

Efeito de diferentes concentrações de Con A na ativação e sobrevivência de folículos primordiais caprinos

¹José Jackson do Nascimento Costa, ²Antonia Moemia Lúcia Rodrigues Portela, ³Regislane Pinto Ribeiro, ⁴Maria Amélia Araújo Soares, ⁵Glaucinete Borges de Souza, ⁶José Roberto Viana Silva

Resumo

Este estudo tem como objetivo investigar os efeitos da lectina Concanavalina A (Con A) na sobrevivência e ativação de folículos primordiais no tecido ovariano caprino durante o cultivo *in vitro*. O córtex do ovário foi cultivado por 1 ou 6 dias, em meio suplementado com diferentes concentrações de Con A (0, 5, 10, 20 e 40 µg/mL). Os fragmentos não cultivados (controle) e os cultivados por 1 ou 6 dias foram processados para avaliação histológica. Os resultados demonstraram que a concentração da lectina Con A que apresentou os melhores resultados foi a de 10 µg/mL, sendo capaz de promover ativação dos folículos primordiais e induzir o crescimento folicular para as demais categorias foliculares. Em conclusão, a lectina Con A adicionada ao cultivo *in vitro* de folículos primordiais caprinos foi efetiva como uma ferramenta biotecnológica para a melhoria do processo de reprodução animal.

Palavras-chave: Concanavalina A, ovário, ativação folicular

Introdução

A foliculogênese tem início com a diferenciação de células germinativas primordiais (CGPs) em oogônias, que darão origem ao oócito primário, o qual se encontra no estágio de prófase I da meiose I. Nesse momento, o oócito primário será circundado por células da pré-granulosa achatadas, formando o folículo primordial (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Os primeiros folículos primordiais em caprinos foram verificados aos 62 dias de gestação, período muito próximo àquele observado em fetos ovinos (em torno de 66 dias de gestação) (BEZERRA *et al.*, 1998; RÜSSE, 1983). BEZERRA *et al.*, (1998) relataram que os folículos de transição, primários e secundários foram observados aos 73 dias de gestação, sendo este um indicativo de que alguns folículos primordiais são ativados na vida fetal, antes mesmo de entrar em quiescência, conforme descrito em bovinos e ovinos (RÜSSE, 1983).

Para uma melhor compreensão do processo de formação desses folículos primordiais, tem sido realizados estudos transcriptômicos em diversas espécies (ovelhas: MANDON-PÉPIN, 2003; camundongas: SMALL, 2005; YOON, 2006; ratas: KEZELE, 2005; primatas não humanos: ARRAZTOA, 2005 e em humanos adultos: SERAFICA, 2005; ASSOU, 2006; ZHANG, 2007) que demonstraram o envolvimento de uma grande diversidade de genes na organização desses folículos

(EDSON, 2009). Dentre esses genes estão fatores de transcrição, enzimas envolvidas na meiose e o fator de crescimento neural (NGF). Cada folículo primordial formado pode seguir caminhos distintos, tais como permanecer quiescentes durante o período reprodutivo ou iniciar o crescimento, podendo crescer até o estágio de folículo ovulatório ou morrer por atresia. No entanto, os folículos primordiais também podem sofrer atresia, ainda no estágio de dormência, contribuindo assim para o envelhecimento reprodutivo da fêmea (McGEE e HSUEH, 2000; HANSEN, 2008).

A regulação da ativação e do crescimento folicular, de folículos primordiais para primário requer a atividade de diferentes hormônios e fatores de crescimento. Durante o cultivo *in vitro*, diversas substâncias de origem animal ou ainda de origem vegetal (como as lectinas) podem ser testadas para induzir a ativação e o crescimento folicular.

A lectina Con A apresenta especificidade para resíduos de carboidratos de D-glucose, D-manose e derivados que são encontrados na região central de todas as ligações de asparagina (N-ligação) (TEIXEIRA *et al.*, 2001). Os resíduos de aminoácidos da Con A que estão envolvidos no sítio de ligação a carboidratos são especificados como Tyr12, Asn14, Leu99, Tyr100, Asp208 e Arg228. Muitas lectinas podem ser designadas mitogênicas ou não mitogênicas com base em suas habilidades em estimular a proliferação de linfócitos (GOLDSTEIN e HAYES, 1978; LIS e SHARON, 1981; SHARON, 1983). As lectinas mitogênicas, possuem a capacidade de induzir a proliferação celular, e dentre elas inclui-se a lectina Con A.

