mann-Whitney. Associações entre os parâmetros bioquímicos e as variáveis clínicas foram calculadas utilizando-se de coeficiente de Spearman. As diferenças são consideradas significativas se $P < 0.05$, representadas pelo símbolo *. Em todos os parâmetros n conforme a figura.

Discussão e conclusões

Antes do início dos testes propriamente ditos, foi necessária a padronização de todas as técnicas a serem utilizadas neste trabalho para esse tipo celular específico. Posteriormente, então, realizou-se a bateria de testes redox com 48 amostras, distribuídas entre os dois grupos de interesse no estudo. Assim, foram identificadas diferenças significativas entre os parâmetros redox avaliados entre os grupos amostrais. Esses parâmetros antioxidantes e detoxificantes, quando analisados individualmente, não puderam evidenciar diferenças entre células de alta e baixa qualidade; porém, quando averiguados de forma global, demonstraram que o perfil redox é alterado nessas células, havendo uma diminuição das defesas antioxidantes nas células de baixa qualidade. Dessa forma, nossos dados demonstram que a avaliação de parâmetros redox em células do *cumulus oophorus* serve de biomarcador da qualidade oocitária, permitindo que, com uma metodologia eficaz, os oócitos sejam selecionados antes mesmo da fertilização.

Apoio

MCTI/CNPq Universal (476114/2008-0)
MCTI/CNPq CBAB (465113/2014-1)
MCTI/CNPq Universal (445457/2014-7)