

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE INIBIDOR APOPTÓTICO *SURVIVIN* DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS EQUINOS

OLIVEIRA, Ruan*, BJÖRKNESJÖ, Stéphanie Caruccio, LEON, Priscila Marques Moura de, CAMPOS, Vinícius Farias, DESCHAMPS, João Carlos, SEIXAS, Fabiana Kömmling,

COLLARES, Tiago

Grupo de Oncologia Celular e Molecular, Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Universidade Federal de Pelotas *ruanoliveira@hotmail.com.br

1. INTRODUÇÃO

A importância econômica e científica do equino está em ascensão nos últimos anos. O aumento da popularidade dos esportes equestres tem proporcionado o constante crescimento da equinocultura. Além disso, inúmeras semelhanças fisiológicas e genômicas entre o equino e o Homem indicam o potencial destes animais como modelo experimental (Wade *et al.*, 2009). Assim, é oportuno o aperfeiçoamento de técnicas reprodutivas que possibilitem não apenas o aumento da produção, mas também a seleção e melhoramento genético destes animais, facilitando sua comercialização nacional e internacional.

A maturação *in vitro* de oócitos equinos permite a produção comercial de embriões, através das técnicas de Fertilização *in vitro* (FIV) e Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide (ICSI). Entretanto, o alto conteúdo lipídico destes oócitos aumenta sua suscetibilidade ao estresse oxidativo promovido pelas técnicas de maturação, culminando muitas vezes na ativação de rotas de sinalização do processo de morte celular programada ou apoptose (Tremoleda, 2003).

A apoptose é o processo responsável pela manutenção da homeostase e regulação da fisiologia celular (Parolin & Reason, 2001). Neste processo, há o envolvimento de muitos genes e seus produtos protéicos, os quais atuam inibindo ou estimulando sua ocorrência. Proteínas pró-apoptóticas, tais como Bax e Bad, promovem a ativação de caspases, moléculas efetoras da morte celular. Em contrapartida, proteínas anti-apoptóticas, dentre as quais se destacam Bcl-2, Bcl-xl e Survivin, suprimem a ativação de caspases, promovendo a sobrevivência celular (Dhali *et al.*, 2007; Anguita *et al.*, 2009)..

A proteína Survivin é uma molécula de 16.3 kD e 142 aminoácidos que atua no bloqueio da ativação da procaspase-9, prevenindo a consequente formação do apoptossomo (Altieri, 2010). Assim, por executar função crucial na inibição do processo apoptótico, o gene Survivin tornou-se alvo deste estudo, o qual objetivou avaliar suas taxas de expressão durante a maturação *in vitro* de oócitos equinos, células de comportamento peculiar quanto ao processo apoptótico.

2. METODOLOGIA

Os ovários equinos foram obtidos em abatedouro local e transportados em recipiente térmico até o Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese (UFPel). Através de punção dos folículos ovarianos com tamanho entre 10 e 20 mm, aspiraram-se os complexos *cumulus* oócito (CCOs), os quais foram analisados em

microscópio óptico invertido e classificados, de acordo com sua morfologia, em dois grupos - G1 e G2. Os oócitos com *cumulus* compacto e com mais de três camadas de células, citoplasma homogêneo e zona pelúcida íntegra foram classificados como morfologicamente saudáveis e dispostos no grupo G1. Já aqueles com *cumulus* expandido ou com menos de três camadas celulares, zona pelúcida fragmentada e citoplasma heterogêneo foram designados como morfologicamente menos viáveis, sendo dispostos no grupo G2.

Oócitos de ambos os grupos foram colocados em 10µl do reagente TRIzol (Invitrogen, USA) e vitrificados para posterior análise da expressão gênica sem a realização de maturação *in vitro*. Outros dois conjuntos de oócitos, pertencentes aos grupos descritos acima, foram maturados em líquido folicular, incubadas por 36 h em estufa a 38,7 °C e 5% de CO₂ (Hinrichset *al.*, 2005). Após a maturação, também se executou o protocolo de vitrificação para possibilitar análises posteriores.

