



EXPRESSÃO DAS CASPASES 3 E 9 EM GAMETAS E TECIDOS REPRODUTIVOS EQUINOS

AGUIAR, Ingrid Amaral Cardoso de; FORTES, Elisa Korte; LEON, Priscila Marques Moura de; KAEFER, Cristian; BEGNINI, Karine; CAMPOS, Vinicius Farias; DESCHAMPS, João Carlos; COLLARES, Tiago

Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas. Campus Universitário, CEP 96010-900. e-mail:manoelaag@hotmail.com.

1. INTRODUÇÃO

Apoptose, termo empregado em 1972 com o propósito de descrever a morte observada no desenvolvimento embrionário (Kerr et al., 1972), atual mente também chamada de morte celular programada, é um processo ativo e irreversível, de autodigestão controlada dos constituintes celulares (Li *et al.*, 2009). Este evento é essencial não apenas para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, mas na remodelagem, senescência celular e eliminação de células que perderam sua função (Parolin & Reason, 2001).

Expressão de genes envolvidos na apoptose têm sido indicada como marcador de qualidade e viabilidade oocitária, e da capacidade de desenvolvimento embrionário (Dhali *et al.*, 2007; Anguita *et al.*, 2009). Durante a apoptose, a célula sofre alterações morfológicas, fruto de eventos bioquímicos complexos, apresentando vias distintas de ativação, por receptores de membrana ou estresse intracelular, ativadas por diferentes famílias de genes (Chang *et al.*, 2002). Sendo necessário um controle preciso sobre as células que sofrerão esse tipo de morte em um organismo ou tecido .

As modificações morfológicas que ocorrem na célula em apoptose são promovidas por uma família de cisteína-proteases denominadas caspases, cujo nome vem de sua função (cysteine-aspartic-acid-proteases). Essas proteases são sintetizadas como precursores inativos, as pró-caspases, e ativadas, em caspases, somente quando a célula recebe algum sinal de morte. Uma vez ativadas atuam em cascata, as caspases iniciadoras, dentre elas a Caspase 9, ativam as caspases efetoras, função da Caspase 3, que por sua vez atua na degradação do ácido desoxirribonucléico (DNA) (Bratton *et al.*, 2001; Coutinho, 2007; Vaculova *et al.*, 2008; Sharifia *et al.*, 2009).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de apoptose em tecidos reprodutivos de éguas, através da expressão gênica das caspase 3 e caspase 9 por reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa. Para futura utilização

destes genes como marcadores de viabilidade celular no cultivo e criopreservação de tecidos reprodutivos de eqüinos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O material biológico foi obtido em abatedouro, localizado na cidade de Pelotas/RS. Foram coletados ovários e ovidutos eqüinos na linha de abate. O tempo decorrente entre o abate e a coleta foi de aproximadamente 30 minutos, sendo o material transportado em recipiente térmico com solução 0,9% de NaCl estéril à 32 – 35 °C, até o laboratório de Embriologia Molecular/UFPel. Os oócitos foram coletados por aspiração dos folículos entre 10 e 20 mm de diâmetro, com auxílio de seringa de 10 ml e agulha 40 x 12 mm. As células do *cumulus* foram retiradas por pipetagem em solução de 80 UI de hialuronidase tipo IV (Sigma® - Aldrich, Alemanha).

Das amostras de ovários, ovidutos, oócitos e células do *cumulus*, foi extraído o RNA segundo protocolo proposto por Kang *et al.* (2009), utilizando Reagente TRIzol® (Invitrogen®, USA). Do RNA total extraído foi confeccionado o cDNA, seguindo as instruções do manual do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription® (Applied Biosystems, USA). O cDNA sintetizado foi utilizado como DNA *template* na reação de cadeia da polimerase (PCR).

Os *primers* utilizados foram: Caspase 3 (F 5'- CAGTGGATTCAAATCCATTA -3' e R 5'-CCCATTTCAGGATAATCCA-3'), com temperatura de anelamento de 55 °C e tamanho esperado do produto amplificado de 115 pares de base; Caspase 9 (F 5'-CCCGACATGATCGAGGACAT -3' e R 5'- GTGTCCTGGCCTGTGTCCTC -3'), com temperatura de anelamento de 55 °C e tamanho esperado do produto amplificado de 137 pares de bases; e como gene controle foi utilizado o GAPDH (Gliceraldeído-3-Fosfato Dehidrogenase) (F 5'-GCC GTA ACT TCT GTG CTG TG-3' e R 5'-AAT GAA GGG GTC ATT GAT GG-3') com temperatura de anelamento de 61 °C e tamanho esperado do produto amplificado de 150 pares de base.

