

O EXTRATO AQUOSO DE FUMAÇA DE CIGARRO AUMENTA OS NÍVEIS DE EROS EM OÓCITOS BOVINOS MATURADOS *IN VITRO*

¹ Ana Gabrielle da Silva Mendes; ² Solano Dantas Martins; ³ Ana Karen de Carvalho Albuquerque;
⁴ Vânia Marilande Cecatto; ⁵ Valdevane Rocha Araújo.

^{1 e 5} Universidade Federal do Delta do Parnaíba; ^{2,3 e 4} Universidade Estadual do Ceará.

Área temática: Biomedicina e Inovações em Pesquisas

Modalidade: Comunicação Oral Presencial

E-mail dos autores: gabriellemendes@ufdpar.edu.br ¹; solanodantas59@gmail.com ²;
ana.karen@aluno.uece.br ³; vania.ceccatto@uece.br ⁴; valdevane.araujo@ufdpar.edu.br ⁵.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A nicotina é o princípio ativo do tabaco, e estudos indicam que ela pode ocasionar danos ao DNA do oócito em virtude do aumento do estresse oxidativo, o que reduz consideravelmente as taxas de fertilização. **OBJETIVO:** Dessa forma, o presente estudo buscou avaliar o efeito do extrato aquoso de fumaça de cigarro (EAFC), nos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS), durante a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos. **MÉTODOS:** Para a produção do EAFC, foi utilizado um protótipo pré-estabelecido, no qual a fumaça é aspirada e borbulhada em uma solução salina a 0,9%, depositando suas moléculas na solução. Os ovários foram coletados em um abatedouro local e submetidos a slicing. Os oócitos foram recuperados e, em seguida, maturados na ausência (TCM+) ou na presença de diferentes concentrações do extrato (1%, 2,5% e 5%) por 24 horas em uma incubadora a 38,5°C, em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. A mensuração dos níveis de EROS foi realizada utilizando H₂DCFDA. Após a MIV, os oócitos foram desnudados e incubados por 30 minutos, sendo posteriormente avaliados sob microscópio de epifluorescência, e a intensidade de fluorescência foi calculada utilizando o software IMAGE J. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, e para a comparação entre os grupos foi utilizada a análise de variância ANOVA-One Way, seguida do pós-hoc de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando P<0,05. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Como resultados, foi possível observar que todas as concentrações do EAFC aumentaram de forma significativa os níveis de EROS nos oócitos. Este aumento foi dose-dependente, com as maiores concentrações do extrato produzindo um maior estresse oxidativo. Dessa forma, essa alteração contribui para as baixas taxas de MIV observadas em oócitos expostos à nicotina. **CONCLUSÃO:** Em resumo, a utilização do extrato aquoso de fumaça de cigarro durante a MIV de oócitos bovinos exerceu efeito citotóxico, aumentando o estresse oxidativo.

Palavras-chave: Nicotina, Oócito, Citotoxicidade.

1 INTRODUÇÃO

O consumo do tabaco é responsável por aproximadamente 9 milhões de mortes no mundo ao ano. Nessa perspectiva, o tabagismo é a causa de morte mais evitável nos países desenvolvidos (OMS,

2020). Relata-se o alarmante número de um bilhão de fumantes no mundo (Reitsma *et al.*, 2021). Segundo a Pesquisa Nacional de Saúde (2020), no Brasil há uma prevalência de aproximadamente 9,5% de mulheres fumantes em idade fértil. Nesse contexto, é relevante afirmar que o tabagismo é um problema de saúde pública, que gera sérias consequências ao organismo humano, aumentando os índices de mortalidade mundial (Murray, 2020).

