

Influência da lectina Con A e do FSH sobre ativação folicular e expressão gênica no tecido cortical ovariano caprino cultivado *in vitro*

¹José Jackson do Nascimento Costa, ²Antonia Moemia Lúcia Rodrigues Portela, ³Tânia de Azevedo Lopes, ⁴Katianne Freitas dos Santos, ⁵João Garcia Alves Filho, ⁶José Roberto Viana Silva

Resumo

Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos da Concanavalina A (Con A) e do Hormônio Folículo Estimulante (FSH) na sobrevivência e ativação de folículos primordiais, e expressão gênica durante o cultivo *in vitro* de fragmentos do córtex ovariano caprino. Os fragmentos de tecido foram cultivadas durante 6 dias, em meio suplementado com a lectina Con A (10 µg/mL), FSH (50 ng/mL) ou ambos. Em seguida, os fragmentos foram processados por histologia ou armazenados para avaliar por PCR em tempo real a expressão do RNAm para PCNA, c-kit, KL, GDF-9, BMP-15. Os resultados mostraram que, a adição de FSH (50 ng/mL) sozinho ou em combinação com Con A (10 µg/mL) foi capaz de induzir a ativação dos folículos primordiais. Após a cultivo, a presença de FSH aumentou a expressão de RNAm para PCNA, mas este efeito foi bloqueado pela Con A. Além disso, a redução da expressão de BMP-15 foi observada em folículos cultivados em meio de controle, mas não no meio contendo FSH. Além disso, os folículos cultivados na presença de Con A tinham níveis mais elevados de RNAm para GDF-9, do que os cultivados em α -MEM⁺. Em conclusão, quando adicionados ao cultivo *in vitro*, a Con A e FSH foram capazes de promover a ativação folicular, além de regular expressão de diversos genes relacionados ao desenvolvimento folicular inicial.

Palavras-chave: Concanavalina A, FSH, ovário

Introdução

Vários estudos têm demonstrado que a ativação de folículos primordiais e o início da foliculogênese é um processo complexo regulado pelo sistema endócrino e por fatores intra-ovariana (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005). Durante o início do crescimento folicular, as células da pré-granulosa de folículos primordiais passam de achatados e tornam-se cubóidea, começam a proliferar e o oócito começa a crescer. A proliferação das células da granulosa está associada com a expressão do Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA), que é um marcador para avaliar a proliferação celular, pois é expresso universalmente em toda a intérfase (XIONG *et al.*, 1992). A expressão de PCNA é associada com o crescimento folicular em diferentes espécies animais (cabras: SILVA *et al.*, 2004 a, b; humanos: OKTAY *et al.*, 1998, 2000; vacas: WANDJI *et al.*, 1996; FRICKE *et al.*, 1997; ovelhas: LUNDY *et al.*, 1999).

O envolvimento das gonadotrofinas FSH (Hormônio Folículo Estimulante) e LH (Hormônio Luteinizante) (SARAIVA *et al.*, 2008) e fatores de crescimento locais, como GDF-9 (MARTINS *et al.*, 2008), KL / c-Kit (LIMA *et al.*, 2011) e BMP-15 (CELESTINO *et al.*, 2011) sobre a ativação do folículo primordial caprino *in vitro*, tem sido extensivamente estudado na última década. KL, GDF-9, BMP-15 tem um papel importante durante as primeiras fases da foliculogênese, uma vez que camundongos *knockout* para KL ou para o seu receptor (c-kit) não formaram folículos primordiais e o desenvolvimento folicular foi interrompido na fase de folículo primário em camundongos *knockout* para o GDF-9 (DONG *et al.*, 1996) ou em ovelhas contendo mutações para BMP-15 (GALLOWAY *et al.*, 2000).

Apesar da ativação de folículos primordiais ter sido estudadas na última década, os resultados obtidos são ainda limitados, o que torna importante estudar os efeitos de novas substâncias químicas, tal como a lectina Concanavalina A (Con A). Con A é uma lectina que é isolada a partir de *Canavalia ensiformis* (Jack Bean) e existe como um homotetramero em pH fisiológico, com massa molecular de 102,5 kDa (AGRAWAL *et al.*, 1968). Cada monômero apresenta sítios de ligação à Mn^{2+} , Ca^{2+} e carboidratos, tendo especificidade de ligação à manose/glicose. A atividade de ligação de Con A à carboidratos induz diferentes respostas celulares, através da ligação com glicoproteínas ou glicolípidos na membrana plasmática de diferentes tipos de células. Con A tem sido conhecido como um mitógeno, pois estimula a proliferação policlonal dos linfócitos T (BOLDT *et al.*, 1979). Fagbohun e Downs (1990) mostraram que a Con-A têm efeitos profundos sobre o cultivo de complexos oócito-cumulus de ratos, demonstrando que a Con A modifica o estado de maturação do oócito e das células de cumulus, pela sua capacidade para induzir a quebra da vesícula germinativa em oócitos que foram mantidos artificialmente na parada meiótica. Estes dados sugerem que as lectinas podem estimular um sinal ou uma via metabólica comum tanto para a mitogênese como para a maturação do complexo cumulus-oócito (FAGBOHUN e DOWNS, 1990). Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi de avaliar a interação de Con A e FSH sobre a ativação de folículos primordiais e sobre a expressão de RNAm de GDF-9, BMP-15, KL, c-kit e PCNA no tecido cortical do ovário caprino durante o cultivo *in vitro*.

