



INFLUÊNCIA DA CONTAGEM DE FOLÍCULOS ANTRAIIS NA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À MATURAÇÃO OOCITÁRIA E NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

Rosa, C. O.^{1*}; Sarapião, F. D.¹; Diniz, L. T.¹; Lindquist, A. G.¹; Silva, C. B.¹; Búfalo, I.¹; Apolonio, E. V. P.¹; Seneda, M. M.¹

¹Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil. *e-mail: camila_rosa_3@hotmail.com

Palavras-chave: Expressão gênica, Nelore, PIVE.

Introdução

O folículo ovariano é uma estrutura altamente especializada, que consiste em um oócito rodeado por células do cumulus chamados complexos cumulus-oócito (CCOs), células da granulosa e da teca. Comunicações parácrinas bidirecionais entre oócito e células somáticas são essenciais para que a foliculogênese, competência do oócito e o posterior desenvolvimento embrionário ocorram adequadamente.

O número de folículos antrais (FAs) é um fator que pode interferir na competência de oócitos bovinos e subsequente desenvolvimento embrionário *in vitro* (SILVA-SANTOS et al., 2014). O número de folículos antrais é um critério comum de escolha em programas de seleção de doadores para produção *in vitro* de embriões (PIVE) em grande escala. Diversos trabalhos em fêmeas *Bos taurus* demonstram uma correlação positiva da contagem de FAs e diversos aspectos reprodutivos (MOSSA et al., 2012). Entretanto, artigos recentes têm descrito informações contraditórias sobre a correlação positiva entre o desempenho reprodutivo e contagem de folículos antrais, como a taxa de fertilização (NAGAI et al., 2016) e a taxa de concepção na IATF (SANTOS et al., 2016).

Considerando o exposto, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do número de FAs na expressão dos genes forkhead box O3 (FOXO3a), transdutor de sinal e ativação da transcrição 3 (STAT3) e fator de inibição de leucemia do receptor alfa (LIFR α), genes estes que estão relacionados aos fatores de transcrição que regulam a maturação do oócito e proliferação celular em células do cumulus e granulosa. Do mesmo modo, foi avaliada a influencia do número de FAs na produção *in vitro* de embriões.

Material e métodos

Ovários foram coletados em abatedouro local e transportados em solução salina a 0,9% a 30-35 °C para o laboratório. Para determinar os grupos experimentais, todos os FAs visíveis localizados na superfície dos ovários foram contados e definidos da



seguinte forma: fêmeas com ≤ 31 FAs (média - DP), 46-76 FAs (média $\pm \frac{1}{2}$ DP), e ≥ 92 FAs (média + DP).

Os folículos foram aspirados e os CCOs de cada grupo foram selecionados para maturação *in vitro* (MIV) em meio de TCM-199 suplementado durante 24 horas. Para fertilização *in vitro* (FIV), sêmen congelado de um único touro Nelore de fertilidade conhecida foi utilizado em meio de TALP-FIV suplementado. Espermatozoides e oócitos foram incubados durante 18 a 22 horas. Posteriormente, os prováveis zigotos ($n = 1173$) tiveram as suas células do cumulus removidas e transferidas para meio de cultura de embriões, SOF suplementado. Nos dias D3 e D5, 50% do meio de cultura de cada gota foram substituídos com meio fresco. As taxas de clivagem e blastocistos foram avaliadas no D3 e D7, respectivamente.

Para análise de expressão gênica, CCOs ($n = 180$) foram utilizados para a análise quantitativa da expressão de RNAm por qRT-PCR em 3 repetições. O RNA total foi extraído a partir das células da granulosa e do cumulus utilizando Trizol. A pureza do RNA e quantidade foram determinados usando um espectrofotômetro nano-drop e 200 ng total de RNA por amostra foram transcritos de forma reversa utilizando o kit iScript cDNA synthesis (BioRad, ON, Canadá). PCR quantitativo foi realizada em um sistema CFX384TM em Tempo Real (BioRad) e iQ SYBR Green Supermix (BioRad). O RNAm dos genes testados foram normalizados para a média dos genes de controles interno RP18S e ciclofilina.