Estudos mostraram que a Con A tem maior afinidade pela parte interna da zona pelúcida (ZP), que é uma membrana produzida pelo oócito em hamster, camundongos e ratos (NICHOLSON *et al.*, 1975). Além disso, a Con A já foi identificada em células da granulosa e no citoplasma do oócito em suínos (TALEVI *et al.*, 1997). O papel da Con A durante a maturação de oócitos já foi investigado e observou-se que essa lectina estimula a maturação de oócitos e a expansão do cúmulus em folículos isolados a partir de ovários de camundongas (FAGBOHUN e DOWNS, 1990).

As lectinas já foram utilizadas para a caracterização da zona pelúcida em hamsters, camundongos e suínos (NICHOLSON *et al.*, 1975). Já foi também realizada a distribuição de padrões da lectina em oócitos de mamíferos (SHALGI *et al.*, 1991) e verificou-se a distribuição e a disponibilidade de resíduos de açúcares específicos na zona pelúcida de oócitos humanos. As lectinas de leguminosas já foram utilizadas para inibir a adesão entre espermatozóides e oócitos (OIKAWA *et al.*, 1973). Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de Con A na ativação, a sobrevivência e desenvolvimento de folículos primordiais *in vitro*.

Material e métodos

Ovários (n = 12) de cabras SRD (*Capra hircus*) adultas foram coletados em abatedouro local. Imediatamente após a morte, os ovários foram lavados com álcool a 70% durante 10 segundos depois de duas vezes em 0,9% de solução salina estéril suplementada com 100µg/mL de penicilina e 100µg/mL estreptomicina. Os pares de ovários foram transportados em menos de 1 h ao laboratório em meio α -MEM, a 4°C (CHAVES *et al.*, 2008). Do mesmo par de ovários foram realizados 18 fragmentos do córtex ovariano (3mm x 3mm x 1mm) (SILVA *et al.*, 2004b) com o auxílio de tesoura e um bisturi em condições estéreis. Os fragmentos de tecido foram diretamente fixados para histologia (controle fresco) ou direcionados ao cultivo *in vitro* por 1 ou 6 dias. Os tecidos corticais do ovário foram transferidos para placas de cultura de 24 poços contendo 700 µL de meio de cultura. O meio de cultivo consistiu de α -MEM (pH 7,2-7,4) suplementado com ITS (10 µg/mL de insulina; 5,5 ng/mL de transferrina; 5ng/mL de selênio), 0,23 mM de piruvato, 2 mM de glutamina, 2 mM de hipoxantina, 1,25 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), cloreto de cálcio e cloreto de manganês. Para testar a concentração ótima de Con A, diferentes concentrações (de 0, 5, 10, 20 ou 40 µg/mL) desta lectina foram adicionadas ao meio de cultura. O cultivo foi realizada a 39°C em 5% de CO₂ em incubadora umidificada, durante 1 a 6 dias. Nos dias 2 e 4, o meio foi substituído por meio fresco.

Após o período de cultivo, 1 ou 6 dias, os fragmentos do tecido ovariano foram fixados em paraformaldeído a 4% durante 12 h e, em seguida desidratadas em concentrações crescentes de etanol. Após a inclusão em parafina (Synth, São Paulo, Brasil), os tecidos ovarianos foram cortados em secções 7 µm, e cada seção foi montado em lâminas de vidro e coradas com hematoxilina-eosina. A categoria e a sobrevivência folicular foram avaliadas microscopicamente em secções seriadas. As lâminas foram examinadas em microscópio óptico (Nikon, Tóquio, Japão) sob aumento de 400x. Os estágios de desenvolvimento dos folículos foram previamente definidos (HULSHOF *et al.*, 1994). Os folículos primordiais consistiam de um oócito rodeado por uma camada de células achatadas ou da mistura de células da granulosa cubóides e achatada cubóide, enquanto que os folículos em desenvolvimento consistiam de primário (uma camada de células da granulosa cubóides em torno do oócito) e folículos secundários (duas ou mais camadas de células granulosas cubóides em torno do oócito). Estes folículos foram ainda classificados individualmente como histologicamente normais quando um oócito intacto estava presente e rodeado por células da granulosa, que eram bem organizadas em uma ou mais camadas e sem núcleos picnóticos. Folículos atresícos foram definidos como folículos com um oócito retraído, núcleo picnóticos e/ou de células da granulosa desorganizadas destacadas da membrana basal. Para avaliar a ativação folicular, a porcentagem de folículos primordiais e em desenvolvimento saudáveis foram calculados antes

