

EMPREGO DAS LECTINAS, *CANAVALIA ENSIFORMIS* (CON A), *BRASILIENSIS* (CON BR) E *BOLIVIANA* (CON BOL), NO ESTUDO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS

**KOMNINO, Eliza Rossi^{1*}; CAMPOS, Vinicius Farias¹, KAEFER Cristian,
URTIAGA¹, Gabriel Oliveira¹; CAVADA, Benildo Sousa²; COLLARES, Tiago^{1**}**

¹Programa de pós-graduação em Biotecnologia - Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese, Centro de Desenvolvimento Tecnológico CDTEC, UFPEL

²Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará

*elizarossikom@gmail.com , **collares.t@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Lectinas são glicoproteínas que se ligam de maneira específica e reversível a carboidratos, estão amplamente distribuídas na natureza (PEUMANS & VAN DAMME, 1995) e são consideradas moléculas que reconhecem e decifram a informação contida nos oligossacarídeos presentes na superfície celular (RINI, 1995). Essas glicoproteínas, em particular as de origem vegetal, são consideradas importantes ferramentas nos estudos em glicobioquímica e glicobiologia (RUDIGER, 1998).

O efeito da suplementação dos meios de produção *in vitro* de embriões com lectinas vem despertando o interesse de muitos pesquisadores. Em 2009, PANDEY *et al.*, demonstraram aumento nos índices de maturação e melhora na regulação da expressão gênica de oócitos maturados *in vitro*, em presença de lectinas. Da mesma forma, outros autores verificaram aumento na expansão de células do *cumulus*, maiores índices de extrusão do corpúsculo polar, da proporção de oócitos que alcançaram o estágio de metáfase II e ainda, um maior potencial de desenvolvimento do oócito maturado. (PANDEY *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2001; FAGBOHUN & DOWNS, 1990).

Utilizando-se a microscopia de fluorescência, lectinas vegetais marcadas com isotiocianato de fluoresceína (FITC) têm sido utilizadas para examinar as características das glicoproteínas de superfície e estudar a maturação citoplasmática de oócitos cultivados *in vitro* (GOTTARDI, 2009; APPARICIO-FERREIRA, 2006; BARRETO, 2007).

Este trabalho teve por objetivo avaliar os padrões de ligação das lectinas *Canavalia ensiformis* (ConA), *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e *Canavalia boliviana* (ConBol), conjugadas à isotiocianato de fluoresceína (FITC), à oócitos bovinos, durante o período de maturação *in vitro* (MIV).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção das lectinas

As lectinas de *Canavalia ensiformis* (ConA), *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e *Canavalia boliviana* (ConBol), foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (Biomol - LAB), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará-UFC.

2.2. Coleta, seleção e maturação dos oócitos

Ovários provenientes de abatedouro local, foram transportados em recipiente térmico até o Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese,

localizado no CDTec/UFPel. Os complexos *cumulus* oócitos (CCOs) foram puncionados dos folículos ovarianos com tamanhos entre 2-8 mm de diâmetro, sendo aspirados com auxílio de seringa de 20 mL e agulha 40 x 1.2.

O líquido folicular obtido foi colocado em tubo cônico de 50mL e em seguida foi diluído em PBS (phosphate buffer saline) e passado em filtro coletor de embriões (Nutricell, Campinas-SP). O depósito celular obtido foi colocado em placa de petri para procura dos CCOs em estereomicroscópio. Posteriormente, os mesmos 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 apenas os oócitos considerados viáveis. Os grupos de CCOs foram maturados em estufa a 38,5°C, com 5% de CO₂ em ar, durante 24 hrs em gotas contendo 100µL de meio de Maturação (In Vitro Brasil, Mogi Mirim/SP, Brasil) suplementado ou não com lectinas conforme os tratamentos definidos para cada grupo.