As reações de PCR foram realizadas conforme instrução do PCR Supermix (Invitrogen®, USA), em Termociclador Endurance TC-3000 (Techne Inc., USA). Foram utilizados 40 ciclos, de 94 °C por 30 segundos, a temperatura de anelamento 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) e corrido em cuba de eletroforese (Loccus Biotecnologia, Brasil) e visualizado no transiluminador L-PIX (Loccus Biotecnologia, Brasil) .

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado amplificação da Caspase 3 nas seguintes amostras: ovário, oviduto 2, células do *cumulus* 1 e no grupo de oócitos 1; não sendo observadas amplificações nas amostras: oviduto 1, células do *cumulus* 2, no grupo de oócito 2 e no controle negativo (Imagem 1).

Da caspase 9, foi amplificado produto das seguintes amostras: ovário, oviduto 1, célula do *cumulus* 1 e 2, oócitos 1 e 2; não foi observado amplificação no controle negativo (Imagem 1).

Provavelmente, nas amostras que não foram observadas amplificações para os genes das Caspases 3 e 9, foi devido a baixa concentração de RNA transcrito das caspases.

Para o gene estrutural, GAPDH, utilizado como controle positivo, foi observado amplificação de produto compatível ao tamanho esperado (150pb), em todas as amostras, exceto o controle positivo (Imagem 2).

O processo de apoptose é fundamental na homeostase tissular em organismos multicelulares, observado em tecidos normais, e certamente em tecidos injuriados e em condições patológicas (Parolin & Reason, 2001). As caspases são a classe de cisteíno-proteases com papel essencial na execução da apoptose (Sharifia *et al.*, 2009). Sendo descritas como um evento precoce no processo de morte celular programada, iniciando sua ativação 30 minutos após a indução da apoptose (Coutinho, 2005).

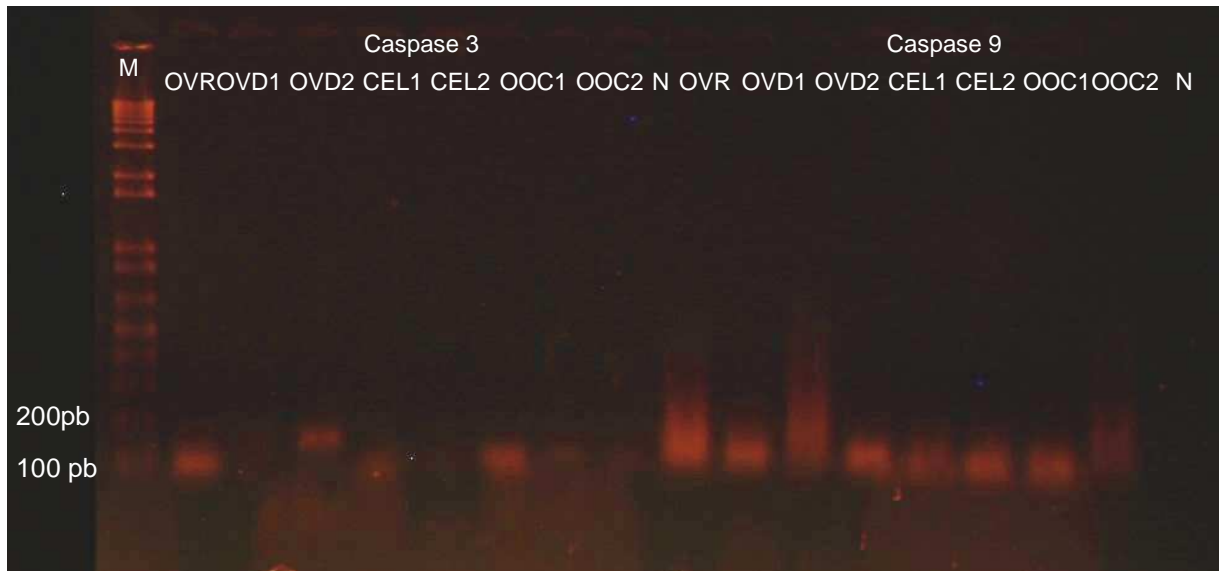


Imagem 1. Gel de agarose 1,5% corado com GelRed dos produtos amplificados para os genes Caspase 3 e Caspase 9. M: marcador molecular de 1Kb, OVR: ovário; OVD: oviduto; CEL: células do *cumulus*; OOC: óocitos; N: controle negativo.

