

XVIII

CIC

XI ENPOS
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:
por uma ciência do devir



EXPRESSÃO DOS GENES Bax, Bcl-2 e p53, RELACIONADOS AOS PROCESSOS DE APOPTOSE, DURANTE A VITRIFICAÇÃO DE OÓCITOS EQUÍNOS

BEGNINI, Karine Rech^{*}; KAEFER, Cristian; AGUIAR, Ingrid; LEON, Priscila Marques Moura; CAMPOS, Vinicius; COLLARES, Thaís; AMARAL, Marta; DESCAHMPS, João Carlos; COLLARES, Tiago

Universidade Federal de Pelotas, Centro de Biotecnologia, Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese, Campus Universitário, CEP 96010-900 *karibegnini@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A criopreservação de oócitos é uma das tecnologias com aplicabilidade mais pertinente, pois possibilita a difusão de material genético de animais em larga escala (SQUIRES *et al.*, 2003; CURCIO, 2005). Além disso, favorece o armazenamento de células germinativas por longos períodos com reduzida perda da capacidade de desenvolvimento (NICACIO *et al.*, 2006). As principais técnicas utilizadas para criopreservação de oócitos são o congelamento tradicional e a vitrificação (MELLO *et al.*, 2001).

A vitrificação é uma técnica simples, prática e econômica para a criopreservação de embriões de muitas espécies de animais (MELLO *et al.*, 2001), sendo utilizada principalmente para criopreservar oócitos e blastocistos (ORIEF & SCHULTZE-MOSGAU, 2005). Consiste na submissão do material a altas concentrações de crioprotetores com a finalidade de aumentar a viscosidade dos meios intra e extracelulares, possibilitando sua passagem do estado líquido ao estado vítrio (gel amorfo) sem a formação de cristais de gelo (GREEN, 2005).

A apoptose é definida como uma auto-destruição celular controlada por efeitos fisiológicos (LI *et al.*, 2008). O processo de apoptose ocorre pela transcrição de genes que ativam enzimas específicas responsáveis pelo desencadeamento de um processo de autodigestão controlada por proteases endógenas denominadas caspases (EMANUELLI, 2005).

Membros da família de genes Bcl-2, como Bax e Bcl-2, desempenham papéis chave na regulação da apoptose (LI *et al.*, 2008). Tem-se observado elevados níveis de expressão de Bcl-2 em oócitos considerados morfológicamente saudáveis, e maior expressão de Bax em oócitos desnudos, considerados com menor potencial de maturação e desenvolvimento embrionário (YANG & RAJAMAHENDRAN, 2002).

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo selecionar primers construídos para genes equínos relacionados aos processos de apoptose (Bax, Bcl-2 e p53), testando sua eficiência *in vitro* em oócitos e células do cumulus equinos, para futura utilização no estudo da vitrificação de oócitos equinos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados ovários oriundos de abatedouro, localizado na cidade de Pelotas/RS. Os ovários foram coletados aleatoriamente na linha de abate, não sendo identificadas a idade, a fase do ciclo estral e a condição clínica e nutricional das éguas. O tempo decorrente entre o abate e a coleta foi de aproximadamente 30 minutos, e os ovários foram transportados em recipiente térmico com solução 0,9% de NaCl estéril à 32 – 35°C, até o Laboratório de Embriologia Molecular/UFPel.

Os complexos *cumulus* oócito (CCO) foram aspirados dos folículos com tamanhos entre 10 a 20mm de diâmetro (LEON et al., 2008). O conteúdo folicular foi aspirado com auxílio de seringa de 20ml e agulha 40 x 1.2, e colocado em tubos falcon de 50ml para decantação. O depósito celular formado foi colocado em placa de petri para procura dos CCOs em lupa estereomicroscópica, e mantidos em fluido folicular. Logo após a coleta, os CCOs foram avaliados quanto ao número de camadas e grau de compactação das células do *cumulus*, homogeneidade do citoplasma e integridade da zona pelúcida, sendo selecionados os considerados morfológicamente saudáveis. As células do *cumulus* foram retiradas por pipetagem em solução de 80 UI de hialuronidase tipo IV (Sigma® - Aldrich, Alemanha).

Os oócitos e células do *cumulus* correspondentes foram lavados em solução de PBS, transferidos para microtubos de polipropileno contendo água ultrapura e livre de RNase, e imediatamente congelados a -196°C.

Após descongelamento, foi realizada a extração de RNA das amostras de CCOs para avaliação da expressão dos genes de apoptose p53, Bax e Bcl2, por reação em cadeia da polimerase (PCR). A extração do RNA total das amostras foi feita segundo protocolo com Reagente TRIzol® (Invitrogen® - USA) proposto por Kang *et al.* (2009). O RNA extraído foi submetido à reação de transcriptase reversa para obtenção de cDNA (ácido desoxirribonucléico complementar) seguindo as instruções do manual do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription*® (Applied Biosystems, USA). O cDNA sintetizado foi então utilizado como DNA template na reação de PCR.

Os *primers* específicos para a espécie equina foram construídos através do programa Vector NTI advance 11 (Invitrogen, Brasil). Os *primers* utilizados neste experimento encontram-se listados na tabela 1.