A observação e a captura das imagens dos CCOs foram realizadas em intervalos de 8 hrs durante as 24hrs do período de maturação *in vitro* (0, 6, 12, 16 e 24hrs). Para cada um dos intervalos de tempo, foram utilizados grupos de 10 CCOs diferentes. Além dos grupos de lectinas *Canavalia ensiformis* (ConA), *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e *Canavalia boliviana* (ConBol), todas conjugadas à isotiocianato de fluoresceína (FITC), dois grupos controle foram incluídos. O primeiro contendo apenas o meio de Maturação e o segundo contendo apenas o marcador FITC em meio de Maturação. As lectinas foram testadas nas concentrações de 10 e 20 µg/mL.

Para cada avaliação realizada, os CCOs foram retirados da gota de cultivo e lavados em 3 gotas contendo 100µL de meio de Lavagem (In Vitro Brasil, Mogi Mirim/SP, Brasil) para a retirada do excesso de lectinas não ligadas e para evitar background do marcador.

As imagens obtidas em microscópio invertido de fluorescência (Olympus IX 51, Japão); com filtro FITC (excitação 460 a 570nm e emissão 460-610nm) foram analisadas no software Cell[^]F, o qual gerou dados numéricos de intensidade de fluorescência, em pixels. Conjuntos de dados de intensidade dos pixels foram analisados usando ANOVA fatorial seguido por um teste de Tukey para comparações múltiplas. Três fatores foram considerados: composto utilizado (três níveis), concentração de compostos (dois níveis) e tempo de ação do composto (cinco níveis). A significância considerada foi de $P < 0,05$ em todas as análises. Os dados foram expressos como média \pm EPM (erro padrão da média).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

As lectinas ConA e ConBol apresentaram comportamentos similares, ligando-se fortemente à zona pelúcida e com intensidade de fluorescência maior do que a dos demais grupos ($P < 0,05$).

A lectina ConBol possui maior afinidade pelas células do *cumulus* do que as demais lectinas, por isso no decorrer das horas de cultivo, com o aumento da expansão das células do cumulus houve um aumento progressivo da intensidade da fluorescência no grupo tratado com esta lectina, atingindo o maior valor às 24 hrs ($p < 0,05$). O mesmo comportamento não foi observado nos demais grupos.

A lectina ConBr, apesar de possuir 99% de identidade, em sequência de aminoácidos, e a princípio exibir a mesma especificidade para glicose/manose que a lectina ConA, (SANZ-APARICIOA, *et al.*, 1997), apresentou uma intensidade de fluorescência bem menos intensa, do que as lectinas ConA e

ConBol ($P < 0,05$), caracterizando-se por demonstrar um padrão fraco de ligação à zona pelúcida e às células do *cumulus*.

O grupo controle - FITC, apresentou um padrão bem diferente dos grupos tratados com qualquer uma das lectinas, pois não houve fluorescência nem da zona pelúcida e nem das células do *cumulus*. A fluorescência observada ficou restrita apenas à região citoplasmática do oócito e foi menor do que aquela observada nos demais grupos ($P < 0,05$).

Apesar de algumas vezes a intensidade da fluorescência ter sido maior, com a concentração de $20\mu\text{g/mL}$, pode-se dizer que as duas concentrações testadas (10 e $20\mu\text{g/mL}$) mostraram-se eficientes para a marcação da superfície dos CCOs bovinos. A maior intensidade de fluorescência identificada foi às 24 hrs de incubação dos CCOs com $20\mu\text{g/mL}$ da lectina Con Bol.

Os dados de intensidade de fluorescência, em pixels, gerados a partir das imagens analisadas pelo software Cell[^]F, estão dispostas no gráfico 1:

