

## **ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA E FORMAÇÃO DE ROS DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS**

**HAAS, Cristina<sup>1\*</sup>; LUCAS, Caroline Gomes<sup>2</sup>; LEON, Priscila Marques Moura de<sup>1</sup>; COLLARES, Tiago<sup>1</sup>; DESCHAMPS, João Carlos<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese Animal, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas

<sup>2</sup>Laboratório de Genômica Funcional, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas

\* cristinasangoi@gmail.com

### **1 INTRODUÇÃO**

Novos conhecimentos relacionados à maturação *in vitro* (MIV) são necessários para a produção *in vitro* de embriões (PIV). Dentre os principais desafios que persistem no campo da biologia da reprodução está a compreensão dos processos celulares e moleculares que determinam a qualidade dos oócitos (Gilchrist *et al.*, 2008). Um dos fenômenos a ser melhor compreendido é a aquisição da competência do oócito, ou seja, a capacidade de sofrer maturação, ser fecundado e originar embriões normais, bem como o papel desempenhado pelo ambiente folicular no potencial de desenvolvimento oocitário (Gilchrist e Thompson, 2007). A competência de desenvolvimento de oócitos pode ser determinada por marcadores moleculares, expressos pelas células que os circundam.

O estudo do RNA mensageiro é emergente na embriologia. Os Produtos de genes relacionados a vários processos biológicos, incluindo vias metabólicas, apoptose e estresse oxidativo, precisam ser estudados quanto às diferenças apresentadas na expressão *in vivo* e *in vitro*, e sob diferentes meios de cultivo. A análise da expressão de genes, que estão envolvidos no desenvolvimento inicial embrionário, fornece uma ferramenta importante na evolução de biotecnologias da reprodução assistida (Leon *et al.*, 2011).

Este trabalho tem como objetivo avaliar a expressão de genes relacionados ao processo de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos através da biotécnica molecular de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR), utilizando complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) bovinos não maturados e submetidos à maturação *in vitro*. Os seguintes genes foram avaliados: *myeloid cell leukemia-1* (MCL-1), *Src homology 2 domain containing* (SHC1) e *hyaluronan synthase 2* (HAS2), utilizando o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) como normalizador. Assim como analisar a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), determinando o estresse oxidativo imposto *in vitro*.

### **2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)**

#### *2.1 Coleta e classificação dos oócitos*

Foram utilizados 80 ovários de fêmeas bovinas, coletados em abatedouro de Pelotas/RS e transportando-os em recipiente térmico até o Laboratório de Embriologia Molecular - Biotecnologia/CDTec/UFPEl. Os CCOs foram coletados por aspiração dos folículos entre 2-8mm de diâmetro. Os CCOs foram avaliados em microscópio óptico invertido, selecionando características morfológicas (Loos *et al* 1989).

## 2.2 Maturação *in vitro* (MIV)

Os CCOs selecionados para MIV foram colocados em meio de maturação, composto por meio de cultivo de TCM-199 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 0,5 µg/mL de FSH (Folltropin-V, Bioniche, Beleville, Canadá), 5 µg/mL de LH (Lutropin-V, Bioniche, Beleville, Canadá). As placas contendo os CCOs foram submetidas à MIV em estufa de cultivo celular sob atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> e 37,8°C durante 22 h. O grupo de CCO controle foi analisado logo após a coleta.

## 2.3 Testes de coloração

Para avaliação da taxa de MIV foi utilizada a coloração com Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, EUA), onde oócitos desnudados foram incubadas durante 10 min a 38,7°C em uma solução de 10µg/mL. A viabilidade e integridade de membrana foram avaliadas pelo Kit LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity (Molecular Probes®). A quantidade de espécies reativas de oxigênio foi estimada através da atividade intracelular de ROS, com 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (Sigma-Aldrich, USA) e análise em software Cell^F.

## 2.4 Extração de RNA, confecção do cDNA e qRT-PCR

Ao final do período de incubação, os CCOs foram desnudados por pipetagem em solução de 80UI de Hialuronidase Tipo I-S (Sigma®- Aldrich, Alemanha), e os grupos de oócitos e de células do *cumulus* correspondente tiveram seu RNA extraído. A extração de RNA total foi realizada utilizando Reagente TRIzol® (Invitrogen, USA). O RNA total extraído foi quantificado em espectrofotômetro Nanovue Plus (GE Healthcare, USA), e padronizado para 50ng/µL. A síntese de cDNA (ácido desoxirribonucléico complementar) foi feita através do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit® (Applied Biosystems, USA), segundo instruções do fabricante. O cDNA foi utilizado como *template* na reação de qRT-PCR no Stratagene® Mx3005P™ Real-Time PCR System (Agilent Technologies®, UK) utilizando o Platinum Sybr Green Kit (Invitrogen, USA). Os *primers* utilizados foram desenhados a partir das sequencias obtidas no GeneBank (NCBI) utilizando o software Vector NTI 11 (Invitrogen®, USA), conforme listado na tabela 1.

