



Universidade dos Açores
Departamento de Ciências Agrárias

**EFEITO DO CHOQUE TÉRMICO NA MATURAÇÃO
NUCLEAR E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO
GENÉTICA EM OVÓCITOS DE BOVINO**

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Fernando Moreira da Silva

Co-orientador: Dr. Krishna Chaitanya Pavani

Joana da Conceição Xavier Lourenço

Mestrado em Engenharia Zootécnica

Angra do Heroísmo

2016

Joana da Conceição Xavier Lourenço
Efeito do Choque Térmico na Maturação Nuclear e Avaliação da Expressão Genética em Ovócitos de Bovino



Universidade dos Açores
Departamento de Ciências Agrárias

**EFEITO DO CHOQUE TÉRMICO NA MATURAÇÃO
NUCLEAR E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO
GENÉTICA EM OVÓCITOS DE BOVINO**

Tese apresentada para obtenção do Grau de Mestre do Curso de Mestrado em Engenharia Zootécnica, conferido pela Universidade dos Açores – Departamento de Ciências Agrárias.

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Moreira da Silva

Co-orientador: Dr. Krishna Chaitanya Pavani

Angra do Heroísmo

2016

“Não vos aconselho o trabalho, mas a luta. Não vos aconselho a paz, mas a vitória! Seja o vosso trabalho uma luta! Seja a vossa paz uma vitória!”

Friedrich Wilhelm Nietzsche

Joana da Conceição Xavier Lourenço
Efeito do Choque Térmico na Maturação Nuclear e Avaliação da Expressão Genética em Ovócitos de
Bovino

Aos meus Pais e Irmãos
Ao meu namorado, Joviano

AGRADECIMENTOS

- Aos meus Pais por TUDO.
- Aos meus irmãos pelo apoio, carinho e educação.
- Ao Departamento de Ciências Agrárias da Universidade dos Açores.
- Ao Sr. Prof. Dr. Joaquim Moreira da Silva pelos conhecimentos transmitidos, excelente pessoa que é e paciência e amabilidade com que sempre me recebeu.
- Ao doutorando Krishna Pavani por me ter permitido a realização deste trabalho junto com o seu trabalho de doutoramento, pela orientação deste trabalho e pela paciência e amabilidade com que sempre me recebeu.
- Ao Laboratório de Reprodução Animal, pela amizade e apoio.
- Ao IAMA – Instituto de Alimentação e Mercados Agrícolas, pela disponibilidade, e fornecimento de ovários para estudo.
- Ao SEEBMO - Serviço Especializado de Epidemiologia e Biologia Molecular, pela disponibilidade e apoio prestado para realização de testes de qRT-PCR – PCR quantitativo em tempo real.
- Aos meus padrinhos, tios, primos e amigos pela amizade e apoio.
- A todos os professores pela formação que me proporcionaram.
- A todos os meus colegas do curso que me acompanharam durante estes anos de ensino.

RESUMO

Factores como radiação, poluentes tóxicos ambientais, stress oxidativo e choque térmico (CT) são muitas vezes apontados como responsáveis pela apoptose em embriões de bovinos, podendo este ser um dos fatores da baixa fertilidade observada nos bovinos durante a época de verão.

Desta forma o presente estudo foi elaborado no sentido de avaliar a capacidade de maturação in vitro de ovócitos, após terem sido submetidos a um CT durante 0 (controlo) 6, 12 18 e 24 horas de $CT_1=39,5\text{ °C}$ e $CT_2=40,5\text{ °C}$, bem como a expressão genética dos genes responsáveis pela sua maturação: Cx43, CDH1, DNMT1, HSPA14 e dos genes de referência, GAPDH e SDHA. Para isso, os complexos cumulus-ovócitos (CCOs) (n= 1124) foram aspirados durante os meses de Inverno e submetidos, respetivamente ao CT_1 e CT_2 . Passadas as 24h, os CCOs foram divididos em dois grupos no qual no primeiro foram registadas as taxas de maturação nuclear (TMN), após a fixação e coloração com aceto-orceína (3:1) e no segundo grupo foi analisada a expressão genética, tendo como genes alvo Cx43, CDH1, DNMT1, HSPA14 e como referência os genes de manutenção GAPDH e SDHA.