Os dados foram analisados por ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey HSD. Para os dados de PIVE a análise estatística foi realizada pelo teste de regressão logística e as diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Nas células do cumulus, a maior expressão do RNAm de STAT3 e FOXO3a foi observada em vacas com menor quantidade de FAs. No entanto, não foram detectadas diferenças na expressão de RNAm para LIFR α . Nas células da granulosa, a expressão de RNAm para STAT3, FOXO3a e LIFR α não diferiram entre os grupos.

FOXO3a é um fator de transcrição que regula a proliferação celular, a diferenciação, a resistência ao estresse oxidativo, a reparação do DNA, e a expressão de genes que regulam a apoptose (KUSCU e CELIK-OZENCI, 2015). O gene STAT3 está envolvido na mediação da sinalização de citocina e desempenha um papel importante na maturação nuclear de oócitos, estimulação da proliferação celular, diferenciação e apoptose (DANG-NGUYEN et al., 2014). A expressão de mRNA de LIFR α , também está associada a maturação do oócito e subsequente desenvolvimento embrionário em bovinos (XIANHONG et al., 2014). De acordo com os resultados obtidos em relação à expressão gênica podemos sugerir que oócitos recuperados a partir de fêmeas com menor quantidade de FAs, podem possuir uma vantagem no potencial de maturação oocitária.



Entretanto, para a PIVE não houve diferença entre os CCOs de fêmeas com ≥ 92 FAs, 46-76 FAs e ≤ 31 FAs em relação clivagem e taxas de blastocisto. Apesar dos avanços técnicos, condições maturação *in vitro* ainda são muito diferentes do ambiente fluido de oócitos pré-ovulatórios, podendo não ter fornecido condições suficientes para as diferenças serem observadas nas taxas finais de produção.

Conclusões

Em programas de grande escala de PIVE, doadoras são frequentemente selecionadas de acordo com a população de FAs. No entanto, pode não ser a melhor estratégia. Apesar do fato de que as taxas de PIVE não foram afetados pelo número de FAs no presente estudo, os resultados da expressão do RNAm indicam que as fêmeas com baixa contagem de FAs podem possuir CCOs mais competentes em comparação com fêmeas de alta contagem de FAs.

Referências

DANG-NGUYEN, T.Q.; HARAGUCHI, S.; KIKUCHI, K.; SOMFAI, T.; BODÓ, S.; NAGAI, T. Leukemia inhibitory factor promotes porcine oocyte maturation and is accompanied by activation of signal transducer and activator of transcription 3. **Mol Reprod Dev**, 81:230-239, 2014.

KUSCU, N. e CELIK-OZENCI. C. FOXO1, FOXO3, AND FOXO4 are differently expressed during mouse oocyte maturation and preimplantation embryo development. **Gene Expr Patterns**, v.18(1-2), p.16-20, 2015.

MOSSA F.; WALSH, S.W.; BUTLER, S.T.; BERRY, D.P.; CARTER, F.; LONERGAN, P.; et al. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.95, p.2355–2361, 2012.

NAGAI, K.; YANAGAWA, Y.; KATAGIRI, S.; NAGANO, M. The relationship between antral follicle count in a bovine ovary and developmental competence of *in vitro*-grown oocytes derived from early antral follicles. **Biomedical Research (Tokyo)**, v.37 (1), p.63–71, 2016.

SANTOS, G. M. G.; SILVA-SANTOS, K. C.; BARREIROS, T. R.; MOROTTI, F.; SANCHES, B. V.; MORAES, F. L. Z.; et al. High numbers of antral follicles are positively associated with *in vitro* embryo production but not the conception rate for FTAI in Nelore cattle. **Reproduction in domestic animals**, 165, 17–21, 2016.

SILVA-SANTOS, K.C.; SANTOS, G. M. G.; KOETZ JUNIOR, C.; MOROTTI, F.; SILOTO, L. S.; MARCANTONIO, T. N.; et al. Antral Follicle Populations and



Embryo Production – In Vitro and In Vivo – of *Bos indicus-aurus* Donors from Weaning to Yearling Ages. **Reproduction in Domestic Animal**, v.49, p.228–232, 2014.

XIANHONG, M.O.; GUOQUAN, W.U.; DIANSHUAI, Y.U.A.; BAOYU, J.I.A.; CONG L.I.U.; SHIEN, Z.H.U.; YUNPENG, H.O.U. Leukemia Inhibitory Factor Enhances Bovine Oocyte Maturation and Early Embryo Development. **Molecular Reproduction & Development**, v.81, p.608–618, 2014.