



## DELINEAMENTO *IN SILICO* E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE GENES APOPTÓTICOS EM OÓCITOS EQUINOS

**LEON, Priscila Marques Moura de; CAMPOS, Vinicius Farias; KAEFER, Cristian; BEGNINI, Karine Rech; COLLARES, Thaís Farias; AMARAL, Marta Gonçalves; DESCAHMPS, João Carlos; COLLARES, Tiago**

Universidade Federal de Pelotas, Centro de Biotecnologia, Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese, Campus Universitário, CEP 96010-900. [primleon@hotmail.com](mailto:primleon@hotmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

A apoptose, ou morte celular programada, é um processo ativo e irreversível, de autodigestão controlada dos constituintes celulares (Li *et al.*, 2009). Tendo sido indicada como marcador de qualidade oocitária e capacidade de desenvolvimento embrionário (Anguita *et al.*, 2009). Os mecanismos de apoptose podem ser ativados por estímulos externos (receptores de membrana) e internos (estresse intracelular), sendo regulados por diferentes famílias de genes (Chang *et al.*, 2002).

Oócitos equinos têm como característica grande quantidade de gotas de lipídeo em associação com mitocôndrias e retículo endoplasmático liso, sugerindo, que sejam mais sensíveis ao estresse oxidativo e apoptose que dos demais mamíferos (Ambruosi *et al.*, 2009). Neste sentido, a análise da expressão gênica de oócitos e de embriões eqüinos é de fundamental importância para avaliar os processos de vitrificação, de maturação *in vitro* (MIV), fertilização e de desenvolvimento embrionário *in vitro*. Possivelmente, a resposta para um maior sucesso na manipulação destas células esteja no conhecimento do DNA desta espécie.

Este artigo teve como objetivo o delineamento *in silico* de *primers* (oligonucleotídeos sintéticos), para genes eqüinos relacionados ao processo de apoptose, através de ferramentas de bioinformática, testando sua eficiência *in vitro* em tecidos reprodutivo de éguas. Possibilitando a seleção dos *primers* que serão utilizados futuramente na análise quantitativa da expressão de genes apoptóticos por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR), na MIV e na vitrificação de oócitos e embriões eqüinos produzidos por injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

### 2. MATERIAL E MÉTODOS

Para construção dos *primers* foi realizada uma busca ao banco de genes (GenBank) das seqüências de interesse de eqüinos, que foram inseridas no programa Vector NTI 11 (Invitrogen®, Carlsbad, USA) para construção dos

oligonucleotídeos para seus mRNAs. Os *primers* obtidos foram selecionados de acordo com suas propriedades termodinâmicas, peso molecular e conteúdo de C/G, alguns foram adaptados de outros mamíferos, quando foi observada alta identidade entre as seqüências gênicas.

Para avaliação da eficiência *in vitro* dos oligonucleotídeos, amostras de ovários, ovidutos e complexos *cumulus oophorus* (CCO) equinos foram obtidas em abatedouro, localizado na cidade de Pelotas/RS. Os CCOs foram coletados por aspiração dos folículos com diâmetro entre 10 a 20 mm, e maturados *in vitro* em fluido folicular (Caillaud *et al.*, 2008), sendo incubados durante 36 h em estufa a 38,7°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Para retirada das células do *cumulus*, foi utilizada solução de 80 UI de hialuronidase Tipo I-S (Sigma® - Aldrich, Alemanha).

Das amostras de ovários, ovidutos, oócitos imaturos e maturados *in vitro*, células do *cumulus* provenientes dos oócitos imaturos e maduros, foram extraído o RNA segundo protocolo proposto por Kang *et al.* (2009), utilizando Reagente TRIzol® (Invitrogen®, USA). O RNA total extraído foi quantificado com o fluorômetro Qubit™ (Invitrogen®, USA), para a posterior confecção do cDNA, seguindo as instruções do manual do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription® (Applied Biosystems, USA).

