

# Influência da maturação *in vitro* na abundância relativa de microRNAs em oócitos bovinos: dados preliminares<sup>1</sup>

Carolina David Vieira<sup>2</sup>, Vanessa das Graças Pereira de Souza<sup>3</sup>, Gustavo Torres de Souza<sup>3</sup>, Carolina Capobianco Romano Quintao<sup>4</sup>, Luiz Sérgio de Almeida Camargo<sup>5,6</sup>

<sup>1</sup>O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil

<sup>2</sup>Graduando em Biomedicina – SUPREMA – Fac. Ciências da Saúde de Juiz de Fora, MG. Bolsista PIBIC CNPq

<sup>3</sup>Mestrando em Ciências Biológicas – UFJF, Juiz de Fora, MG

<sup>4</sup>Analista – Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. E-mail: carolina.quintao@embrapa.br

<sup>5</sup>Pesquisador – Embrapa Gado de Leite. E-mail: luiz.camargo@embrapa.br

<sup>6</sup>Orientador

**Resumo:** A maturação molecular é um processo importante na maturação *in vitro* (MIV). Proteínas e RNAm acumulados influenciam a competência do oócito enquanto microRNAs (miRNA) possuem papel na regulação de RNAm. Este estudo preliminar objetivou avaliar o efeito da MIV na abundância de miRNA alvos em oócitos bovinos. Oócitos imaturos coletados de ovários obtidos de frigorífico foram maturados *in vitro* por 24h em incubadora com 5% CO<sub>2</sub> e 38°C. Amostras de oócitos imaturos e maturados *in vitro* foram congelados. Após extração de RNA e transcrição reversa, abundância relativa de miRNA específicos foram analisados por PCR em tempo real e comparados entre oócitos imaturos e maturados *in vitro* usando software REST. Maior quantidade (P<0,05) de mi21 foi encontrada em oócitos maturados *in vitro* enquanto a quantidade de mir130a e mir103 foi maior nos oócitos imaturos (P<0,05). Este resultado sugere que a abundância de alguns miRNAs em oócitos bovinos pode ser influenciada pela MIV.

**Palavras-chave:** oócito, bovino, maturação *in vitro*, miRNA

## Influence of *in vitro* maturation on relative abundance of microRNAs in bovine oocytes: preliminary data

**Abstract:** Molecular maturation is an important process of *in vitro* maturation (IVM). Accumulated proteins and mRNAs influence the competence of the oocyte while microRNAs (miRNA) play a role in the regulation of mRNA. This preliminary study aimed to evaluate the effect of IVM on the abundance of specific miRNA in bovine oocytes. Immature oocytes collected from ovaries obtained from slaughterhouse were *in vitro* matured for 24 h in an incubator with 5% CO<sub>2</sub> and 38°C. Immature and *in vitro* matured oocytes were frozen. After RNA extraction and reverse transcription, relative abundance of specific miRNA was analyzed by RT-PCR and compared between immature and *in vitro* matured oocytes using REST software. Greater amount (p <0.05) of mi21 was found in oocytes matured *in vitro* while the amount of mir130a and mir103 was higher in immature oocytes (P <0.05). This result suggests that the abundance of some miRNAs in bovine oocytes can be influenced by IVM.

**Keywords:** oocyte, bovine, *in vitro* maturation, miRNA

### Introdução

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma tecnologia que permite a produção de embriões bovinos em escala sendo adotada por diversos produtores de corte e leite. Devido à alta demanda, o Brasil é o país que mais produz embriões bovinos via PIVE (Bueno e Beltran, 2008). A maturação *in vitro* (MIV) é uma etapa essencial na PIVE, mas considerada sub-ótima (Souza et al., 1998). Um dos processos importantes durante a MIV é a maturação molecular, que envolve a adequação de proteínas e RNAm estocados no citoplasma e que serão necessários para o desenvolvimento embrionário inicial, logo após a fecundação (Bueno e Beltran, 2008).

