

EFEITO DA PON 1 DURANTE A MATURAÇÃO OOCITÁRIA SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO ESTRESSE OXIDATIVO DE EMBRIÕES BOVINOS

JANAÍNA FADRIQUE DA SILVA¹; JOAO ALVEIRO ALVARADO RINCÓN²;
AUGUSTO SCHNEIDER³; FELIPE TERRES DE CAMPOS²; ELISÂNGELA
MIRAPALHETA MADEIRA²; LÍGIA MARGARETH CANTARELLI PEGORARO⁴

¹Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA - Bolsista Cnpq-
nanafadrique@yahoo.com.br

²Programa de Pós-graduação em Veterinária – UFPel- RS, Brasil- joaoal13@hotmail.com;
felipe.t.campos@hotmail.com;elisangelamadeira@yahoo.com.br

³Faculdade de Nutrição – UFPel - RS, Brasil – augustoschneider@gmail.com

⁴Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, Brasil - ligia.pegoraro@embrapa.br

1. INTRODUÇÃO

A paraoxonase-1 (PON1) é uma enzima antioxidante sintetizada no fígado e que circula no plasma ligada exclusivamente à lipoproteína de alta densidade (HDL) (DRAGANOV et al., 2000). Possui propriedades anti-inflamatória e antiaterogênica, prevenindo o aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs), hidrolisando os peróxidos lipídicos e diminuindo assim a suscetibilidade do HDL à peroxidação (SCHRADER; RIMBACH, 2011). Na população humana a sua atividade reduzida está associada a inúmeros eventos fisiopatológicos como aterosclerose, diabetes, câncer, distúrbios neurológicos, entre outros (LAWLOR et al., 2007; PRÉCOURT et al., 2011).

Em bovinos, a PON1 é caracterizada principalmente como uma proteína de fase aguda negativa, reduzindo seus níveis circulantes em resposta às citocinas liberadas durante processos inflamatórios (BIONAZ et al., 2007). O HDL é a única lipoproteína presente no fluido folicular, devido à permeabilidade da membrana basal do folículo ovariano (JASPARD et al., 1996), apresentando uma correlação positiva entre os níveis séricos e intrafoliculares tanto de HDL quanto de PON1 (SCHNEIDER et al., 2013). A atividade ovariana fisiológica resulta na produção de EROs, envolvidos em processos como a maturação oocitária, esteroidogênese e nas funções do corpo lúteo. Estudos *in vivo* sugerem que a ação da PON1 está relacionada com sua capacidade antioxidante nas membranas celulares, o que pode melhorar a competência do oócito, e, conseqüente desenvolvimento embrionário inicial, principalmente por reduzir o estresse oxidativo (BROWNE et al., 2008).

Baseando-se nisso, os genes que codificam as proteínas BCL-2 associada à proteína X (Bax) e linfoma de células B-2 (BCL-2) desempenham um papel na regulação de apoptose, e a proporção de Bcl-2/Bax pode indicar se uma célula está a sofrer apoptose. Além disso, o gene da superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD) encontra-se associada com a atividade mitocondrial, sendo uma das principais defesas contra danos oxidativos (LONERGAN e FAIR, 2014). Desta maneira, é possível relacionar o estresse oxidativo e o fator protetor da PON1 durante a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição de diferentes níveis de PON1 ao meio de maturação *in vitro* (MIV) sobre a expressão dos genes Bax, BCL-2 e MnSOD em embriões bovinos produzidos *in vitro*.

2. METODOLOGIA

Foram coletados ovários bovinos provenientes de abatedouros locais e transportados ao laboratório (Laboratório de Reprodução Animal, EMBRAPA Clima Temperado) em solução salina à 30°C. Os *complexos cúmulos ovócitos* (CCOs) foram recuperados mediante punção com auxílio de bomba a vácuo e mantidos em banho-maria à 30°C. Após 10 min de decantação, o sedimento foi transferido para placas de Petri, onde foi realizada a recuperação e seleção quanto à qualidade morfológica dos CCOs (DE LOOS et al., 1991).

De acordo com a adição de PON1 ao meio de MIV foram dispostos 4 tratamentos: T0= 0,0mg/mL; T1= 0,02mg/mL; T2= 0,04mg/mL e T3= 0,08mg/mL de PON1 recombinante (Chesapeake PERL Inc.[®], Savage, EUA). Os CCOs previamente selecionados foram distribuídos aleatoriamente em grupos de 50 por tratamento, e colocados em gotas de 400µL de meio MIV suplementado com PON1 conforme os tratamentos. Desta maneira foram realizadas 8 repetições totalizando 1600 COCs. Os meios de MIV, Fecundação *in vitro* (FIV), Cultivo *in vitro* (CIV) e o soro fetal bovino foram cedidos gentilmente pela Biotecnologia Animal[®] (Brasília, DF, Brasil).