Por conseguinte, foi realizada a desvitrificação dos oócitos para posterior extração de RNA. O procedimento de extração de RNA foi realizado com a adição de TRIzol seguida de sucessivas lavagens para a eliminação dos demais componentes celulares, conforme as instruções do fabricante. As amostras tiveram seu RNA quantificado através do sistema Qubit™ (Invitrogen, USA) e, então, tiveram suas concentrações de RNA padronizadas. Após esta padronização, realizou-se a síntese de DNA complementar (cDNA) pela reação de transcriptase reversa, utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription® (Applied Biosystems, USA).

O cDNA obtido foi utilizado como molde para a execução da Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Para a realização desta técnica, utilizou-se o kit SYBR Green Platinum (Invitrogen, USA) e iniciadores (*primers*) para o gene Survivin e para o controle, o gene GAPDH, codificante para a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Tabela 1). A qRT-PCR consistiu na desnaturação inicial do cDNA em 94°C por 5 minutos; 45 ciclos de 94°C por 30 segundos, 57°C por 1 minuto e 72°C por 30 segundos; 72°C por 5 minutos. Por fim, realizou-se a dissociação das moléculas de cDNA, através de leituras consecutivas da fluorescência emitida a cada acréscimo de 1°C.

Tabela 1 - Primers utilizados no estudo

Primer	Sequência	Fragmento amplificado
Survivin	F 5'-TTCATCCACTGTCCCACTGA-3'	98 pb
	R 5'-GTTCTCTATGGGGTCGTCA-3'	
GAPDH	F 5'-GCCGTAACCTTCTGTGCTGTG-3'	150 pb
	R 5'-AATGAAGGGGTCATTGATGG-3'	

Os resultados fornecidos pela reação descrita acima foram submetidos a análises estatísticas, visando comparar as possíveis alterações na expressão do gene analisado durante o processo de maturação *in vitro*. Para a realização destas análises, utilizaram-se os softwares REST © (*Relative Expression Software Tool*) e GraphPad Prism © 5.01.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Através da realização da técnica de qRT-PCR, foram construídas duas curvas para análise dos dados obtidos. A curva de amplificação (Figura 1) fornece dados relativos à fluorescência emitida pelas amostras a cada ciclo da reação. Assim, amostras relativas à oócitos com maior expressão do gene Survivin têm seu cDNA

amplificado previamente àquelas de menor expressão gênica. A curva de dissociação (Figura 2) informa a fluorescência emitida após cada acréscimo de temperatura em 1°C. Ao passo que as moléculas de DNA desnaturam, notam-se alterações na fluorescência emitida, constituindo picos no gráfico. Na análise realizada, observou-se apenas a formação de um pico, indicando a ausência de dímeros ou amplicons inespecíficos.

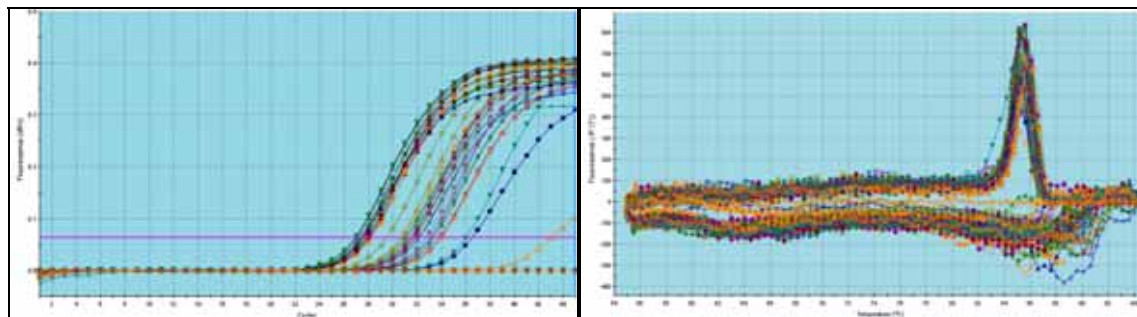


Figura 1 - Curva de Amplificação do Gene Survivin

Figura 2 - Curva de Dissociação do Gene Survivin

A curva de amplificação permite identificar com precisão o ciclo que a amostra emite fluorescência superior aos valores limiares, aqueles desconsiderados pela análise. Neste ponto de emissão, estabelecem-se os valores de *Ct* (*Cycle threshold*), os quais foram utilizados na realização de análises comparativas da expressão gênica entre oócitos imaturos e maturados *in vitro*. Através do software REST, foram analisadas os dados fornecidos pela reação de qRT-PCR. Ao nível de 5% de significância, não foram encontradas diferenças significativas entre a expressão do gene Survivin em oócitos imaturos e maturados *in vitro*, com probabilidade de 0,974. Quando confrontados sob os mesmos critérios acima, os grupos G1 e G2 também não apresentaram diferenças significativas de expressão, estando estes imaturos ($P = 0,749$) ou maturados ($P = 0,262$).