A duração do stress térmico resultou numa diminuição significativa ($p < 0,05$) nas TMN para os ovócitos submetidos ao CT_1 quando comparados com os resultados de maturação obtidos para o grupo controlo, diminuindo de $86,4\% \pm 4,3$ para $65,5 \pm 0,7$; $51,3 \pm 0,9$; $38,1 \pm 1,9$ e $36,3 \pm 0,9$ respetivamente para o CT_1 de 6, 12, 18 e 24 h. Esta diminuição de maturação foi ainda mais acentuada para o CT_2 em que os valores baixaram para $38,4 \pm 16,9$; $35,7 \pm 7,5$; $29,1 \pm 3,3$; $20,3 \pm 7,1$ respetivamente para 6, 12, 18 e 24 h de CT. Para a avaliação da expressão de genes, os resultados demonstraram uma tolerância do ovócito ao CT nas 6h, não foi observada nenhuma regulação do gene CDH1 a partir das 12h mas o gene DNMT1 observou-se uma regulação positiva, representando o efeito do CT no desenvolvimento do ovócito.

Palavras-chave: Choque Térmico, Ovócitos Bovinos, Análise de Genes, Maturação Nuclear.

ABSTRACT

Factors such as radiation, environmental toxic pollutants, oxidative stress and thermal shock (CT) are many times pointed as responsible for apoptosis in bovine embryos, which may be one of the factors of low fertility observed in cattle during the summer season.

Thus, the present study was designed to assess the maturation of oocytes in vitro capacity, having undergone one o'clock CT for 0 (control) 6, 12, 18 and 24 hours of CT1 = 39.5 ° C and CT2 = 40.5 ° C, as well as gene expression of genes responsible for maturation: Cx43, CDH1, DNMT1, HSPA14 and reference genes, GAPDH and SdhA. For this, the cumulus-oocyte complexes (COCs) (n = 1124) were aspirated during the winter months and submitted respectively to CT1 and CT2. After 24h, COCs were divided into two groups where the first nuclear maturation rates were recorded (TMN), after fixing and staining with aceto-orcein (3: 1) and the second group gene expression was analyzed, Cx43 gene targeting, CDH1, DNMT1, and HSPA14 reference to the housekeeping genes GAPDH and SdhA.

The duration of heat stress resulted in a significant decrease ($p < 0.05$) in TMN for oocytes undergoing CT1 compared with the maturation results obtained for the control group, diminuindo 86.4% \pm 4.3 to 65, 5 \pm 0.7; 51.3 \pm 0.9; 38.1 \pm 1.9 and 36.3 \pm 0.9 respectively for CT1 6, 12, 18 and 24 h. This diminuição maturation was even more pronounced for the CT2 where values fell to 38.4 \pm 16.9; 35.7 \pm 7.5; 29.1 \pm 3.3; 20.3 \pm 7.1 respectively 6, 12, 18 and 24 h CT. For review of gene expression, the results demonstrated oocyte tolerance CT in 6h, observed no regulation CDH1 gene from 12pm but the DNMT1 gene was observed a positive control, representing the effect of CT development oocyte.

Keywords: Thermal Shock, Bovine oocytes, Gene Analysis, Nuclear Maturation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Aparelho reprodutor da vaca (vista lateral), mostrando a sua posição das cavidades pélvica e abdominal.....	5
FIGURA 2. Processo de Oogénese.....	9
FIGURA 3. Processo de Foliculogénese.....	11
FIGURA 4. Diversas fases da maturação nuclear de ovócitos bovinos, corados comorceína e observados a microscópio ótico invertido. A) ovócito GVBD; B) ovócito em metafase I; C) ovócito em telofase I; D) ovócito em metafase II.....	18
FIGURA 5. Alterações Morfológicas Encontradas em uma Célula Apoptótica.....	20
FIGURA 6. Processo de Transcrição do ADN.....	24
FIGURA 7. Recolha de ovócitosbovinos.....	29
FIGURA 8. Maturação – Fixação – Coloração de ovócitos bovinos.....	30
FIGURA 9. Transcrição da expressão do gene de ovócitos bovinos maturados <i>in vitro</i> , sobre diferentes temperaturas de choque térmico (39,5°C) com referência aos ovócitos maturados no controlo (38,5°C): (a) – controlo VS 6 H; (b) – controlo VS 12 H; (c) – controlo VS 18 H; (d) – controlo VS 24 H. Colunas com (*) representam diferenças significativas (P <0,05) no gene. As barras indicam o erro padrão da média.....	38

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. Correlação entre variáveis fisiológicas e o nível de stress em dez animais escolhidos casualmente.....	23
QUADRO 2. Os Primers Oligonucleotídicos utilizados para as reações em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RTq-PCR).....	32
QUADRO 3. Efeito Cinético de Choque Térmico a 39,5°C na Maturação Nuclear de Ovócitos.....	36
QUADRO 4. Efeito Cinético de Choque Térmico a 40,5°C na Maturação Nuclear de Ovócitos.....	36