Tabela 1: Sequência dos *primers*, temperatura de anelamento e tamanho do fragmento a ser amplificado.

Primer	Seqüência	TM	Produto esperado
Bax equino	F 5'-TCTCCCCGAGAGGTCTTTTT-3' R 5'-TCAGCCCATCTTCTTCCAGA-3'	56°C	151 pb
Bax (Opiela <i>et al.</i> , 2008)	F 5'-TCTCCCCGAGAGGTCTTTTT-3' R 5'-TGATGGTCCTGATCAACTCG-3'	56°C	151 pb
Bcl-2 equino	F 5'-GAGACCCCCAGTGCCATCAA-3' R 5'-GGGATGTCAGGTCGCTGAAT-3'	56°C	146 pb
Bcl-2 (Opiela <i>et al.</i> , 2008)	F 5'-GAAACCCCTAGTGCCATCAA-3' R 5'-GGGACGTCAGGTCAGTGAAT-3'	56°C	146 pb
p53	F 5'-AACAAGATCACCATCACCAACG-3' R 5'-AAAGGATGCCCATGCTACAGAGGA-3'	50°C	275 pb
(Dhali <i>et al.</i> , 2009)	R 5'-AGTAGACTGGCCCTTCTTGGTCTT-3'	57°C	83 pb

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amplificação *in vitro* de genes relacionados ao processo de apoptose em oócitos equinos vitrificados mostrou-se eficiente nesse experimento, pelo fato destes genes se apresentarem muito conservados em mamíferos. No que diz respeito aos *primers* Bcl-2, Bcl-2 equino e p53, ocorreu amplificação de fragmentos específicos de tamanho correspondente ao esperado na reação de PCR, salientando a eficiência da construção do *primer* BCL-2 equino.

No entanto, para os Bax e Bax eqüino, os fragmentos amplificados pela técnica de PCR foram inespecíficos, com tamanhos aproximados de 500 e 400 pares de base, respectivamente. Esse resultado demonstra que será necessária a ocorrência de ajustes na reação de PCR, como a utilização de temperaturas de anelamento mais específicas e a utilização de adjuvantes como o dimetilsulfóxido, ou até mesmo a seleção e/ou construção de novos *primers* para amplificação destes genes.

4. CONCLUSÃO

Foi obtido êxito na amplificação *in vitro* de genes eqüinos relacionados ao processo de apoptose (p53, Bcl-2 e Bcl-e equino), sendo a construção do *primer* Bcl-2 equino eficiente. Os oligonucleotídeos amplificados com êxito serão utilizados futuramente em análise quantitativa da expressão de genes apoptóticos na vitrificação de oócitos equinos, por meio da técnica de qRT-PCR.

5. REFERÊNCIAS

CURCIO, Bruna da Rosa. **Maturação e Vitrificação de Oócitos Eqüinos Incubados em Meio Contendo Hormônio do Crescimento e Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-I.** 2005. 75f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

EMANUELLI, I.P. **Interação *cumulus* e oócito no processo de morte celular programada durante a produção de embriões bovinos *in vitro*.** 2005. 93 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

GREEN, R. E. **Princípios e Técnicas da Vitrificação de Embriões dos Animais Domésticos.** 2005. 21 f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) -Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica, UNESP, Botucatu.

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. **Curr Microbiol**, v. 58, p. 464–471, 2009.

LEON, P.M.M.; CORCINI, C.D.; SANTOS, E.C.S.; RAMBO, G.; LUCIA Jr., T.; DESCHAMPS, J.C. Vitrification of immature equine oocytes in solid surface. In: I JORNADAS INTERNACIONALES DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGIA EM REPRODUCCIÓN ANIMAL, FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS – UBA. 52, 2008, Buenos Aires /Argentina.

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. **Anim. Reprod. Sci.** (2008), doi:10.1016/j.anireprosci.2008.09.018.

MELLO, M.R.B.; QUEIROZ, V.S.; LIMA, A.S.; TAVARES, L.M.T.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.D.; WHEELER, M.B.; VISINTIN, J.A. Cryopreservation of mouse morulae through different methods: slow-freezing, vitrification and quick-freezing. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, v. 38, n. 4, p. 160-164, 2001.

NICACIO, A.C.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.; CAETANO, H.V.A.; GERGER, R.P.C.; MARQUES, M.G.; MELLO, M.R.P.; MENDES, C.M.; MILAZZOTTO M.P.; OLIVEIRA, V.P.; SIMÕES, R.; YAMADA, C.; VISINTIN, J.A. Criopreservação e desenvolvimento in vitro de embriões bovinos. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, v. 43, n. 1, p. 51-56, 2006.

ORIEF, Y.; SCHULTZE-MOSGAU, A. Vitrification: will it replace the conventional gamete cryopreservation techniques? **Middle East Fertility Society Journal**, v. 10, n. 3, p. 171-184, 2005.

SQUIRES, E. L.; CARNEVALE, E. M.; McCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**, v.59, p.151-170, 2003.

YANG, M.Y., RAJAMAHENDRAN, R. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. **Anim. Reprod. Sci.** v. 70, p. 159–169, 2002.