

ISSN 2175-8395

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Instrumentação
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

**ANAIS DO VII WORKSHOP DA REDE DE
NANOTECNOLOGIA APLICADA AO AGRONEGÓCIO**

Maria Alice Martins
Odílio Benedito Garrido de Assis
Caue Ribeiro
Luiz Henrique Capparelli Mattoso

Editores

Embrapa Instrumentação
São Carlos, SP
2013

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação

Rua XV de Novembro, 1452
Caixa Postal 741
CEP 13560-970 - São Carlos-SP
Fone: (16) 2107 2800
Fax: (16) 2107 2902
www.cnpdia.embrapa.br
E-mail: cnpdia.sac@embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: João de Mendonça Naime
Membros: Dra. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori
Dr. Washington Luiz de Barros Melo
Sandra Protter Gouvea
Valéria de Fátima Cardoso
Membro Suplente: Dra. Lucimara Aparecida Forato

Revisor editorial: Valéria de Fátima Cardoso
Capa - Desenvolvimento: NCO; criação: Ângela Beatriz De Grandi
Imagem da capa: Imagem de MEV-FEG de Titanato de potássio – Henrique Aparecido de Jesus
Loures Mourão, Viviane Soares

1ª edição

1ª impressão (2013): tiragem 50

Todos os direitos reservados.
A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).
CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Instrumentação

Anais do VII Workshop da rede de nanotecnologia aplicada ao agronegócio –
2012 - São Carlos: Embrapa, 2012.

Irregular
ISSN 2175-8395

1. Nanotecnologia – Evento. I. Martins, Maria Alice. II. Assis, Odílio Benedito Garrido de.
III. Ribeiro, Caue. IV. Mattoso, Luiz Henrique Capparelli. V. Embrapa Instrumentação.

© Embrapa 2013

EXPRESSÃO GÊNICA DE BIOMARCADORES DE ESTRESSE E MULTIPOTÊNCIA EM EMBRIÕES MAMÍFEROS EXPOSTOS À NANOFIBRAS DE CELULOSE E À NANOTUBOS DE CARBONO

Michele Munk Pereira, Juliana Gern, Nádia Rezende Barbosa Raposo, Eliza Diniz de Souza, Luiz Henrique Capparelli Mattoso, Luiz Sérgio de Almeida Camargo, Luiz Orlando Ladeira, Humberto de Mello Brandão

Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, MG. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP. Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG.

mimunkbio@gmail.com; humberto.brandao@embrapa.br

Projeto Componente: PC6 **Plano de Ação:** PA4

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o desenvolvimento e a expressão gênica em embriões bovinos produzidos *in vitro* expostos a nanofibras de celulose (NFC) e a nanotubos de carbono multicamadas funcionalizados (MWCNT-COOH). Foram avaliadas as taxas de eclosão, degeneração e a expressão de genes biomarcadores de estresse celular, apoptose (PRDX1, HSP70.1 e BAX) e multipotência celular (HAD1, OCT4), após exposição a $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NFC ou MWCNT-COOH por 72h. Nas condições testadas, os nanomateriais não alteraram a cinética de desenvolvimento e sobrevivência embrionária. Contudo, os MWCNT-COOH apresentaram maior impacto na expressão gênica quando comparados as NFC.

Palavras-chave: embriotoxicidade, nanotoxicologia, biomarcadores.

Introdução

O desenvolvimento da nanotecnologia está relacionado, atualmente, à padronização de sistemas para avaliar o potencial impacto dos nanomateriais na saúde humana e ambiental.

Embriões bovinos são interessantes como modelos experimentais, pois podem ser produzidos *in vitro* em larga escala e possuem permissão ética, por serem provenientes de oócitos obtidos de ovários coletados em matadouro. Além disso, embriões bovinos cultivados *in vitro* são sensíveis a alterações no ambiente, tais como temperatura, pH e nutrientes (CAMARGO et al., 2006), o que possibilita avaliar a toxicidade de substâncias de interesse.

Comparativamente aos embriões humanos, os bovinos apresentam o mesmo diâmetro e similaridades metabólicas, de reprogramação genética e ativação genômica (BAUMANN et al. 2007; LEIDENFROST et al, 2011). O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão gênica de embriões bovinos produzidos *in vitro* e expostos a

nanofibras de celulose (NFC) e a nanotubos de carbono multicamadas funcionalizados (MWCNT-COOH) utilizando biomarcadores relacionados ao estresse celular e apoptose (PRDX1, HSP70.1 e BAX) e multipotência celular (HAD1, OCT4).

Materiais e métodos

O ócitos imaturos foram obtidos de ovários coletados de animais abatidos e maturados *in vitro* em meio TCM199, adicionado de hormônio foliculo estimulante e soro de vaca em cio em incubadora com 5% de CO₂, ar atmosférico e 39°C, por 24 h. Ao término da maturação, os oócitos foram fecundados *in vitro* com doses de sêmen congelado de touros na concentração de $2 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$. Após a fecundação, os possíveis zigotos foram transferidos para meio de cultivo embrionário CR2aa suplementado com 10% de soro fetal bovino, em incubadora com 5% CO₂, ar atmosférico e umidade saturada, por 7 dias.

Posteriormente, os embriões foram divididos em 3 grupos: controle, expostos a $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NFC ou MWCNT-COOH por 72 h.

