

XVIII

CIC

XI ENPOS  
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:  
por uma ciência do devir



## **AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE GENES APOPTÓTICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM OÓCITOS E TECIDOS REPRODUTIVOS EQUÍNOS**

**KAEFER, Cristian\*; BEGNINI, Karine; LEON, Priscila Marques Moura; CAMPOS, Vinicius; COLLARES, Thaís; AMARAL, M.G.; DESCAHMPS, João Carlos; COLLARES, Tiago**

*Universidade Federal de Pelotas, Centro de Biotecnologia, Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese, Campus Universitário, CEP 96010-900. \*\*[ckaefer.ib@ufpel.edu.br](mailto:ckaefer.ib@ufpel.edu.br)*

### **1. INTRODUÇÃO**

A maturação é um longo processo durante o qual os oócitos adquirem a capacidade intrínseca para progredir, através de eventos subseqüentes de desenvolvimento, e envolve mecanismos complexos e distintos, embora interligados, de maturação nuclear e citoplasmática (Ferreira *et al.* 2008). As taxas de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos equínos são baixas, quando comparadas as de outras espécies, obtendo-se entre 40 a 60% de oócitos atingindo o estágio de metáfase II (Dell Aquila *et al.*, 1997). Por este motivo, diversos meios de cultivo vêm sendo testados com o objetivo de melhorar a competência oocitária (Carneiro *et al.*, 2001).

Um dos principais fatores que afeta o potencial de desenvolvimento embrionário é a apoptose (Anguita *et al.*, 2009), que é definido como um processo de auto-destruição celular controlada por efeitos fisiológicos, e ocorre pela transcrição de genes e ativação de enzimas específicas que desencadeiam um processo de autodigestão desenvolvido por proteases endógenas denominadas caspases. Esta forma de morte celular ocorre com intuito de remover células lesadas, infectadas, senescentes ou que simplesmente perderam sua função para o organismo, sem alteração do microambiente celular e livre de inflamação (Emanuelli, 2005).

Quanto ao estresse oxidativo e o processo de apoptose celular, recentes evidências demonstram que na produção *in vitro* de embriões bovinos sobre alta tensão de oxigênio prejudica gravemente o desenvolvimento embrionário, estimulando a produção de radicais livres de oxigênio (Guérin *et al.*, 2001) e aumentando o grau de lesões no DNA (Takahashi *et al.*, 2000, Yuan *et al.*, 2003). O gene Hsp 70 desempenha um papel importante na resposta adaptativa protegendo células contra a apoptose induzida pelo estresse oxidativo (Zao *et al.*, 2007).

A análise da expressão de genes é uma ferramenta importante na evolução de biotecnologias da reprodução assistida, genes envolvidos na apoptose podem ser considerados como indicadores da qualidade oocitária e da capacidade de desenvolvimento embrionário. Os membros da família de genes BCL-2 podem ser divididos em moléculas pró-apoptóticas, como a BAX, e antiapoptóticas, como o BCL-2, e tem sido sugerido que as taxas de expressão desses genes podem ser

utilizadas como marcadores de apoptose em oócitos (Yang & Rajamahendran, 2002).

O objetivo principal deste trabalho foi selecionar *primers* construídos para genes eqüinos relacionados aos processos de apoptose (Bax e Bcl-2) e estresse oxidativo (Hsp-70) testando sua eficiência *in vitro* em tecidos reprodutivos de éguas, sendo estes futuramente utilizados na análise quantitativa da expressão de genes apoptóticos e de estresse oxidativo através de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) na MIV de oócitos eqüinos em presença um de substrato antioxidante, a cisteamina.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O material biológico foi obtido em abatedouro, localizado na cidade de Pelotas/RS. Foram coletados ovários e ovidutos 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 complexos cumulus *oophuros* (CCO) 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. Os CCOs coletados foram 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>. Ao fim do período de MIV, 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 imaturos e maturados *in vitro*, células do *cumulus* provenientes dos oócitos imaturos e maduros, foram extraídos seu 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 para os genes Bax, Bcl-2, Hsp-70 e para o gene controle, GAPDH (Gliceraldeído-3-Fosfato Dehidrogenase), foram construídos através do programa Vector NTI advance 11 (Invitrogen, Brasil), sendo listados na tabela 1.

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).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obteve-se sucesso na adequação de alguns *primers*, Hsp70 (Zhang *et al.*, 2009) e GAPDH (Opiela *et al.*, 2008), que são utilizados em oócitos e embriões de outras espécies, para a espécie eqüina, devido os genes avaliados serem bastante conservados em mamíferos. Contudo, não foi obtido sucesso na amplificação do gene Hsp70.1 e os *primers* Bax (Opiela *et al.*, 2008) e Bax eqüino amplificaram fragmentos com tamanhos diferentes 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 *primers*.