Material e métodos

Ovários (n = 16) 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 6 dias. Os tecidos corticais do ovário foram transferidos para placas de cultura de 24 poços contendo 700 μ L de meio de cultura. O meio de cultivo consistiu de α -MEM (pH 7,2-7,4) suplementado com ITS (10 μ g/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, além disso, foi adicionado 10 μ g/mL de Con A associado ou não com 50 ng/mL de FSH. O cultivo foi realizada a 39°C em 5% de CO₂ em incubadora umidificada, durante 6 dias. Nos dias 2 e 4, o meio foi substituído por meio fresco. Ao final do período de cultivo, os fragmentos do córtex ovariano foram divididos, uma parte dos fragmentos foram fixados para análise histológica e a outra parte armazenados a -80°C para posterior extração de RNA total e quantificação dos níveis de RNAm por PCR em tempo real.

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 μ m, 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 cuboides 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 percentagem de folículos primordiais e em desenvolvimento saudáveis foram calculados antes (controle fresco) e após o cultivo em cada tratamento.

Para avaliar os efeitos de Con A, FSH e da sua combinação sobre a expressão do mRNA para BMP-15, GDF-9, Kit ligand, c-kit e PCNA após seis dias de cultivo, foi realizado a extração

do RNA total utilizando o kit de purificação Trizol (Invitrogen, São Paulo, Brasil). De acordo com as instruções do fabricante, a 800 μ L da solução Trizol foi adicionada a cada amostra e o lisado foi centrifugado a 12.000 xg durante 15 minutos à 4°C. Depois disso, o lisado foi diluído a 1:1 em etanol à 70% e submetido a uma mini-coluna. Após a ligação da RNA com a coluna, a digestão do DNA foi realizada utilizando DNase livre de RNase (340 unidades Kunitz/mL) durante 15 min à temperatura ambiente. Após lavagem da coluna por três vezes, o RNA foi eluído com 30 mL de água livre de RNase. Antes da transcrição reversa, as amostras de RNA foram incubadas durante 5 min a 70°C. A transcrição reversa foi, então, realizada num volume total de 20 μ L, composta de 10 μ L de amostra de RNA, 4 μ L de tampão de transcriptase reversa 5X (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 8 unidades RNaseOUT, 150 unidades da enzima transcriptase reversa Superscript III, 0,036 U aleatória primers (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 10 mM DTT, e 0,5 mM de cada dNTP. A mistura foi incubada durante 1 h a 42°C, durante 5 min a 80°C, e, em seguida, armazenada a -20°C. Os controles negativos foram preparados sob as mesmas condições, mas sem a inclusão da transcriptase reversa.

A quantificação do RNAm foi realizada utilizando SYBR Green. As reações de PCR foram feitas de 1 μ L de cDNA como molde, em 7,5 μ L de SYBR Green Master Mix (PE Applied Biosystems, Foster City, CA), 5,5 μ L de água ultra-pura, e 0,5 μ M de cada primer. Os primers foram desenhados para realizar a amplificação do mRNA para BMP-15, GDF-9, Kit ligand, c-kit, PCNA, os genes de referência utilizados foram a ubiquitina (UBQ) e a β -actina. A eficiência de amplificação de todos os genes foi verificada como descrito por Pfaffl (2001). Os ciclos de PCR foram os seguintes: desnaturação inicial e ativação da polimerase por 10 min a 95°C, seguido por 50 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C e 30 segundos a 72°C. A extensão final foi de 10 min a 72°C. Todas as reações foram realizadas no real time PCR Mastercycler (Eppendorf, Germany). O método de delta-delta CT foi usado para normalizar os dados de expressão do RNAm (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

Os percentuais de folículos primordiais e em desenvolvimento, bem como a percentagem de folículos morfológicamente normais, após 6 dias de cultivo foram comparados pelo teste do qui-quadrado. Os níveis de RNAm de PCNA, BMP-15, GDF-9, LK e c-kit nos tecidos ovarianos foram analisados usando o teste não paramétrico Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Os dados foram expressos como média \pm SEM. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

Resultados e Discussões

No total, 1.456 folículos foram contados para avaliar a morfologia folicular e ativação neste experimento. Comparado com o controle sem cultivo ($P < 0,05$), uma redução significativa na porcentagem de folículos normais foi observada em seis dias de cultura, enquanto que a presença de FSH, Con A, ou ambos, no meio de cultura não aumentou a porcentagem de folículos normais.