O cDNA sintetizado foi utilizado como *template* na reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando como gene normalizador a GAPDH (Gliceraldeído-3-Fosfato Dehidrogenase). As reações de PCR (PCR Supermix, Invitrogen®, USA) foram realizadas com 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, a temperatura de anelamento (T<sub>m</sub>) indicada a cada *primer* por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, com desnaturação inicial de 1 minuto e extensão final de 5 minutos. O produto das reações foi visualizado em eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed™ (Biotium Inc., CA).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 mostra os oligonucleotídeos, conteúdo de C/G, a temperatura de anelamento e o tamanho do produto esperado e o amplificado para cada *primer* selecionado. Como os genes avaliados são bastante conservados em mamíferos, foi obtido sucesso na adaptação de alguns *primers* que foram utilizados para oócitos e embriões de outras espécies. Entretanto, não foi obtido sucesso na amplificação dos genes BAC e Hsp70.1, já, os *primers* calpaína e catepsina b (CTSB) mostraram ampliações inespecíficas. Enquanto que, Bax e Bax equino amplificaram um fragmento de tamanho diferente do esperado. Para estes genes serão necessários ajustes na reação de PCR e a utilização de adjuvantes como o dimetilsulfóxido, ou até mesmo nova seleção de oligonucleotídeos.

A etapa de construção dos *primers* e adaptação da PCR são etapas chaves do sucesso da análise da expressão gênica. O desenho de *primers* é dividido em quatro fases: busca e escolha das seqüências de interesse; alinhamento das seqüências e determinação do consenso; seleção da região consenso mais conservada e escolha, e teste dos *primers*. Entre as propriedades principais, podem-se considerar: índice de G/C de 35-60%, diferença de temperatura de 0-3°C entre os *primers*, T<sub>m</sub> (55-65°C), evitando a de formação de dímeros, hairpins e laços (Garcês & Lima, 2004).

O estudo do RNA mensageiro (mRNA) é emergente na embriologia, os produtos de genes relacionados a vários processos biológicos, incluindo vias

metabólicas, apoptose, estresse oxidativo e criotolerância, necessitam ser estudados quanto as diferenças apresentadas na expressão dos genes *in vivo* e *in vitro*, e sob diferentes meios de cultivo (Wrenzycki *et al.*, 2005). A análise da expressão de genes, que estão envolvidos no desenvolvimento inicial embrionário, fornece uma ferramenta importante na evolução de biotecnologias da reprodução assistida.

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos sintéticos, % C/G, temperatura de anelamento (Tm) e tamanho do fragmento amplificado para os primers construídos e selecionados para a análise da expressão de genes eqüinos relacionados ao processo de apoptose.