Estudos tem mostrado que a quantidade de RNAm estocado no citoplasma pode ser alterada durante a maturação *in vitro* (Tang et al., 2007), o que pode afetar a competência do oócito. Contudo, a função dos RNAm codificantes é regulado por microRNAs (miRNA) (Mondou et al., 2012). Assim a presença de miRNAs é crítica na manutenção da homeostase celular reforçando programas transcricionais e atenuando transcrições aberrantes (Ramachandra et al., 2008).

Dentre os miRNA existentes destacam-se os miR-21 e miR-130a. Eles apresentam expressão crescente nos estágios iniciais e mostram estar envolvidos na regulação de genes durante o período crítico de desenvolvimento inicial (Mondou et al., 2012). Outros miRNAs candidatos a

terem papel importante na maturação são miR-130b e miR-148a. Em um estudo recente, Sinha et al. (2017) demonstraram a expressão abundante de miR-130b nos oócitos imaturos e maduros. O estudo destacou a importância dos miRNA-130b durante a maturação dos oócitos, por este estar relacionado a extrusão do primeiro corpúsculo polar, maturação nuclear, regulação dos níveis de expressão de dois genes alvo (SMAD5 e MSK1) e regulação da atividade mitocondrial no oócitos. Já o miR-148a tem expressão abundante e estável nos três estágios de desenvolvimento embrionário e sua expressão está relacionada com a repressão dos muitos fatores de transcrição contribuindo para o baixo nível de atividade transcricional geral no oócito maturado (Gilchrist et al., 2016). O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da MIV na quantidade relativa de miRNA específicos no citoplasma de oócitos bovinos.

### Material e Métodos

Ovários obtidos em um matadouro local foram utilizados para a obtenção dos oócitos. Os ovários foram transportados ao Laboratório de Reprodução Animal em solução fisiológica, acrescida de antibiótico à temperatura de 35 °C. No laboratório os ovários foram lavados e colocados em banho-maria (35 °C). Em seguida os oócitos de 3 a 8 mm de diâmetro foram aspirados folículos com auxílio de uma seringa de 10 mL e agulha de 25 x 8 mm de e o conteúdo aspirado foi depositado tubo de fundo cônico. Após 15 minutos de decantação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado em meio TALP-Hepes e vertido em placa de Petri descartável.

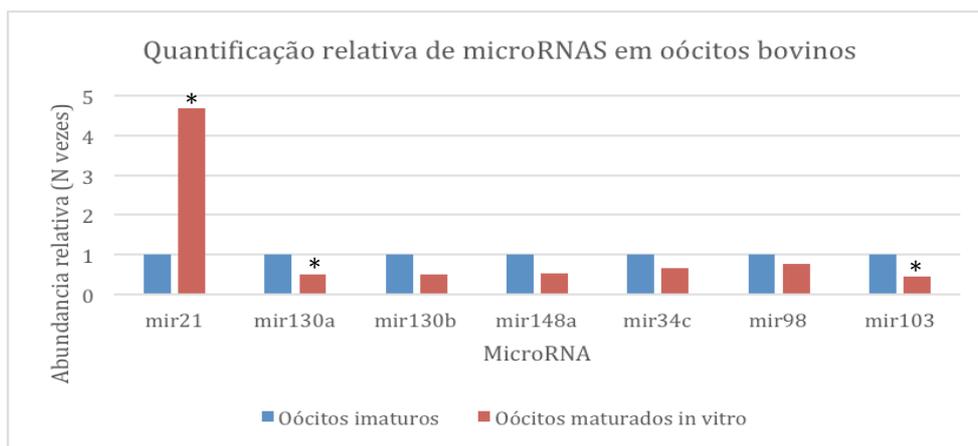
Complexo-cúmulus-oócitos (COCs) viáveis foram selecionados segundo os critérios de classificação, baseados principalmente na homogeneidade do citoplasma e no número de camadas de células do cúmulus. A MIV dos COCs foi realizada em meio TCM 199 suplementado com 10% de soro de vaca em cio, piruvato de sódio e antibióticos, por 22h em incubadora a 38,5 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 22h de MIV os COCs foram recolhidos e as células do cumulus removidas em vórtex, em solução com 1 mL de hialuronidase (1000 U/mL em 1 mL de meio Hepes-TALP durante 5 min). Em seguida, os oócitos foram congelados para a extração de RNA total.