A MIV ocorreu em estufa com 5% de CO₂ e 39°C por 24 horas. Para análise da atividade da PON1 foram coletados 15µL do meio às 0 horas da MIV, e, realizada a análise da atividade de PON1 mediante espectrometria. Após a maturação, foi conduzida a FIV utilizando palhetas da mesma partida de sêmen *Bos taurus taurus* e realizada a seleção espermática, com gradiente de mini Percoll, após, foi realizada a inseminação com concentração de 1x10⁶ espermatozoides/mL. Os oócitos foram incubados com os espermatozoides por 20 horas sob mesmas condições que a MIV. Após a fecundação, foi realizada a remoção das células do *cumulus* mediante pipetagens. Os prováveis zigotos foram cultivados em gotas de 200µL de meio SOFaa adicionado de 5% Soro Fetal, sob óleo mineral, acondicionados em bags e em estufa com 5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂ à 39°C.

No dia 7 de desenvolvimento embrionário, foram coletados os embriões no estágio de blastocisto inicial (Bi), blastocisto (Bl) e blastocisto expandido (Bx), após foram transferidos para microtubos contendo 100µl de Quick-Zol (Ludwig[®] Biotech Ltd.), homogeneizados e armazenados à -70°C até avaliação.

Foi extraído o RNA utilizando o método do Trizol em conjunto com um sistema de purificação por coluna comercial (Tissue MicroarrayRNeasy[®] Mini Kit, Hilden QIAGEN[®], NW, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante. A transcrição reversa foi realizada com RNA total (13µL) utilizando o Kit de Síntese iScriptTM (BioRad[®], Hercules, CA, EUA) num volume de 20µL e incubaram-se à 25°C/5min, 42°C/30min e 85°C/5min (MyCyclerTM termociclador, BIO RAD[®]). Para a PCR foi utilizada a histona H2A (H2a) como gene controle e avaliada a expressão dos genes Bax, Bcl-2 e MnSOD. As reações de PCR foram realizadas em duplicata num volume de 20µl. A fluorescência foi medida no sistema ECO Real-Time PCR (iLLumina[®], San Diego, CA, EUA). Para cada ensaio foram corridos 50 ciclos (95°C/3s e 60°C/30s). A análise dos gráficos de amplificação foi efetuada utilizando o software EcoStudy (iLLumina[®], San Diego, CA, EUA). A expressão relativa foi calculada utilizando $2^{A-B}/2^{C-D}$, (MASTERNAK et al., 2005) onde foi comparada a expressão relativa do grupo controle (sem adição de PON1) em relação a cada um dos tratamentos.

A análise estatística foi realizada através do procedimento GLM no programa SAS (SAS, Cary, NC, EUA) para testar o efeito linear, quadrático e cúbico da adição de doses crescentes de PON1 no meio de MIV sobre a expressão dos genes Bax, Bcl-2 e MnSOD nos embriões bovinos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade de PON1 no meio de MIV foi de $2,15 \pm 0,38$; $15,51 \pm 1,48$; $30,24 \pm 2,96$ e $57,94 \pm 5,03$ U/mL de acordo à adição de rPON1 ao meio de MIV nos tratamentos: T0, T1, T2 e T3 respectivamente, validando o modelo de estudo.

Os genes Bax e o BCL-2 têm um papel importante na regulação da apoptose, e sua relação pode indicar se uma célula vive ou morre. Já o gene MnSOD está associado com a atividade mitocondrial, sendo uma das principais defesas contra danos oxidativos. Neste sentido, alguns autores observaram que substâncias antioxidantes adicionadas ao meio de MIV podem melhorar a maturação oocitária e em consequência o desenvolvimento embrionário inicial (WANG et al., 2002). No entanto, os resultados obtidos neste estudo indicam que a pesar da característica antioxidante da PON1, a adição desta enzima durante a MIV não teve efeito sobre a expressão dos genes Bax, Bcl-2 e MnSOD no dia 7 de embriões bovinos produzidos *in vitro*, como observado na Tabela 1.

Tabela 1- Expressão relativa dos genes Bax, Bcl-2 e MnSOD.

rPON1 (mg/ μ L)	Bax	Bcl-2	MnSOD
0.00	$1,00 \pm 0,23$	$1,00 \pm 0,48$	$1,00 \pm 0,36$
0.02	$2,58 \pm 0,36$	$0,61 \pm 0,31$	$1,15 \pm 0,45$
0.04	$2,33 \pm 0,63$	$0,40 \pm 0,20$	$0,87 \pm 0,28$
0.08	$1,27 \pm 0,69$	$0,76 \pm 0,47$	$0,43 \pm 0,15$
	Valor de P		
Linear	0,81	0,78	0,12
Quadrático	0,03	0,34	0,61
Cúbico	0,65	0,71	0,86

\pm Erro padrão

Desta maneira, mais estudos precisam ser realizados com o intuito de esclarecer os possíveis mecanismos de ação da PON1 durante a maturação oocitária, e desenvolvimento embrionário inicial. Além disso, torna-se necessário a utilização de análises complementares que permitam avaliar prováveis efeitos da enzima a nível celular e molecular.