## 2.5 Análise estatística

No *software* GraphPad Prism 5 foram processados os dados e geradas as figuras de interesse para as análises de Live/Dead e ROS, utilizando o teste de Chi-quadrado com um IC de 95% e  $P \leq 0,05$ . Os dados da expressão gênica foram analisados através do *software* REST 2009 (Pfaffl et al., 2002), a partir dos valores de Ct (*thresholdcycle*) utilizando o gene GAPDH como normalizador.

**Tabela 1.** Genes analisados por qRT-PCR em oócitos bovinos maturados *in vitro* e suas células do *cumulus*.

Gene	Número acesso	Sequencia	TM	Fragmento	Eficiência (%)	Correlação (R <sup>2</sup> )
MCL1	NM_001099206.1	F 5' TGTGGCCAAACACTTGAAGAGT 3' R 5' CCTTACGAGAACATCTGTGATGCTT 3'	60°C	82 pb	84,3%	0.943
SHC1*	NM_001075305.1	F 5' AAGTCAACGGGGACTTCCTT 3' R 5' GGCAAGTGATTGTCCATGTG 3'	60°C	187 pb	91,8%	0.773
HAS2	NM_174079.2	F 5' ATAAATGTGGCAGGCGGAAGAAGG 3' R 5' GTCTTTGTTCAAGTCCCAGCAGCA 3'	60°C	134 pb	98.0%	0.964
GAPDH	NM_001163856.1	F 5' GCC GTA ACT TCT GTG CTG TG 3' R 5' AAT GAA GGG GTC ATT GAT GG 3'	60°C	150 pb	84.0%	0.98

\* Namekawa et al, 2010.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa de recuperação de oócitos foi de 3 CCOs por ovário (242/80). A taxa de maturação foi de 58,33% (80/138). A taxa de viabilidade celular foi de 98,46% (64/65) após a MIV, enquanto que no grupo dos oócitos imaturos foi de 87,18% (34/39) de oócitos viáveis, indicando que a manipulação da MIV não provoca danos de membrana. O nível de estresse oxidativo estimado pela intensidade de fluorescência (pixels) pelo ROS foi diferente ( $p = 0,042$ ) entre os grupos de CCOs maturados *in vitro* e controle (Fig. 1).

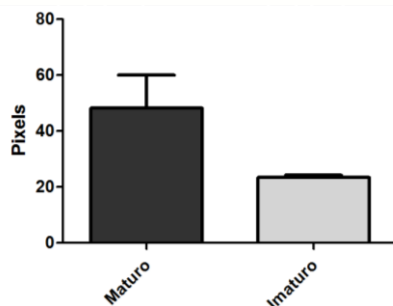
A MIV de oócitos é uma etapa essencial para a produção *in vitro* de embriões, no entanto as condições às quais os oócitos são submetidos podem acarretar em mudanças na expressão gênica dessas células, em resposta às injúrias sofridas. A análise dos resultados da expressão gênica mostrou diferença significativa entre os grupos para a expressão relativa dos genes MCL1, SHC1 e HAS2, conforme observado na Fig. 2. Foi observada uma maior taxa de expressão ( $p=0,266$ ) dos genes HAS2 e SHC1 em CCOs que passaram pelo processo de MIV em comparação aos imaturos. O MCL1 é um membro da família Bcl-2, os quais possuem papel na regulação da apoptose. Neste trabalho foi observado uma menor expressão do MCL1 no grupo de oócitos maturados em relação aos imaturos, assim como em suas células do *cumulus* correspondentes. Entretanto segundo Melka *et al.* (2010) uma maior expressão de MCL1 confere resistência à indução de apoptose.

O resultado obtido para HAS2 foi conforme esperado, pois similarmente ao estudo realizado por Dunning *et al.* (2007) em camundongos, sua expressão foi menor em CCOs imaturos *versus* maturados ( $p=0,264$ ). A expressão de HAS2 é considerada pré-requisito para o início dos efeitos mediados pelo o ácido hialurônico durante a etapa final de maturação, bem como nas interações espermatozoide-oócito (Schoenfelder & Einspanier, 2003). HAS2 foi diferencialmente expresso nas células do *cumulus* de COCs humanos competentes, sugerindo que este gene é um marcador molecular potencial para a competência oocitária (McKenzie *et al.*, 2004).