LISTA DE SIGLAS

ADN – Ácido Desoxirribonucléico

ADNC – ADN Complementar

AI – Anáfase I

ANOVA – Análise de Variância

ARN – Ácido Ribonucleico

ARNM – RNA Mensageiro

ATP – Adenosina Trifosfato

BSA – Albumina Sérica Bovina

CCOS – Complexo *Cumulus* – Ovócito

CDH 1 – Caderina-1

CG – Célula Germinativa

CGPS – Célula Germinativa Primordial

CL – Corpo Lúteo

CX 43 – Conexina 43

DNMT 1 – ADN Metiltransferase

E - Eficiência

EPM – Erro Padrão da Média

FBS – Soro Fetal de Bovino

FIV – Fertilização *In Vitro*

FSH – Hormona Folículo Estimulante

GAPDH – Enzima Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase

GNRH – Hormona Libertadora de Ganadotrofina

GVBD – Quebra da Vesícula Germinativa

HSP – Proteínas de Choque Térmico

HSPA 14 – Proteína de Choque Térmico da Família A – membro 14

IGF-I – Fator de Crescimento do Tipo Insulina – I

LCS – Síndrome do Bezerro Grande

LH – Hormona Luteínizante

M – Declive da linha

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

MIV – Maturação *In Vitro*

ML – Mililitro

MM – Milímetro

MZT – Transição Materno-Zigótica

MI – Metafase I

MII – Metafase II

PBS – Solução Tampão Fosfato

PCR – Reação da Cadeia em Polimerase

PIV – Produção *In Vitro*

RTQ-PCR – PCR Quantitativo em Tempo Real

SDHA – Succinato Desidrogenase, Subunidade A

SPZ – Espermatozóides

TCM-199 – Meio para Cultura de Tecidos - 199

TI – Telefase I

MG – Micro Gramas

ML – Micro Litros

MM – Micrómetros

VG – Vesícula Germinativa

ZP – Zona Pelucida

INDICE

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE QUADROS	ix
LISTA DE SIGLAS	x
INDICE.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1 Fisiologia/Anatomia da Fêmea Bovina	5
3.1.1 Aparelho Reprodutor da Fêmea Bovina.....	5
3.1.2 Ovogénese	8
3.1.3 Foliculogénese	10
3.1.4 Função e Aptidão Ovocitária.....	12
3.1.5 Funções do complexo <i>cumulus</i> ovócito.....	14
3.1.6 Maturação <i>in vitro</i>	15
3.1.6.1 Maturação Nuclear	16
3.1.6.2 Maturação Citoplasmática	17
3.1.7 Apoptose Celular	19
3.2 Stress Térmico na Reprodução Bovina	21
3.2.1 Efeito do Stress Térmico sobre o Ovócito.....	21
3.2.2 Efeito do Stress Térmico do Desenvolvimento Reprodutivo das Manadas	22
3.3 Expressão Genética em Ovócitos Bovinos.....	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 Produtos Químicos	28
4.2. Local	28
4.3. Delineamento Experimental	28
4.4. Recolha de Ovócitos.....	29
4.5. Maturação e Coloração Nuclear	30
4.6. Extração de ARN Total	30

4.7. Síntese de cDNA de Cadeia Simples.....	31
4.8. Desenho Especifico do Primer	31
4.9. PCRq em Tempo Real	32
4.10. Curvas Padrão.....	33
4.11. Análise Estatística	33
5. RESULTADOS	35
6. DISCUSSÃO	39
7. CONCLUSÃO.....	41
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1. INTRODUÇÃO