A extração de RNA total foi realizada com o kit miRNeasy Micro (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo a recomendação do fabricante. A transcrição reversa foi realizada com o kit miScript II RT (Qiagen) e o qPCR foi realizado usando o kit miScrip SYBR Green PCR (Qiagen) usando oligos *forward* desenhados para cada miRNA alvo e oligo *reverse* universal. As condições de PCR seguiram o protocolo da Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Califórnia, EUA), com o primer para miRNA let7a e conduzidos em duplicata em equipamento Real Time PCR System 7300 (Applied Biosystem, EUA). A eficiência dos oligos foram analisados pelo *software* LinRegPCR e a quantificação foi realizada pelo cálculo  $2^{-(\Delta\Delta CT)}$  usando o *software* REST utilizando oócitos imaturos como grupo calibrador. Foi usado conjunto de 80 oócitos obtidos de três coletas de ovários. Diferenças com valores de P menores de 0,05 foram consideradas significativas.

### Resultados e Discussão

Os oligos desenhados para os miRNA mir21, mir130b, mir148a, mir130a, mir34c, mir98, mir103 e let7a apresentaram eficiência média de 1,93, 1,94, 1,93, 1,91, 1,91, 2,0, 1,92 e 1,99, analisados pelo *software* LinRegPCR. O oligo que apresentou menor coeficiente de variação entre as amostras dos diferentes tratamentos foi o do miRNA codificante do let7a (3,72%) e por esse motivo foi usado como endógeno de referencia para cálculo da quantificação relativa.

A quantificação relativa por tempo real comparou a abundância de miRNA entre oócitos imaturos e maturados *in vitro*. Maior quantidade de mir21 foi encontrada em oócitos maturados *in vitro* do que nos imaturos (P<0.05). Para mir130a e mir103 foi encontrado menor quantidade nos oócitos maturados *in vitro* (P<0.05). Não houve diferença (P>0,05) na abundância nos demais miRNA analisados (Figura 1).



**Figura 1.** Quantificação relativa por PCR tempo real de microRNAs em oócitos bovinos maturados *in vitro*. Grupo calibrador comparativo: oócitos imaturos (n=1). Dados de uma repetição de PCR conduzida em duplicata. Asteriscos (\*) indicam diferença entre oócitos imaturos e maturados *in vitro* (P<0,05).

O miR-21 está envolvido na ativação do genoma embrionário, com níveis de expressão mais altos antes da ativação genômica. Este miRNA desempenha um papel importante na degradação de mRNAs herdados pela mãe, o que representa um passo essencial para o desenvolvimento embrionário normal (Ramachandra et al., 2008). Já o miRNA-130a está envolvido na regulação de genes durante o desenvolvimento inicial, sendo consideravelmente expresso no estágio de blastocisto (Mondou et al., 2012). O miRNA-130a tem como suposto alvo TPT1, gene que codifica proteína reguladora do crescimento e proliferação celular. (Gäken et al., 2012). O TPT1 desempenha papéis em muitos processos celulares, como progressão do ciclo celular, apoptose e carcinogênese (Bommer e Thiele, 2004). A expressão de TPT1 é altamente regulada tanto no nível transcricional quanto na traducional (Kues et al., 2008). Esse é um dos genes mais abundantemente expressos em blastocistos humanos e bovinos e seu papel na iniciação da ativação do genoma embrionário parece ser conservada evolutivamente (Adjaye et al., 2007). Em condições de maturação *in vitro* e *in vivo* a expressão do TPT1 não é observada em oócitos (Adona et al., 2016) e isto pode estar relacionada a repressão da sua expressão mediada por miRNA-130a até que seja cessada no momento adequado.