(controle fresco) e após o cultivo em cada tratamento. Os percentuais de folículos primordiais e folículos em desenvolvimento, e morfológicamente normais após 1 ou 6 dias de cultivo nos diferentes tratamentos foram comparados pelo teste do qui-quadrado (GraphPad InStat). As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

Resultados e Discussões

A análise histológica revelou que folículos normais e degenerados foram encontrados no tecido cortical do ovário não cultivado e cultivados. Folículos degenerados tinha um oócito retraído com núcleos picnóticos ou células da granulosa desorganizadas. Um total de 2.129 folículos foram contados para avaliação da morfologia e ativação folicular.

A figura 2 mostra a porcentagem de folículos pré-antrais morfológicamente normais após 1 ou 6 dias de cultura na α -MEM⁺ sozinho ou suplementado com Con A (5, 10, 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$). Após 1 e 6 dias de cultura, todos os tratamentos reduziram a porcentagem de folículos normais, quando comparados com aqueles em tecidos de controle não cultivados ($P < 0,05$), mas não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. Além disso, uma redução significativa na porcentagem de folículos normais foi observada com o aumento do período de cultura de 1-6 dias.

Quando comparado ao controle de não cultivado (fresco), reduções significativas na porcentagem de folículos primordiais e aumento de folículos em desenvolvimento foram observados em tecidos que foram cultivadas em meio suplementado com diferentes concentrações de Con A (5, 10, 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$) durante 1 ou 6 dias de cultivo ($P < 0,05$). Além disso, quando comparado com outros tratamentos, incluindo o meio controle (α -MEM⁺), após seis dias de cultivo, reduções significativas na porcentagem de folículos primordiais e aumento de folículos em desenvolvimento foram observados nos tecidos ovarianos cultivados na presença de 10 ou 40 $\mu\text{g/mL}$ de Con A. Com o progresso do período de cultivo do dia 1 ao dia 6, todos os tratamentos reduziram a porcentagem de folículos primordiais e aumentaram os folículos em desenvolvimento ($P < 0,05$).

O presente estudo demonstrou que a Con A (10 ou 40 $\mu\text{g/mL}$) estimula a ativação de folículos primordiais durante o cultivo *in vitro* de tecido ovariano caprino. Estudos anteriores demonstraram a presença de sítios de ligação de Con A em células da granulosa em suínos (LEE e RYAN, 1979) e que as lectinas tem a capacidade de se ligarem a carboidratos para melhorar a adesão célula-célula (SHARMA *et al.*, 1996; YAGI *et al.*, 1995). Assim, Con A pode ter reconhecido e mediado adesão entre os carboidratos presentes nas células da granulosa e no oócito. A comunicação entre o oócito e as células da granulosa circundantes durante as fases de folículos antrais e pré-antrais iniciais é necessária para garantir a sobrevivência do oócito e sua capacidade de

desenvolvimento (ALBERTINI *et al.*, 2001; FATEHI *et al.*, 2002). A interação entre as células da granulosa e o oócito, durante o desenvolvimento folicular não só beneficia o oócito, mas também as células da granulosa, uma vez que o oócito pode regular funções de células da granulosa e a inibição da apoptose nas camadas de células imediatamente em torno do oócito (HUSSEIN *et al.*, 2005). Além de seu efeito sobre a sobrevivência e competência no desenvolvimento oocitário, lectinas mitogênicas, como a Con A, têm estimulado tanto a maturação do oócito como a expansão das células do cúmulus em complexos cumulus- oócito de ratos (FAGBOHUN e DOWNS, 1990).

Conclusões

Em conclusão, a lectina Con A nas concentrações de 10 ou 40 µg/mL é eficaz na promoção da ativação de folículo primordial após 6 dias de cultivo de fragmentos corticais de ovário caprino.