Nesse sentido, é importante comentar sobre a nicotina, principal componente do tabaco, uma substância psicoativa que há forte influência sobre alterações na expressão de microRNAs (Khalil 2023). Sendo classificada como uma amina terciária, consistindo em uma piridina e um anel de pirrolidina, sua a forma (S)-nicotina no tabaco (Benowitz 2019). Como um alcaloide, a nicotina age no organismo humano ligando-se aos receptores nicotínicos de acetilcolina, localizados no sistema nervoso central e periférico. Esta ligação provoca a liberação de neurotransmissores como dopamina, que está associada à sensação de prazer e recompensa (Guyton 2017).

Entretanto, o uso contínuo de nicotina causa diversas influências negativas no organismo, incluindo dependência química, aumento da frequência cardíaca, hipertensão, e danos ao sistema respiratório. Além disso, a exposição crônica à nicotina pode afetar negativamente a maturação dos oócitos em diferentes espécies, incluindo bovinos (Teerapong *et al.*, 2019). Assim sendo, há o comprometimento da fertilidade e mutações no DNA dos gametas, alterações na morfologia dos oócitos e fragmentações no citoplasma, prejudicando a maturação e desenvolvimento embrionário, devido ao acúmulo de radicais livres e a formação de EROS (Butts *al.*, 2021).

Dessa forma, o presente estudo buscou avaliar o efeito do extrato aquoso de fumaça de cigarro (EAFC), nos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS), durante a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos.

2 MÉTODO

2.1 Obtenção do extrato aquoso a partir da fumaça de cigarro

Para a coleta do EAFC, utilizou-se 35 mL de solução salina (NaCl a 0,9%) para cada 08 cigarros, sendo conectado um cigarro por vez na extremidade da mangueira do sistema de coleta. No processo de coleta, com uso de um cronômetro, foram reproduzidas utilizando a seringa, aspirações de 35 mL, puncionando lentamente o êmbolo da seringa entre 2 s e 4 s, repetindo após 30 s. A fumaça

aspirada percorreu a mangueira flexível até o interior do tubo, borbulhando na solução. Cada cigarro foi queimado até o comprimento delimitado pelo início do filtro amarelo, sendo realizado entre 8 a 10 punções do êmbolo da seringa para finalizar a queima. O procedimento foi repetido com cada cigarro, observando a existência de possíveis vazamentos no sistema e reparando a vedação caso necessário. Todo procedimento foi realizado em capela de exaustão.

2.2 Maturação *in vitro*

Para a maturação dos complexos cumulus oócitos (CCOs) foi utilizado TCM-199 suplementado com 1% de albumina sérica bovina (BSA), 1 µg/mL de estradiol, 0,5 µg/mL de hormônio folículo estimulante (FSH), 5 µg/mL de hormônio luteinizante (LH) e 0,911 mM de piruvato, sendo denominado de TCM+. O meio foi preparado e incubado previamente por 2h hora antes da utilização. Os oócitos foram maturados na ausência (TCM+) ou na presença de diferentes concentrações do EAFC (1%; 2,5%; 5%), concentrações baseadas em estudos prévios (Kode et al., 2006; Yang et al., 2016). Foram utilizadas gotas de 100 µL de meio de MIV, cobertas com óleo mineral, seguindo uma proporção de 7-10µL de meio para cada oócito, onde foram incubados por 24h a 38,5°C em atmosfera umidificada a 5% de CO₂.

2.3 Produção intracelular de espécies reativas de oxigênio

A produção de EROS pelos oócitos de cada tratamento foi avaliada conforme descrito por Sá et al. (2019), utilizando diacetato de 2',7'- diclorodihidrofluoresceína (H2DCFDA). Os oócitos foram incubados com 1 µL/mL de H2DCFDA por 30 minutos a 38,5°C, seguido de fixação em paraformaldeído (PAF) a 4%. Em média, 10 oócitos por tratamento foram utilizados para cada análise. Os oócitos foram fotografados sob um microscópio de fluorescência (20x, Eclipse 80i, Nikon, Tóquio, Japão), e a intensidade do sinal de fluorescência (pixels) foi quantificada. As imagens obtidas foram analisadas utilizando o software ImageJ, e as médias de intensidade de fluorescência foram calculadas.