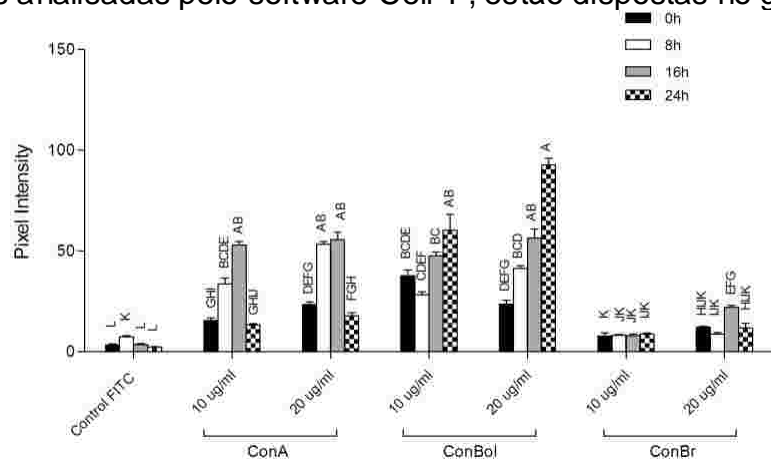


Gráfico 1: Intensidade de fluorescência de CCOs bovinos em contato com as lectinas Con A, Con Bol e Con Br marcadas com FITC em duas concentrações diferentes, ao longo de 24 hrs de maturação *in vitro*.

O alto potencial de ligação das lectinas com os carboidratos presentes na superfície dos oócitos merece atenção especial em estudos futuros, pois estes carboidratos são potenciais receptores de modulação de atividade celular e, além disso, podem mediar a interação com outras células, com nutrientes e drogas utilizadas em cultivo *in vitro*.

4. CONCLUSÕES

Este estudo caracterizou o padrão de ligação das lectinas *Canavalia ensiformis* (ConA) *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e *Canavalia boliviana* (ConBol), conjugadas à isotiocianato de fluoresceína (FITC), à CCOs bovinos, durante o período de maturação *in vitro*. As lectinas ConA e ConBol apresentaram comportamentos similares, ligando-se fortemente à zona pelúcida e com intensidade de fluorescência maior do que a dos demais grupos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APPARICIO-FERREIRA, M. **Efeito da suplementação de hCG, progesterona e estradiol na maturação nuclear e citoplasmática *in vitro* de oócitos de cadelas (*canis familiaris*) obtidos por ovariosalpingo-histerectomia.** 2006, 65 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP.

BARRETTO, L.S.S.; CAIADO CASTRO, V.S.D.; GARCIA, J.M.; MINGOTI, G.Z. Role of roscovitine and IBMX on kinetics of nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes in vitro. **Animal Reproduction Science**, v.99, p.202–207, 2007.

FAGBOHUN, C.F, DOWNS, S.M. Maturation of the mouse oocyte-cumulus cell complex: stimulation by lectins. **Biol Reprod**. Mar; 42(3):413-23, 1990.

GOTTARDI, F. P. **Inibição da maturação nuclear pela butirolactona I durante o transporte de oócitos bovinos destinados a PIV**. 2009, 74 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP.

PANDEY A, GUPTA N, GUPTA SC. Improvement of in vitro oocyte maturation with lectin supplementation and expression analysis of Cx43, GDF-9, FGF-4 and Fibronectin mRNA transcripts in Buffalo (*Bubalus bubalis*). **Journal of Assisted Reproduction Genetic**. Jun; 26(6):365-71., 2009.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.L. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v.109, p.347-352, 1995.

RINI, J.M. Lectin structure. Annual Reviews of **Biophysics and Biomolecular Structure**, v.34, p.551-577, 1995.

RÜDIGER, H. Plant lectins-More than just tools for glycoscientists: Occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. **Acta Anatomica**, v.161, p.130-152, 1998.

SANZ-APARICIOA, J.; HERMOSOA, J.; GRANGEIRO, T.B.; CALVETEA, J.J.; CAVADA, B.S. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. **Febs Letters**, v. 405, 1, p.114-118, 1997.

WANG, S.; PANTER, K.E.; EVANS, R.C.; BUNCH, T.D. The effects of pokeweed mitogen (PWM) and phytohemagglutinin (PHA) on bovine oocyte maturation and embryo development in vitro. **Animal Reproduction Science**. Sep 15;67 (3-4):215-20, 2001.