Referências

- ALBERTINI, D. F.; COMBELLES, C. M. BENECHCHI E, CARABATSOS MJ. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 121, p. 647–653, 2001.
- ARRAZTOA, J. A.; ZHOU, J.; MARCU, D.; CHENG, C.; BONNER, R.; CHENM.; XIANG, C.; BROWNSTEIN, M.; MAISEY, K.; IMARAI, M.; BONDY, C. Identification of genes expressed in primate primordial oocytes. **Human Reproduction**, v. 20, n. 2, p. 476–483, 2005.
- ASSOU, S.; ANAHOR, Y. T.; PANTESCO, V.; LE CARROUR, T.; PELLESTOR, F.; KLEIN, B.; REYFTMANN, L.; DECHAUD, H.; DE VOS, J.; HAMAMAH, S. The human cumulus–oocyte complex gene-expression profile. **Human Reproduction**, v. 21, n. 7, p. 1705–1719, 2006.
- BEZERRA, M. B.; RONDINA, D.; LIMA, A. K. F.; OLIVEIRA, L. C.; CECCHI, R., LUCCI, C. M.; GIORGETTI, A.; FIGUEIREDO, J. R. Aspectos quantitativos e qualitativos da foliculogênese pré-natal na espécie caprina. **Ciência Animal**, v. 8, p. 47-56, 1998.
- CHAVES, R. N.; MARTINS, F. S.; SARAIVA, M. V. A.; CELESTINO, J. J. H.; LOPES, C. A. P.; CORREIA, J. C.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; BÁO, S. N.; NAME, K. P. O.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured *in vitro*. **Reproduction Fertility and Development**, v. 20, p. 640–647, 2008.
- EDSON, M. A.; NAGARAJA, A. K.; MATZUK, M. M. The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 6, p. 624–712, 2009.
- FAGBOHUN, C. F.; DOWNS, S. M. Maturation of the mouse oocyte-cumulus cell complex: stimulation by lectins. **Biology of Reproduction**, v. 42, p. 413-423, 1990.

FATEHI, A. N., ZEINSTRA, E. C., KOOIJ, R. V., COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. Effect of cumulus cell removal of in vitro matured bovine oocytes prior to in vitro fertilization on subsequent cleavage rate. **Theriogenology**, v. 57, p. 1347-1355, 2002.

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J. R. V. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: Gonçalves, P. B. D.; Figueiredo, J. R.; Freitas, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2ªed. São Paulo: Roca, p. 303-327. 2008.

GOLDSTEIN, I. J.; HAYES, C. E. The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 35, p. 127-340, 1978.

HANSEN, K. R.; KNOWLTON, N. S.; THYER, A. C.; CHARLESTON, J. S.; SOULES, M. R.; KLEIN, N. A. A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause. **Human Reproduction**, v. 23, n. 3, p. 699–708, 2008.

HULSHOF, C. J.; FIGUEIREDO, J. R.; BECKERS, J. F.; BEVERS, M. M.; VAN den HURK R. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Veterinary Quarterly**, v. 16, p.78-80, 1994.

HUSSEIN, T. S.; FROILAND, D. A.; AMATO, F.; THOMPSON, J.G.; GILCHRIST, R.B. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. **Journal of Cell Science**, v. 118, p. 5257–5268, 2005.

KEZELE, P. R.; AGUE, J. M.; NILSSON, E.; SKINNER, M. K. Alterations in the ovarian transcriptome during primordial follicle assembly and development. **Biology of Reproduction**, v. 72, n. 1, p. 241–255, 2005.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins in higher plants. In: Marcus, The biochemistry of plants a comprehensive treatise. Proteins and nucleic acids. **New York, Academic Press**, v. 6, p. 371 -344, 1981.

MANDON-PÉPIN, B.; OUSTRY-VAIMAN, A.; VIGIER, B.; PIUMI, F.; CRIBIU, E.; COTINOT, C. Expression profiles and chromosomal localization of genes controlling meiosis and follicular development in the sheep ovary. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 3, p. 985– 995, 2003.

McGEE, E. A.; HSUE, A. J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrine Review**, v. 21, n. 2, p. 200–214, 2000.

NICHOLSON, G. L.; YANAGIMACHI, R.; YANAGIMACHI, H. Ultrastructural localization of lectin-binding sites on the zonae pellucidae and plasma membranes of mammalian eggs. **Journal Cellular Biology**, v. 66, p. 263-274, 1975.