Nós sugerimos que a utilização de embriões em diferentes estádios de desenvolvimento (Bi, B1 e Bx), assim como a sua qualidade possa ter interferido na avaliação de expressão gênica. Isto devido às diferenças na programação molecular conforme o estágio de desenvolvimento embrionário, o que em consequência apresentaria grande variação entre amostras, como encontrado neste trabalho.

4. CONCLUSÕES

A adição de níveis crescentes de PON1 ao meio MIV não apresentou efeito sobre a expressão dos genes Bax, BCL-2 e MnSOD em embriões bovinos produzidos *in vitro*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIONAZ, M.; TREISI, E.; CALAMARI, L.; LIBRANDI, F.; FERRARI, A.; BERTONI, G. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.1740-1750, 2007.

BROWNE, R.W.; SHELLY, W.B.; BLOOM, M.S.; ICQUE, A.J.; SANDLER, J.R.; HUDDLESTON, H.G.; FIJUIIMOTO, V.Y. Distributions of high-density lipoprotein particle components in human follicular fluid and sera and their associations with embryo morphology parameters during IVF. **Human Reproduction**. v.23, p.1884-1894, 2008.

DE LOOS, F.; KASTRUP, P.; VAN MAURIK, P.; VAN BENEDEN, T.H.; KRUIP, T.A. Heterologous cell contacts and metabolic coupling in bovine cumulus oocyte complexes. **Molecular Reproduction and Development**, v.28, n.3, p.255-259, 1991.

DRAGANOV, D.I.; WATSON, C.E.; BILLECKE, S.S.; LADU, B.N. Rabbitserum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. **The Journal Biological Chemistry**, v.43, p.33435–33442, 2000.

JASPARD, B.; COLLET, X.; BARBARAS, R.; MANENT, J. VIEU, C. PARINAUD, J. CHAP, H. PERRET, B. Biochemical characterization of pre-beta 1 high-density lipoprotein from human ovarian follicular fluid: evidence for the presence of a lipid core. **Biochemistry**, v.35, p.1352–1357, 1996.

LAWLOR, D.A.; DAY, I.N.M.; GAUNT, T.R.; HINKS, L.J.; TIMPSON, N.; EBRAHIM, S. DAVEY, S.G. The association of the paraoxonase (PON1) Q192R polymorphism with depression in older women: findings from the British Women's Heart and Health Study. **Epidemiology Community Health**, v.61, p.61-85, 2007.

LONERGAN, P.; FAIR, T. The ART of studying early embryo development: Progress and challenges in ruminant embryo culture. **Theriogenology**, v. 81, p.49-55, 2014.

MASTERNAK, M.N.; AL-REGAJEY, K.A.; DEL ROSARIO LIM, M.N.; BONKOWSKI, M.S.; PANICI, J.A.; PRZYBYLSKI, G.K.; BARTKE, A. Caloric restriction results in decreased expression of peroxisome proliferator-activated receptor superfamily in muscle of normal and long-lived growth hormone receptor/ binding protein knockout mice. **The Journals of Gerontology**, v.60, p.1238–1245, 2005.

PRÉCOURT, L.P.; AMRE, D.; DENIS, M.C.; LAVOIE, J.C.; DELVIN, E.; SEIDMAN, E.; LEVY, E. The tree-gene paraoxonase family: Physiologic roles, actions and regulation. **Atherosclerosis**, v.214, p.20-36, 2011.

SCHNEIDER, A.; ABSALON-MEDINA, V.; ESPOSITO, G.; CORREA, M.; BUTLER, W. Paraoxonase (PON) 1, 2 and 3 Expression in Granulosa Cells and PON1 Activity in Follicular Fluid of Dairy Cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v.48 p.989-994, 2013.

SCHRADER, C.; RIMBACH, G. Determinants of paraoxonase 1 status: genes, drugs and nutrition. **Current Medicinal Chemistry**, v.18, p.5624-5643, 2011.

WANG, X.; FALCONE, T.; ATTARAN, M.; GOLDBERG, J.M., AGARWAL, A.; SHARMA, R.K. Vitamin C and Vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. **Fertility and Sterility**, v.78, p.1272-1277, 2002.