Primer	Oligonucleotídeos	% C/G	Tm indicada	Tm utilizada	Produto esperado	Fragmento amplificado
p53 (Dhali <i>et al.</i> , 2009)	F 5'-AAAGGATGCCCATGCTACAGAGGA-3'	55,6	59,9 °C	57 °C	82 pb	≅ 100pb
	R 5'-AGTAGACTGGCCCTTCTTGGTCTT-3'	50	60,4 °C			
Bax equino	F 5' -TCTCCCGAGAGGTCTTTTT - 3'	50	60,4 °C	56 °C	151 pb	≅ 400 inespecífico
	R 5'-TCAGCCCATCTTCTCCAGA-3'	50	60,4 °C			
Bax (Opiela <i>et al.</i> , 2008)	F 5'-TCTCCCGAGAGGTCTTTTT-3'	50	60,4 °C	56 °C	151 pb	≅ 500 inespecífico
	R 5'-TGATGGTCCTGATCAACTCG-3'	50	60,4 °C			
Bcl-2 equino	F 5'-GAGACCCCGAGTGCATCAA-3'	60	64,5 °C	56 °C	146 pb	≅ 146 pb
	R 5'-GGGATGTCAGGTCGCTGAAT-3'	55	62,4 °C			
Bcl-2 (Opiela <i>et al.</i> , 2008)	F 5'-GAAACCCCTAGTGCATCAA-3'	50	60,4 °C	56 °C	146 pb	≅ 146 pb
	R 5'-GGGACGTCAGGTCCTGAAT-3'	55	62,4 °C			
GAPDH (Opiela <i>et al.</i> , 2008)	F 5'-GCC GTA ACT TCT GTG CTG TG-3'	55	62,4 °C	61 °C	150 pb	≅ 150 pb
	R 5'-AAT GAA GGG GTC ATT GAT GG-3'	43,5	61 °C			
CTSB	F 5'- CCCAAGCTGCCCCAGAGAG -3'	68,4	66,6 °C	60 °C	133 pb	Fragmentos inespecíficos
	R 5'- CCCAGCAGGAGCCACAGG-3'	72,2	66,7 °C			
Bak (Jeong <i>et al.</i> , 2009)	F 5'-ACCGACCCAGAGATGGTCAC-3'	60	64,5 °C	65 °C	209 pb	≅ 209 pb
	R 5'-CAGTTGATGCCACTCTCGAA-3'	50	60,4 °C			
Bak equino	F 5'-GCCGACCCAGAGATGGACAC-3'	65	66,6 °C	65 °C	209 pb	≅ 850 pb
	R 5'-CAGTTGATGCCGCTCTCAA-3'	50	60,4 °C			
Hsp 70.1 (Camargo <i>et al.</i> , 2007)	F 5'-AACAAGATCACCATCACCACG-3'	45,5	60,8 °C	50 °C	275 pb	Não amplificou
	R 5'-TCC TTC TCC GCC AAG GTG TTG-3'	57,1	64,5 °C			
Hsp 70 (Zhang <i>et al.</i> , 2009)	F 5' -TACAAAGGGGAGACCAAGGC-3'	55	62,4 °C	50 °C	425 pb	≅ 425 pb
	R 5'-TTCCTCTTGAACCTCCAC-3'	50	60,4 °C			
Casp3	F 5'- CAGTGGATTCAAATCCATTA -3'	33,3	54,8 °C	55 °C	115 pb	≅ 115 pb
	R 5'-CCCATTTCAGGATAATCCA-3'	42,1	55,8 °C			
Casp9	F 5'- CCCGACATGATCGAGGACAT -3'	55	62,4 °C	55 °C	137 pb	≅ 137 pb
	R 5'- GTGTCCTGGCCTGTGTCCTC -3'	65	66,6 °C			
Calpaína	F 5'- GGCAGCAGTGAACCTCCAGG -3'	65	66,6 °C	60 °C	169 pb	Fragmentos inespecíficos
	R 5'- GAGATTTGAAGGCACGGAACATG -3'	47,8	62,8 °C			
Stat1	F 5'- CTGTGGTACAACATGCTGGTG -3'	52,4	62,6 °C	60 °C	152 pb	≅ 152 pb
	R 5'- AGCATGTTACAGCTGGTCCA -3'	52,6	60,2 °C			
BAC	F 5'- CCGGGACCTGACGGACTA -3'	66,7	64,5 °C	65 °C	94 pb	Não amplificou
	R 5'- CCTTGATGTCACGCACGATT -3'	50	60,4 °C			

#### 4. CONCLUSÃO

Foi obtido êxito no desenho de *primers* através de análise *in silico* e amplificação *in vitro* para genes eqüinos relacionados ao processo de apoptose, embora, para alguns genes, será necessária nova seleção de *primers*. Estes oligonucleotídeos amplificados com êxito serão utilizados futuramente na análise quantitativa da expressão de genes apoptóticos, por qRT-PCR, na produção *in vitro* de embriões eqüinos.