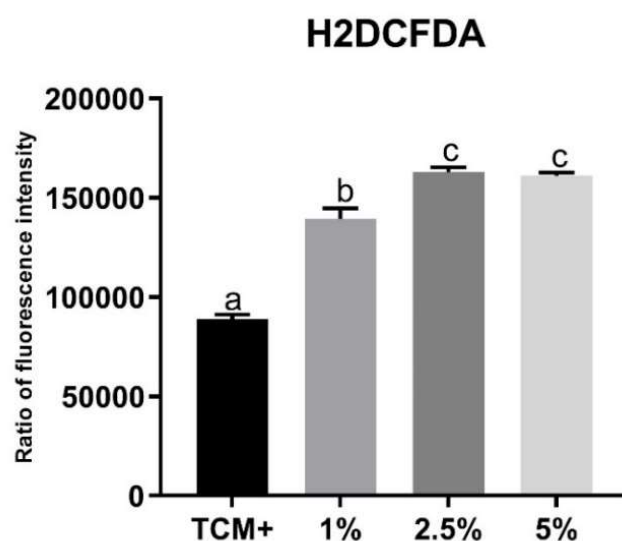
2.4 Análises estatísticas

Os resultados quantitativos das análises foram expressos em média ± erro padrão da média e a distribuição dos dados foi analisada utilizando o teste de normalidade Shapiro Wilk para

homogeneidade. Além do mais, para a comparação entre os grupos foi utilizada a análise de variância ANOVA-One Way, seguida do pós-hoc de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

3 RESULTADOS

Figura 1. - Comparação entre médias independentes de intensidade de fluorescência emitida pelo marcador H2DCFDA entre os grupos de tratamento.



Legenda. Mensuração dos níveis de espécies reativas de oxigênio intracelulares de oócitos após 24 h de maturação *in vitro* na ausência TCM+, ou presença de 1%, 2,5% e 5% do extrato aquoso de fumaça de cigarro. ^{a,b} Letras diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$).

A produção de EROS foi significativamente maior ($P < 0,05$) em todos os tratamentos em comparação ao controle. Observou-se ainda que essa produção foi dependente da concentração, ou seja, as concentrações mais altas do extrato resultaram em maior produção de EROS.

4 DISCUSSÃO

O estudo mostra-se relevante para a fisiologia reprodutiva, visto que o tabagismo tem consequências negativas à fertilidade das mulheres, especialmente na maturação oocitária. Nesse sentido, são conhecidos na literatura os malefícios relacionados a nicotina, tendo características

genotóxicas ao alterar a estrutura do DNA e levar a mutações dos gametas (Agarwal *et al.*, 2022; Teerapong *et al.*, 2019; Tiendrébéogo *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2017).

Diante disso, o EAFC foi prejudicial ao DNA dos oócitos em quaisquer das concentrações utilizadas, demonstrando um efeito tóxico corroborando com Woudenberg *et al.*, (2012) e Dwirahayu e Mashudi (2016). Além do mais, é observado a excessiva produção de EROS, em consequência da exposição ao EAFC através das diferentes concentrações de nicotina, isso se configura como o fator impulsionador. Estudos anteriores têm demonstrado que a exposição à nicotina pode levar a alterações epigenéticas pela descondensação prematura e alterações na metilação do DNA, afetando assim, a expressão de genes importantes para a maturação e desenvolvimento dos oócitos (Teerapong *et al.*, 2019; Tiendrébéogo *et al.*, 2023).

Outrossim, o estresse oxidativo resultante comprometeu a maturação oocitária, assim como confirmam os resultados de Al-Zubaidi *et al.*, 2019 e Zhang *et al.*, 2017. Dessa forma, essa alteração contribui para as baixas taxas de MIV observadas em oócitos expostos à nicotina. No entanto, é importante ressaltar que mais estudos são necessários para compreender completamente os mecanismos subjacentes a esses efeitos e para desenvolver estratégias de mitigação que possam melhorar a qualidade dos oócitos em condições de exposição à nicotina.