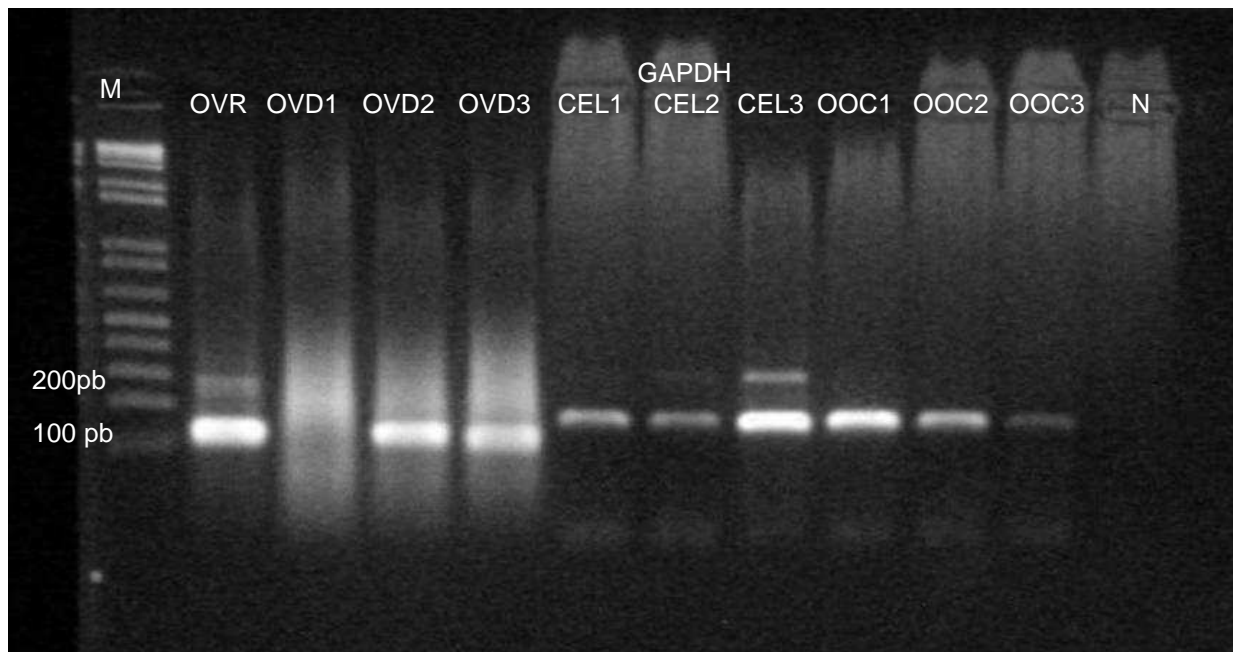


Imagem 2. Gel de agarose 1,5% corado com GelRed dos produtos amplificados para os genes Caspase 3 e Caspase 9. M: marcador molecular de 1Kb, OVR: ovário; OVD: oviduto; CEL: células do *cumulus*; OOC: óocitos; N: controle negativo.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que, a expressão das caspases 3 e 9 em tecidos reprodutivos eqüinos foi obtida com êxito, permitindo a utilização destes *primers* e protocolos para estudos futuros de apoptose no cultivo e criopreservação de tecidos reprodutivos de eqüinos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGUITA, B.; PARAMIO, M.T.; MORATÓ, R.; ROMAGUERA, R.; JIMÉNEZ-MACEDO, A.R.; MOGAS, T.; IZQUIERDO, 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
- BRATTON, B.S. SRINIVASULA, S. M. SUN, X.M. BUTTERWORTH, M. ALNEMRI, E. S. COHEN, G. M. Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. **The EMBO Journal**, v. 20, p. 998-1009, 2001.
- COUTINHO, A.R.S. **Presença da Caspase-3 ativa e das proteínas de reparo de lesões do DNA em embriões suínos ativados parteneticamente com alta ou baixa capacidade de desenvolvimento**. 2005, 186p. Dissertação apresentada na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2005.
- DHALI, A.; ANCHAMPARUTHY, V.M.; BUTLER, S.P.; PEARSON, R.E.; MULLARKY, I.K.; GWAZDAUSKAS, F.C. Gene expression and development of mouse zygotes following droplet vitrification. **Theriogenology**, v. 68, p. 1292–1298, 2007.
- KERR, J.F.R.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implication in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, 26, 4, p. 239-257, 1972.
- 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.
- PARONLIN, M.B.; REASON, I.J. Apoptosis as a mechanism of tissue injury in hepatobiliary diases. **Arquivo Gastroenterologia**, São Paulo, v.38, n.2, p. 38-44, 2001.
- VACULOVA, A. ZHIVOTOVSKY, B. Chapter Eight Caspases: Determination of Their Activities in Apoptotic Cells. **Methods in Enzymology**, v. 442, p. 157-181, 2008.
- SHARIFIA, A.M.; ESLAMI, H.; LARIJANI, B.; DAVOODI, J. Involvement of caspase-8, -9, and -3 in high glucose-induced apoptosis in PC12 cells. **Neuroscience Letters**, v. 459, p. 47–51, 2009.