#### 5. REFERÊNCIAS

AMBRUOSI, B.; LACALANDRA, G.M.; IORGA, T.; DE SANTIS A.I.; MUGNIER, S.; MATARRESE, R.; GOUDET, G.; DELL'AQUILA, M.E. Cytoplasmic lipid droplets and mitochondrial distribution in equine oocytes: Implications on oocyte maturation, fertilization and developmental competence after ICSI. **Theriogenology**, 71, 1093–1104, 2009.

ANGUITA, B.; PARAMIOA, M.T.; MORATÓA, R.; ROMAGUERAA, R.; JIMÉNEZ-MACEDO, A.R.; MOGASB, T.; IZQUIERDOA, D. Effect of the apoptosis rate observed in oocytes and cumulus cells on embryo development in prepubertal goats. **Animal Reproduction Science**, 2009. doi:10.1016/j.anireprosci.2009.01.007

CAILLAUD, M.; DELL'AQUILA, M.E.; DE SANTIS, T.; NICASSIO, M.; MARITATO, F.; LACALANDRA, G.M., GOUDET, G.; GÉRARD, N. *In vitro* equine oocyte maturation in pure follicular fluid plus interleukin-1 and fertilization following ICSI, **Animal Reproduction Science**, 106, 431-439, 2008.

CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; RAMOS, A.A.; SERAPIÃO, R.V.; DE SA, W.F.; FERREIRA, A.M.; GUIMARÃES, M.F.M.; DO VALE FILHO, V.R. Developmental competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos Taurus* dairy cows in a tropical environment. **Theriogenology**, 68, 626–632, 2007.

CHANG, S.H.; Cvetanovic, M.; Harvey, K.J.; Komoriya, A.; Beverly Z. Packard, B.Z.; Ucker, D.S. The effect phase of physiological cell death relies exclusively on the posttranslational activation of resident components. **Experimental Cell Research**, 277, 1, 15-30, 2002.

DHALI, A. *et al.* Effect of droplet vitrification on development competence, actin cytoskeletal integrity and gene expression in *in vitro* cultured mouse embryos. **Theriogenology**, 2009. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.01.011

JEONG, Y.J.; KIM, M.K.; SONG, H.J.; KANG, E.J.; OCK, S.A.; KUMAR, B.M.; BALASUBRAMANIAN, S.; RHO, G.J. Effect of  $\alpha$ -tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. **Cryobiology**, 58, 181–189, 2009.

GARCÉS, S.P.S. & LIMA, A.O.S. **Desenho e Validação *in silico* de Primers Intragenéricos**. In: II Workshop de Tecn. da Inf. aplicada ao Meio Ambiente – CBComp 2004.

KANG, S.; STUART, E.; DENMAN, A.R.; MORRISON, S.; YU, Z.; MCSWEENEY, C.S. An Efficient RNA Extraction Method for Estimating Gut Microbial Diversity by Polymerase Chain Reaction. **Current Microbiology**, 58, 464–471, 2009.

LI, H.J.; LIU, D.J.; CANG, M.; WANG, L.M.; JIN, M.Z.; MA, Y.Z.; SHORGAN, B. Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. **Animal Reproduction Science**, 114, 89-98, 2009.

OPIELA, J.; KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L.; LIPINSKI, D.; SŁOMSKI, R.; BZOWSKA, M.; RYNSKA, B. Interactions among activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in immature oocytes, expression of apoptosis-related genes Bcl-2 and Bax, and developmental competence following IVP in cattle. **Theriogenology**, 69, 546–555, 2008.

ZHANG, L.; WANG, S.H.; DAI, Y.P.; LIA, N. Aberrant gene expression in deceased transgenic cloned calves. **Animal Reproduction Science**, 112, 182–189, 2009.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; LUCAS-HAHN, A.; KORSawe, K.; LEMME, E.; NIEMANN, H. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from *in vitro* procedures and their implications for development. **Reproduction Fertility Development**, 17, 23-35, 2005.