OIKAWA, T.; YANAGIMACHI, R.; NICOLSON, G. L. Wheat Germ agglutinin blocks Mammalian Fertilization. **Nature**, v. 241, p. 256—259, 1973.

- RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatomica**, v. 24, p. 77-92, 1983.
- SERAFICA, M. D.; GOTO, T.; TROUNSON, A. O. Transcripts from a human primordial follicle cDNA library. **Human Reproduction**, v. 20, n. 8, p. 2074–2091, 2005.
- SHALGI, R.; MAYMON, R.; BAR-SHIRA, B.; AMIHAL, D.; SKUTELSKY, E. Distribution of lectin receptors sites in the zona pellucida of follicular and ovulated rat oocytes. **Molecular, Reproduction and Development**, v. 29, p. 365–372, 1991.
- SHARMA, V.; VIJAYAN, M.; SUROLIA, A. Imparting exquisite specificity to peanut agglutinin for the tumor-associated Thomsen-Friedenreich antigen by redesign of its combining site. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 21209-21213, 1996.
- SHARON, N. Lectin receptors as lymphocyte surface markers. **Advances in Immunology**, v. 34, p. 213-298, 1983.
- SILVA, J. R. V.; VAN den HURK R.; MATOS, M.H.T.; SANTOS, R. R.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; FIGUEIREDO, J. R. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during *in vitro* culture of caprine ovarian cortical tissue. **Theriogenology**, v. 61, p. 1691-1704, 2004b.
- SMALL, C. L.; SHIMA, J. E.; UZUMCU, M.; SKINNER, M. K.; GRISWOLD, M. D. Profiling gene expression during the differentiation and development of the murineembryonic gonad. **Biology of Reproduction**, v.72, n. 2, p. 492–501, 2005.
- TALEVI, R.; GUALTIERI, R.; TARTAGLIONE, G.; FORTUNATO, A. Heterogeneity of the zona pellucida carbohydrate distribution in human oocytes failing to fertilize *in vitro*. **Human Reproduction**, v. 12, n. 12, p. 2773–2780, 1997.
- TEIXEIRA, M. M.; ALMEIDA, I. C.; GAZZINELLI, R. T. Introduction: innate recognition of bacteria and protozoan parasites. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 883–886, 2001.
- YAGI, M.; CAMPOS-NETO, A.; GOLLAHON, K. Morphological and Biochemical changes in a hematopoietic cell line induced by jacalin, a lectin derived from *Artocarpus Integrifolia*. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 209, p. 263-270, 1995.
- YOON, S. J.; KIM, K. H.; CHUNG, H. M.; CHOI, D. H.; LEE, W. S.; CHA, K. Y.; LEE, K. A. Gene expression profiling of early follicular development in primordial, primary, and secondary follicles. **Fertility and Sterility**, v. 85, n. 1, p. 193–203, 2006.
- ZHANG, P.; KERKELA, E.; SKOTTMAN, H.; LEVKOV, L.; KIVINEN, K.; LAHESMAA, R.; HOVATTA, O.; KERE J. Distinct sets of developmentally regulated genes that are expressed by human oocytes and human embryonic stem cells. **Fertility and Sterility**, v. 87, n. 3, p. 677–690, 2007.

VIII Encontro de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Estadual Vale do Acaraú-UVA

Tema: Interdisciplinaridade e Inovação na Pesquisa e na Pós-Graduação

¹Doutorando em Biotecnologia – RENORBIO – Universidade Federal do Ceará – UFC.
jackson.costa@hotmail.com;

²Mestre em Biotecnologia – Universidade Federal do Ceará – UFC – *campus* Sobral.
moemmia@hotmail.com;

³Mestre em Biotecnologia – Universidade Federal do Ceará - UFC – *campus* Sobral.
regislaneribeiro@hotmail.com;

⁴Doutoranda em Biotecnologia – RENORBIO – Universidade Federal do Ceará – UFC.
amellyaaraujo@hotmail.com;

⁵Graduando em Biologia – Universidade Estadual Vale do Acaraú –UVA.
glaucinhaborjes@hotmail.com;

⁶Orientador Prof. Dr. do Curso de Odontologia – Universidade Federal do Ceará – UFC - *campus*
Sobral. roberto_viana@yahoo.com;