Os efeitos patológicos gerados pela exposição à fumaça de cigarro são bem estabelecidos para células epiteliais brônquicas, as quais se diferenciam e implicam no desenvolvimento da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Tulen *et al.*, (2022), sugerem que, além dos componentes nicotínicos, a formação de aldeídos reativos como acetaldeído, acroleína e formaldeído a partir da pirólise e combustão do cigarro, no qual resultam em níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, propõem-se a associação ao aumento dos EROS. Portanto, indica-se a investigação da ação citotóxica dos componentes não nicotínicos presentes no EAFC para estudos futuros na maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos.

5 CONCLUSÃO

Em resumo, a utilização do extrato aquoso de fumaça de cigarro durante a MIV de oócitos bovinos exerceu efeito citotóxico, aumentando o estresse oxidativo. Tais achados são de fundamental importância, pois podem contribuir para elucidar os mecanismos pelos quais os compostos oriundos do tabaco agem sobre as células reprodutivas.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A. et al. Oxidative stress and assisted reproduction: a comprehensive review of its pathophysiological role and strategies for optimizing embryo culture environment. **Antioxidants**, v.11, n.3, p. 477, 2022.
- AL-ZUBAIDI, U. et al. The spatio-temporal dynamics of mitochondrial membrane potential during oocyte maturation. **Mol Hum Reprod.**, v.25, n.11, p. 695-705, Nov 2019.
- BENOWITZ, N. L.; HUKKANEN, J.; JACOB, P. Nicotine Chemistry, Metabolism, Kinetics and Biomarkers. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 192, n. 192, p. 29–60, 2019.
- BUTTS, C.D. et al. Variability of essential and non-essential trace elements in the follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization (IVF). **Ecotoxicol Environ Saf.**, v.209, p.111733, Feb 2021.
- DWIRAHAYU, Y; Mashudi, S. Nicotine effect toward the oocyte level of rats (*Rattus novergicus*), **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v.5, n.6, p.495-499, 2016.
- GUYTON, Arthur C.; HALL, John E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 13. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.
- KHALIL HAJIASGHARZADEH et al. The role of microRNAs in nicotine signaling. v. 22, p. 433–450, 1 jan. 2023.
- MURRAY, C. J. L. et al. Global Burden of 87 Risk Factors in 204 Countries and territories, 1990–2019: a Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet**, v. 396, n. 10258, p. 1223–1249, out. 2020.
- REITSMA, M. B. et al. Spatial, temporal, and demographic patterns in prevalence of smoking tobacco use and attributable disease burden in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet**, v. 397, n. 10292, p. 2337–2360, 19 jun. 2021.
- TEERAPONG, S. et al. Effect of nicotine on gene expression and developmental competence of bovine oocytes. **The Thai Journal of Veterinary Medicine**, v.49, n.1, p.43–48, 2019.
- TIENDRÉBÉOGO, A.J.F. et al. The telomerase activator ta-65 protects from cigarette smoke-induced small airway remodeling in mice through extra-telomeric effects. **Sci Rep.**, v.13, n.1, p.25, Jan 2023.
- TULEN, C.B.M. et al. Smoking-associated exposure of human primary bronchial epithelial cells to aldehydes: impact on molecular mechanisms controlling mitochondrial content and function. **Cells.**, v.11, n.21, p.3481, Nov 2022.
- WHO. World Health Organization. World no tobacco day, 31 May 2017. Geneva, 2017.
- WOUTENBERG, A.B.V. et al. The bovine oocyte in vitro maturation model: A 5 potential tool for reproductive toxicology screening. **Reproductive Toxicology**, v.34, n.6, p. 251–260, 2012.
- ZHANG, D. et al. Mitochondria in oocyte aging: current understanding. **Facts Views Vis. ObGyn.**, v.9, p.29–38, 2017.