Nos Açores, o setor agrícola tem um contributo importante para a economia regional, sendo que as alterações climáticas afetam direta ou indiretamente os animais, a nível de produção em geral e reprodução em particular. Em termos climáticos, pode indicar-se o aumento da concentração de CO₂ na atmosfera, temperaturas mais elevadas e alteração dos padrões de precipitação anuais e sazonais. Em 2007 Solomon (Solomon, 2007) descreveu que o aumento da temperatura observado nos últimos 100 anos excedeu largamente as variações climáticas naturais dos últimos 1000 anos, afetando o desempenho de 60% do efetivo mundial bovino causando perdas económicas graves (Wolfenson, 2000; Berg et al., 2010). A hipertermia é das características que mais contribui para o aumento da infertilidade no verão, afetando diretamente as funções celulares do sistema reprodutivo (Wolfenson, 2000; Berg et al., 2010), principalmente em vacas latentes, diminuindo a expressão do cio e taxas de conceção, bem como o aumento de mortes embrionárias (Sartori e Dode, 2008). Quando a temperatura ambiente atinge valores acima dos 29°C, podendo esta ser inferior, dependendo da humidade relativa do ar, a via de perda de calor mais eficiente é por meios evaporativos (transpiração e respiração), sendo responsável, por exemplo, em bovinos por 85% das perdas de calor (Silva, 2000). Estudos prévios, desenvolvidos pelo grupo de Reprodução da Universidade dos Açores, demonstraram que durante o verão observa-se uma baixa fertilidade nas vacas, (Pavani, 2015; Sieuve de Meneses, 2014) na maior parte atribuída à sensibilidade dos tecidos ováricos às temperaturas ambientais elevadas, sendo que a função folicular é interrompida por hipertermia, traduzindo-se em alterações no desenvolvimento folicular, dominância deprimida, e esteroidogénese folicular prejudicada (Roth *et al*, 2000). Devido ao stress térmico, os ovócitos dos mamíferos ficam bloqueados na prófase da primeira divisão meiótica, não adquirindo a sua competência meiótica e potencial de fertilização (Masui *et al*, 2001). Assim, os ovócitos que são recolhidos, apresentam uma reduzida capacidade de desenvolvimento embrionário, após a fertilização *in vitro* (FIV) ou activação química (Al-Katanani et al, 2002), tendo sido ainda descrito que o stress térmico provoca um aumento da mortalidade embrionária (Thatcher e Hansen, 1993).

A nível celular e molecular, o efeito do stress induzido pelo frio e/ou pelo calor sobre os ovócitos, provoca alterações na expressão de genes, sendo esta a forma mais

visível da resposta celular ao stress térmico. Quando os genes que codificam proteínas de choque térmico (HSP) foram estudados, observou-se que o stress pelo frio também afeta um grande número de genes que não estão diretamente associados com as HSP. Desta forma, dependendo da intensidade da exposição, o stress térmico pode desencadear uma resposta a nível celular, ativando o metabolismo da apoptose, ou então induzir o processo de necrose celular (Sonna *et al.*, 2002), sendo estes processos mais visíveis quando os ovócitos ficam expostos ao stress térmico por longos períodos de tempo (Aroyo *et al.*, 2010).

A investigação desenvolvida por Payton *et al.* (2011), corrobora o anteriormente descrito, mostrando que o stress térmico pode induzir alterações nos níveis de transcrição de genes envolvidos no crescimento celular, do ciclo celular e da morte celular programada. As junções gap, mais conhecidas como junções comunicantes, que unem as células do *cumulus* são formadas principalmente por conexina 43 (Cx43). Desta forma, durante a cultura *in vitro*, a expressão desta conexina é importante pois confere características fisiológicas, podendo a expressão do gene que codifica estas proteínas, servir como marcador de desenvolvimento do ovócito e posterior desenvolvimento após a fecundação *in vitro* (Beyer *et al.* 1989; Nemcova *et al.* 2006). A Cx43 foi localizada nas células da granulosa do folículo em desenvolvimento tendo sido demonstrado que a estimulação das ganodotrofinas aumenta a intensidade desta conexina (Lenhart *et al.*, 1998). A expressão da Cx43 é importante pois confere características fisiológicas para a produção *in vitro* de embriões bovinos, podendo esse gene servir como marcador de desenvolvimento da competência do ovócito (Nemcova *et al.* 2006). Além da CX43, a HSPA 14 é o gene mais abundante nas células e a sua expressão permite a produção e manutenção da função celular, atuando como proteínas de extrema importância para a manutenção da integridade proteica celular e, após stress ambiental, apresentam uma importância ainda maior para a recuperação das proteínas que forem danificadas durante esse stress. este gene controla o processo de compactação embrionária (Riethmacher, *et al.*, 1995). Um outro gene diretamente associado ao choque térmico é o CDH1, o qual tem como função a proteção dos ovócitos da apoptose, estando associado à proteção das células sob condições diferentes de stress. Por fim o gene conhecido como DNMT1, está também associado à regulação dos mecanismos da apoptose, sendo que a expressão deste gene é alterada pelo choque

térmico em ovócitos bovinos, impedindo a sua maturação e posterior desenvolvimento dos embriões (Palli *et al.*, 2008).

Segundo Pavani *et al.*, (2015c), embriões desenvolvidos a partir de ovócitos submetidos a stress térmico pelo calor, durante a maturação, forneceu indicações que o desenvolvimento e crescimento dos embriões depende das proteínas armazenadas nos ovócitos, reduzindo a taxa de desenvolvimento desses embriões, o que eventualmente foi afetado pela expressão genética de alguns genes, provocando danos celulares que resultam em apoptose. O conhecimento desses mecanismos possibilita o desenvolvimento de novas estratégias aplicadas à sobrevivência celular face aos vários tipos de stress, minimizando efeitos deletérios.