Tabela 1 – Sequência dos *primers*, temperatura de anelamento (TM), tamanho do fragmento esperado e tamanho do fragmento amplificado utilizados no estudo.

Primer	Sequência	TM	Produto esperado	Fragmento amplificado
Bax equino	F 5'-TCTCCCCGAGAGGTCTTTTT-3' R 5'-TCAGCCCATCTTCTTCCAGA-3'	56°C	151 pb	≅ 400pb inespecífico
Bax (Opiela <i>et al.</i> , 2008)	F 5'-TCTCCCCGAGAGGTCTTTTT-3' R 5'-TGATGGTCCTGATCAACTCG-3'	56°C	151 bp	≅ 500pb inespecífico
Bcl-2 equino	F 5'-GAGACCCCCAGTGCCATCAA-3' R 5'-GGGATGTCAGGTCGCTGAAT-3'	56°C	146 pb	≅ 146pb
Bcl-2 (Opiela <i>et al.</i> , 2008)	F 5'-GAAACCCCTAGTGCCATCAA-3' R 5'-GGGACGTCAGGTCAGTGAAT-3'	56°C	146 bp	≅ 146pb
Hsp 70.1 (Camargo <i>et al.</i> , 2007)	F 5'-AACAAGATCACCATCACCACG-3' R 5'-TCCTTCTCCGCCAAGGTGTTG-3'	50°C	275 bp	Não amplificou
Hsp 70 (Zhang <i>et al.</i> , 2009)	F 5'-TACAAAGGGGAGACCAAGGC-3' R 5'-TTCCTCTTGAAGTCTCCAC-3'	50°C	425 pb	≅ 425pb
GAPDH (Opiela <i>et al.</i> , 2008)	F 5'-GCCGTAAGTCTGTGCTGTG-3' R 5'-AATGAAGGGTCAATTGATGG-3'	61°C	150 pb	≅ 150pb

#### 4. CONCLUSÃO

Foi obtido êxito na amplificação *in vitro* para genes eqüinos relacionados ao processo de apoptose (Bcl-2 e Bcl-2 eqüino), estresse oxidativo (Hsp-70) e para o gene controle (GAPDH). Para o gene Bax serão necessários ajustes na reação de PCR e a utilização de adjuvantes ou uma nova seleção de *primer*. Estes oligonucleotídeos amplificados com êxito serão utilizados futuramente na análise quantitativa da expressão de genes apoptóticos, por qRT-PCR, na maturação *in vitro* de oócitos eqüinos que serão utilizados na produção *in vitro* de embriões eqüinos.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ANGUITA, B.; PARAMIOA, M.T.; MORATÓA, R.; ROMAGUERRA, R.; JIMÉNEZ-MACEDO, A.R.; MOGASB, 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
- 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.
- CARNEIRO, G.; LORENZO, P.; PIMENTEL, C.; PEGORARO, L.; BERTOLINI, M.; BALL, B.; ANDERSON, G.; AND LIU, I. Influence of Insulin-Like Growth Factor-I and its Interaction with Gonadotropins, Estradiol, and Fetal Calf Serum on In Vitro Maturation and Parthenogenic Development in Equine Oocytes. **Biology of Reproduction**, n. 65, p. 899–905, 2001.
- DELL'AQUILA, M. E.; CHOI, Y. S.; MINOIA, P.; TRAINA, V.; FUSCO, S.; LACALANDRA, G. M.; MARITATO, F. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus conventional IVF on

abattoir-derived and *in vitro*-matures equine oocytes. **Theriogenology**, 47, p. 1139-1156, 1997.

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.

FERREIRA, E.M.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R.; MEIRELLES, F.V.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A.A.S. Cytoplasmatic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, 71, 836–848, 2009.

GUÉRIN, P.; MOUATASSIM, S.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the preimplantation embryos and 1st surroundings. **Human Reproduction Update**, n. 7, p. 175–189, 2001.

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.

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.

TAKAHASHI, M.; KEICHO, K.; TAKAHASHI, H.; OGAWA, H.; SCHULTZ, R.M.; OKANO, A. Effect of oxidative stress on development and DNA damage in *in vitro* cultured bovine embryos by comet assay. **Theriogenology**, n. 54, p. 137–145, 2000.

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

YUAN, Y.Q.; VAN SOOM, A.; COOPMAN, F.O.; MINTIENS, K.; BOERJAN, M.L.; VAN ZEVEREN, A.; DE KRUIF, A.; PEELMAN, L.J. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured *in vitro*. **Theriogenology**, n. 59, p. 1585–1596. 2003.

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.

ZAO, Y.; WANG, W.; QIAN, L. Hsp70 may protect cardiomyocytes from stress-induced injury by inhibiting Fas-mediated apoptosis. **Cell Stress Chaperones**, n. 12, p. 83–95, 2007.