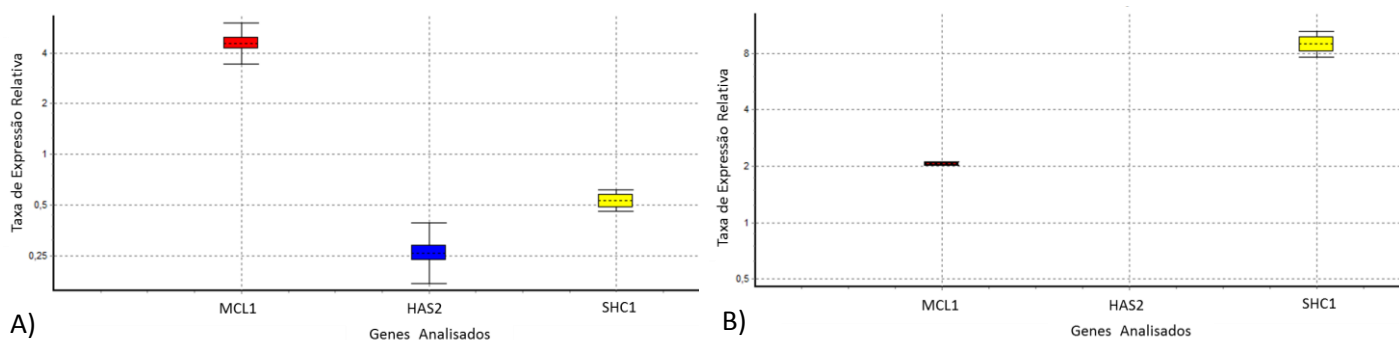
O gene SHC1 também teve uma maior expressão nos oócitos maturados do que nos imaturos ( $p=0,163$ ). Os altos níveis de SHC1 estão associados à ocorrência dano oxidativo intenso e à produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (Namekawa *et al.*, 2010).

### 4 CONCLUSÃO

O processo *in vitro* produz um maior estresse oxidativo nos oócitos maturados, pois a MIV aumenta quantidade de espécies reativas de oxigênio. A manipulação e incubação durante os processos de MIV influenciam na expressão dos transcritos de MCL1, SHC1 e HAS2, possivelmente como um mecanismo compensatório para equilíbrio do estresse celular gerado. Os genes analisados podem ser utilizados como marcadores moleculares para eficiência do processo de MIV em CCOs bovinos, sinalizando progresso no entendimento de eventos moleculares envolvidos na maturação *in vitro* e comunicação do CCO.



**Figura 1.** Intensidade de pixels no teste de quantificação de ROS nos grupos de oócitos maturados *in vitro* e controle.



**Figura 2.** Taxa de expressão gênica relativa observada entre CCOs maturados *in vitro* versus imaturos utilizando o GAPDH como normalizador. A) Taxa de expressão em oócitos após a MIV; B) Taxa de expressão em células do cumulus após a MIV.

## 5 REFERÊNCIAS

- GILCHRIST, R.B. *et al.* Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 119, p. 3811-3821, 2006.
- GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology**, Stoneham, v. 67, p. 6-15, 2007.
- DUNNING K.R. *et al.* Altered composition of the cumulus-oocyte complex matrix during in vitro maturation of oocytes. **Human Reproduction**, Oxford, v. 22, n. 11, p. 2842-2850, 2007.
- LEON, P.M.M., CAMPOS, V.F., KAEFER, C., BEGNINI, K.R., MCBRIDE, A.J.A., DELLAGOSTIN, O.A., SEIXAS, F.K., DESCHAMPS, J.C., COLLARES, T.; Expression of apoptotic genes in immature and *in vitro* matured equine oocytes and cumulus cells, **Zygote**, 2011.
- MCKENZIE, L.J., PANGAS, S.A., CARSON, S.A., KOVANCIC, E., CISNEROS, P., BUSTER, J.E., AMOTO, P. and MATZUK, M.M., Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF, **Hum. Reprod.** **19**, 2869-2874, 2004.
- MELKA, M. G.; RINGS, F.; HOLKER, M.; THOLEN, E.; HAVLICEK, V.; BESENFELDER, U.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Expression of Apoptosis Regulatory Genes and Incidence of Apoptosis in Different Morphological Quality Groups of In Vitro-produced Bovine Pre-implantation Embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, 2010.
- NAMEKAWA, T., SUGIMOTO, M., IKEDA, S. e KUME, S. Effects of Astaxanthin-containing Oil on Development and Stress-related Gene Expression of Bovine Embryos Exposed to Heat Stress. **Reprod Dom Anim** 45, e387-e391, 2010.
- PFÄFFL, Michael W., HORGAN, Graham W. e DEMPFFLE, Leo. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Res.** 30, e36., 2002.
- SCHOENFELDER, M.; EINSPANIER, R. Expression of hyaluronan synthases and corresponding hyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 269-277, 2003.