Em comparação com os tecidos ovarianos não cultivados, todos os fragmentos de tecido ovariano, após 6 dias de cultivo reduziu forma significativa ($P < 0,05$) a porcentagem de folículos primordiais, e aumentaram o percentual de folículos em desenvolvimento. Além disso, em comparação com o tecido do ovário cultivado em meio controle (α -MEM⁺), a presença de FSH, Con A, ou ambos promoveu uma redução na porcentagem de folículos primordiais e um aumento nos folículos em desenvolvimento. Não se observou interação sinérgica entre o FSH e Con A ($P < 0,05$).

Após 6 dias de cultivo, um aumento da expressão do RNAm para PCNA foi demonstrada nos tecidos cultivados na α -MEM⁺ suplementado com FSH, em comparação com aqueles cultivados em α -MEM⁺ suplementado com ambos, Con A e FSH ($P < 0,05$). Além disso, a adição de FSH e de Con A ao meio de cultura resultou em um aumento de expressão de RNAm de c-kit, em comparação aos tecidos cultivados em α -MEM⁺ suplementado apenas com Con A. Em comparação com o controle fresco sem cultivo, uma redução dos níveis de RNAm para o KL foi observada nos tecidos cultivados em α -MEM⁺ suplementado com Con-A, ou ambos Con A e FSH. A expressão do mRNA para BMP-15 nos fragmentos ovarianos cultivadas em α -MEM⁺ sofreu uma redução quando comparada com o controle fresco ($P < 0,05$), mas não para os fragmentos que foram cultivados na presença de FSH, Con-A, ou ambos. Além disso, os níveis de RNAm para GDF-9 em fragmentos que foram cultivados em meio contendo Con A foram significativamente maiores ($P < 0,05$) do que os cultivados em meio contendo FSH. Durante a amplificação de qPCR, os valores de eficiência dos primers, para cada um dos genes estudados foram avaliados.

A adição de Con A e/ou FSH ao meio de cultivo reduziu a porcentagem de folículos primordiais e concomitantemente induziu um aumento na porcentagem de folículos em desenvolvimento no tecido cortical do ovário. Alguns estudos têm demonstrado que a FSH é essencial para o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais suínos (WU *et al.*, 2007). Em cabras, o FSH é importante para a manutenção da integridade morfológica dos folículos, ativação de folículos primordiais e crescimento de folículos ativados no tecido ovariano cultivado *in situ* (MATOS *et al.*, 2007a). No presente estudo, não foi observado efeito sinérgico entre o FSH e a Con A nos folículos observados. A ligação de Con A aos receptores de fatores de crescimento e hormônios, como FSH, pode explicar a ausência de uma interação positiva entre a lectina e o FSH.

Conclusões

Em conclusão, o cultivo com Con A e/ou FSH altera os níveis de RNAm para genes que são importantes para a ativação de folículos primordiais. Isso sugere que a lectina Con A tem um importante papel no desenvolvimento de folículos pré-antrais caprinos.

Referências

- AGRAWAL, B. B.; GOLDSTEIN, I. J. Protein-carbohydrate interaction. XV. The role of bivalent cations in concanavalin A-polysaccharide interaction. **Canadian Journal of Biochemistry**, v. 46, p. 1147–1150, 1968.
- BOLDT, D. H.; MACDERMOTT, R. P.; JOROLAN, E. P. Interaction of plant lectins with purified human lymphocyte populations: Binding characteristics and kinetics of proliferation. **The Journal of Immunology**, v. 114, p. 1532–1536, 1975.
- CELESTINO, J. J. H.; LIMA-VERDE, I. B.; BRUNO, J. B.; MATOS, M. H. T.; CHAVES, R. N.; SARAIVA, M. V. A.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; ROSSETTO, R.; LOPES, C. A. P.; DONATO, M. A. M.; PEIXOTO, C. A.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Steady-state level of bone morphogenetic protein-15 in goat ovaries and its influence on *in vitro* development and survival of preantral follicles. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 338, p. 1-9, 2011.
- 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.
- DONG, J.; ALBERTINI, D. F.; NISHIMORI, K.; KUMAR, T. R.; LU, N.; MATZUK, M. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. **Nature**, v. 383, p. 531-535, 1996.
- 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.
- FRICKE, P. M.; AL-HASSAN, M. J.; ROBERTS, A. J.; REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A.; FORD, J. J. Effect of gonadotropin treatment on size, number, and cell proliferation of antral follicles in cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 14, p.171–80, 1997.
- GALLOWAY, S. M.; McNATTY, K. P.; CAMBRIDGE, L. M.; LAITINEN, M. P.; JUENGEL, J. L.; JOKIRANTA, T. S.; MCLAREN, R. J.; LUIRO, K.; DODDS, K. G.; MONTGOMERY, G. W.; BEATTIE, A. E.; DAVIS, G. H.; RITVOS, O. Mutations in an oocyte-derived growth factor

gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. **Nature Genetic**, v. 25, p. 279-83, 2000.

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.

LIMA, I. M. T.; BRITO, I. R.; RODRIGUES, G. Q.; SILVA, C. M. G.; MAGALHÃES-PADILHA, D.; LIMA, L. F.; CELESTINO, J. J. H.; FAUSTINO, L. R.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Presence of c-kit mRNA in goat ovaries and improvement of *in vitro* preantral follicle survival and development with kit ligand. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 345, p. 38-47, 2011.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $_{2}DDCT$ method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LUNDY, T.; SMITH, P.; O'CONNELL, A.; HUDSON, N. L.; MCNATTY, K. P. Populations of granulosa cells in small follicles of the sheep ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 115, n. 2, p. 251–262, 1999.

MARTINS, F. S.; CELESTINO, J. J.; SARAIVA, M. V. A.; MATOS, M. H. T.; BRUNO, J. B. B.; ROCHA-JUNIOR, C. M.; LIMA-VERDE, I. B.; LUCCI, C. M.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Growth and differentiation factor-9 stimulates activation of goat primordial follicles *in vitro* and their progression to secondary follicles. **Reproduction Fertility and Development**, v. 20, p. 916–924, 2008.

MATOS, M. H. T.; LIMA-VERDE, I. B.; LUQUE, M. C. A.; MAIA-JR, J. E.; SILVA, J. R. V.; CELESTINO, J. J. H.; MARTINS, F. S.; BÁO, S. N.; LUCCI, C. M.; FIGUEIREDO, J. R. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. **Zygote**, v. 15, p.173–182, 2007a.

OKTAY, K.; KARLIKAYA, G.; AKMAN, O.; OJAKIAN, G. K.; OKTAY, M. Interaction of extracellular matrix and activin A in the initiation of follicle growth in the mouse ovary. **Biology of Reproduction**, v. 63, p.457–61, 2000.

OKTAY, K.; NEWTON, H.; MULLAN, J.; GOSDEN, R. G. Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. **Human Reproduction**, v. 13, p.1133–1138, 1998.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 2002-2007, 2001.

SARAIVA, M. V. A.; CELESTINO, J. J. H.; CHAVES, R. N.; MARTINS, F. S.; BRUNO, LIMA, J. B.; VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; SILVA, A. G. M.; PORFIRIO, E. P.; BÁO, S. N.;

CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Influence of different concentrations of LH and FSH on *in vitro* caprine primordial ovarian follicle development. **Small Ruminant Research**, v. 78, p. 87–95, 2008.

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.

SILVA, J. R. V.; VAN den HURK R.; COSTA, S. H. F.; ANDRADE, E. R.; NUNES, A. P. A.; FERREIRA, F. V. A.; LÔBO, R. N. B.; FIGUEIREDO, J. R. Survival and growth of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. **Animal Reproduction Science**, v.81, p. 273-286, 2004a.

VAN den HURK R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, p.1717-1751, 2005.

WANDJI, S. A.; SRSEN, V.; VOSS, A. K.; EPPIG, J. J.; FORTUNE, J. E. Initiation *in vitro* of growth of bovine primordial follicles. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 942–8, 1996.

WU, Y.; TANG, L.; CAI, J.; LU, X.; XU, J.; ZHU, X.; LUO, Q.; HUANG, H. High bone morphogenetic protein-15 level in follicular fluid is associated with high quality oocyte and subsequent embryonic development. **Human of Reproduction**, v. 22, p. 1526–1531, 2007.

XIONG, Y.; ZHANG, H.; BEACH, D. D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. **Cell**, v. 71, p. 505–514, 1992.

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;

³Mestranda em Biotecnologia – Universidade Federal do Ceará - UFC – *campus* Sobral. taniazevedosol@yahoo.com.br;

⁴Graduada em Zootecnia – Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA. katiannefreitas@hotmail.com;

⁵Doutor em Bioquímica – Universidade Federal do Ceará – UFC. garciabio@gmail.com;

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