### Conclusões

A maturação *in vitro* de pode influenciar a quantidade de miRNAs específicos em oócitos bovinos. Mais amostras devem ser analisadas para confirmar o achado.

### Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pela oportunidade da iniciação científica. Agradeço ao Luiz Sergio A. Camargo por ter me orientado, a Carolina Capobiango R. Quintão pela paciência e por ter me ensinado tantas coisas ao longo desse ano, a Vanessa Souza por ter me ajudado nesse trabalho, e aos alunos de Pós-graduação Gustavo Torres, Diana Lemos e Judith Guimarães pelo incentivo. Apoio financeiro parcial: CNPq e Fapemig.

### Referências

- ADJAYE, J.; HERWIG, R.; BRINK, T.C.; HERRMANN, D.; GREBER, B.; SUDHEER, S.; NIEMANN, H. Conserved molecular portraits of bovine and human blastocysts as a consequence of the transition from maternal to embryonic control of gene expression. **Physiological Genomics**, v.31, p.315-327, 2007.
- ADONA, P.R.; LEAL, C.L.; BIASE, F.H.; DE BEM, T.H.; MESQUITA, L.G.; MEIRELLES, F.V.; GUEMRA, S. *In vitro* maturation alters gene expression in bovine oocytes. **Zygote**, v.24, p.624-633, 2016.
- BOMMER, U.; THIELE, B. The translationally controlled tumour protein (TCTP). **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.36, p.379-385, 2004.

BUENO, P.; BELTRAN, M.P. Produção *in vitro* de embriões bovinos. **Rev. Eletr. Med. Vet.**, v.11, p.1-7, 2008.

GÄKEN, J.; MOHAMEDALI, A.M.; JIANG, J.; MALIK, F.; STANGL, D.; SMITH, A.E.; MUFTI, G.J. A functional assay for microRNA target identification and validation. **Nucleic Acids Research**, v.40, p.75, 2012.

GILCHRIST, G.; TSCHERNER, A.; NALPATHAMKALAM, T.; MERICO, D.; LAMARRE, J. MicroRNA Expression during Bovine Oocyte Maturation and Fertilization. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17, p.396, 2016.

KUES, W.A.; SUDHEER, S.; HERRMANN, D.; CARNWATH, J.W.; HAVLICEK, V.; BESENFELDER, U.; NIEMANN, H. Genome-wide expression profiling reveals distinct clusters of transcriptional regulation during bovine preimplantation development in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, p. 19768-19773, 2008.

MONDOU, E.; DUFORT, I.; GOHIN, M.; FOURNIER, E.; SIRARD, M.A. Analysis of microRNAs and their precursors in bovine early embryonic development. **Mol Hum Reprod.**, v.18, p.425-34, 2012.

RAMACHANDRA, R.; SALEM, M.; GAHR, S.; REXROAD, C.; YAO, J. Cloning and characterization of microRNAs from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): their expression during early embryonic development, **BMC Dev Biol.**, v. 8, p. 41, 2008.

SINHA, P.B.; TEFAYE, D.; RINGS, F.; HOSSIEN, M.; HOELKER, M.; HELD, E.; SALILEW-WONDIM, D. MicroRNA-130b is involved in bovine granulosa and cumulus cells function, oocyte maturation and blastocyst formation. **Journal of Ovarian Research**, v.10, p.112-116, 2017.

SOUSA, P.A.; WATSON, A.J; SCHULTZ, G.A.; BILODEAU-GOESEELS, S. Oogenetic and zygotic gene expression directing early bovine embryogenesis: a review. **Mol Reprod Dev**, v.51, p.112-121, 1998.

TANG, F.; KANEDA, M.; O'CARROLL, D.; HAJKOVA, P.; BARTON, S. C.; SUN Y. A. Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. **Genes Dev.**, v.21, p.644–648, 2007.