Os resultados obtidos pelo software REST foram confirmados através da construção de gráficos de expressão gênica relativa, por intermédio do software GraphPad Prism © 5.01. Novamente, verificou-se a ausência de diferenças significativas entre os oócitos imaturos e maturados *in vitro*, com 5% de significância. O gráfico construído (Figura 3) possibilita não apenas a identificação da expressão média do gene Survivin antes e após o processo de maturação *in vitro*, mas também fornece o desvio padrão de cada conjunto de oócitos testado.

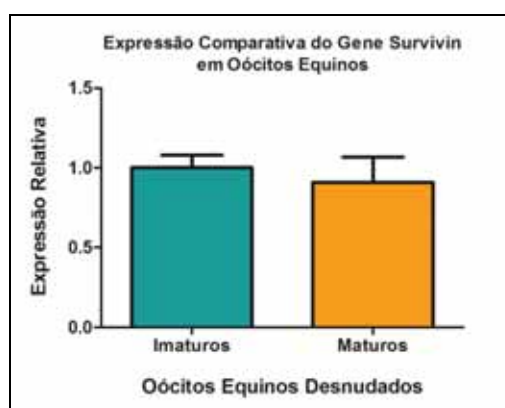


Figura 3 - Expressão Comparativa do Gene Survivin em Oócitos Equinos

4. CONCLUSÕES

Com a realização deste trabalho, avaliaram-se as diferenças entre a expressão do gene Survivin, inibidor do processo apoptótico, em oócitos equinos imaturos e maturados *in vitro*. Os resultados obtidos permitem inferir que o processo de maturação *in vitro* não interfere de modo significativo na expressão do gene Survivin. Ainda assim, considerando o grande número de moléculas sinalizadoras envolvidas em tal processo celular, é notável a possibilidade de mudanças na expressão de inúmeros outros genes atuantes nesta rota, os quais necessitam ser mais bem analisados em estudos posteriores.

5. REFERÊNCIAS

- ALTIERI, Dario. Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms. **Biochemical Journal**, v.430, n. 2, p. 199 – 205, 2010.
- ANGUITA, Begoña, PARAMIO, Maria Teresa, MORATÓ, Roser, ROMAGUERA, Rita, JIMÉNEZ-MACEDO, Ana Raquel, MOGAS, Teresa, IZQUIERDO, Dolors. Effect of the apoptosis rate observed in oocytes and cumulus cells on embryo development in prepubertal goats. **Animal Reproduction Science**, v. 116, n. 1, p. 95 - 106, 2009.
- DHALI, Arindam, ANCHAMPARUTHY, Vahida, BUTLER, Sam, PEARSON, Robert, MULLARKY, Isis, GWAZDAUSKAS, Frank. Gene expression and development of mouse zygotes following droplet vitrification. **Theriogenology**, v. 68, n. 9, p. 1292–1298, 2007.
- HINRICHS, Katrin, CHOI, Young Hae, WALCKENAER, Bernard., VARNER, Dickson, HARTMAN, David. In vitro-produced equine embryos: Production of foals after transfer, assessment by differential staining and effect of medium calcium concentrations during culture. **Theriogenology**, v. 68, p. 521–529, 2007.
- PARONLIN, Mônica, REASON, Iara. Apoptosis as a mechanism of tissue injury in hepatobiliary diases. **Arquivo de Gastroenterologia**, v. 38, n. 2, p. 38 - 44, 2001.
- TREMOLEDA, Jordi, STOUT, Tom, LAGUTINA, Irina, LAZZARI, Giovanna, BEVERS, Mart, COLENBRANDER, Ben, GALLI, Cesare. Effects of In Vitro Production on Horse Embryo Morphology, Cytoskeletal Characteristics, and Blastocyst Capsule Formation. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 6, p. 1895 – 1906, 2003.
- WADE, Claire, GIULOTTO, Elena, SIGURDSSON, Snaevar *et al.* Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. **Science**, v. 326, n. 5954, p. 865 – 867, 2009.