As taxas de eclosão e degeneração foram avaliadas com o auxílio de estereomicroscópio (Olympus, SZ40, Washington, EUA). A extração do RNA foi realizada utilizando-se o kit comercial *RNeasy Micro kit* (Qiagen). A transcrição reversa foi obtida com o kit comercial *SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix* (Invitrogen), produzindo um volume final de $20 \mu\text{L}$ (~ 14.000 ng) de cDNA por reação. A PCR em tempo real foi realizada utilizando-se o kit comercial *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). A reação contendo cDNA, par de primers, Master Mix (dNTPs, referência passiva-ROX, SYBER Green) e $0,1$ U de Taq DNA Polimerase, em um volume final de $25 \mu\text{L}$, foi incubada a 95°C por 10 min, seguido de 45 ciclos de 95°C por 15 seg, temperatura de pareamento específica para cada primer por 30 segundos e extensão a 60°C por 30 seg. Controles negativos foram preparados em que o cDNA foi omitido durante a reação. Foram feitas reações em triplicata para cada amostra (de todos os grupos) das respectivas repetições em placas ópticas de reação de 96 poços (Applied Biosystems) e amplificadas no aparelho de PCR em tempo real (ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems, Applied Biosystems). Para a análise estatística das taxas de eclosão e degeneração foi utilizado o Qui quadrado. Os dados obtidos da quantificação relativa da PCR em tempo real foram analisados pelo *Relative Expression Software Tool* (REST®). Os valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos. Os resultados foram apresentados como médias \pm erro padrão (EP) da média.

Resultados e discussão

Não houve diferença ($P > 0,05$) nas taxas de eclosão e degeneração nos embriões expostos a NFC ou MWCNT-COOH após 72h (Tab. 1 e Fig.1).

Tab. 1 Taxa de eclosão e degeneração de embriões bovinos cultivados *in vitro* e expostos a $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NFC ou MWCNT-COOH por 72 h.

N	Grupos	Eclosão (%)	Degeneração (%)
43	Controle	60,76	5,15
41	NFC	53,90	4,22
46	MWCNT-COOH	57,08	5,82

Não houve diferenças entre os grupos ($P > 0,05$). N = número de embriões

As taxas de eclosão e degeneração são alguns dos parâmetros de avaliação da qualidade das condições de cultura *in vitro* em embriões (LEIDENFROST et al., 2011). Desta forma, a manutenção destas taxas sugere que os nanomateriais avaliados não influenciaram a cinética de desenvolvimento e a sobrevivência embrionária, nas condições testadas.

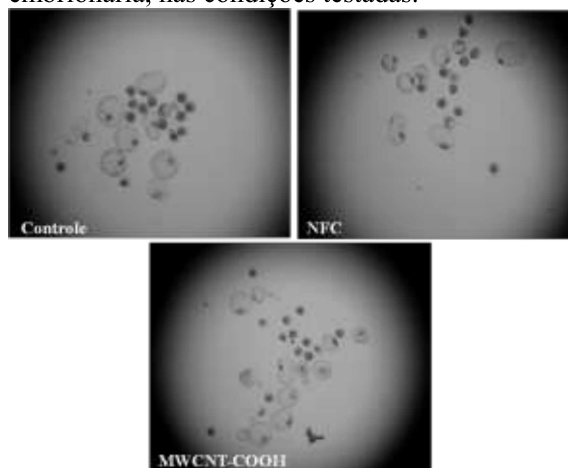


Fig. 1 Fotomicrografia de embriões bovinos, controle, expostos a $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NFC e a $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de MWCNT-COOH. Aumento de 40x.

Contudo, as análises de expressão gênica revelaram que o contato dos nanomateriais com os embriões podem modificar a abundância de alguns transcritos. Em embriões expostos a $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NFC, apenas o gene *OCT4* ($0,67 \pm 0,22$) foi sub-regulado ($P < 0,05$) comparado ao controle (Fig. 2). Outros estudos observaram que a exposição de embriões humanos a agentes teratogênicos como o etanol induz a sub-regulação de *OCT4* (HALDER et al., 2013). Esse gene é um marcador de multipotencialidade e sua desregulação pode ocasionar alterações no desenvolvimento embrionário (ADACHI et al., 2010) Os genes *PRDX1*, *HSP70.1*, *BAX* e *HADI* não tiveram a expressão alterada ($P > 0,05$). De forma semelhante, em fibroblastos bovinos cultivados *in vitro* expostos a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NFC não houve alteração da expressão de genes relacionados ao estresse celular ou a apoptose (PEREIRA et al., 2013).

Por outro lado, a exposição dos embriões a $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de MWCNT-COOH causou maior alteração na expressão dos genes avaliados. Embriões tratados com MWCNT-COOH demonstraram altos níveis ($P < 0,05$) de transcritos relacionados à resposta ao estresse oxidativo e indução da apoptose como *PRDX1* ($1,30 \pm 0,46$) e

BAX ($1,66 \pm 0,57$) bem como marcadores de multipotência embrionária como *HAD1* ($1,39 \pm 0,45$) e *OCT4* ($1,30 \pm 0,40$) (Fig. 2).

Quando comparada a expressão relativa entre os dois nanomateriais, verificou-se a maior abundância de RNAm do gene *HAD1* ($1,39 \pm 0,45$; $P < 0,05$) em embriões expostos a MWCNT-COOH (Fig. 2).

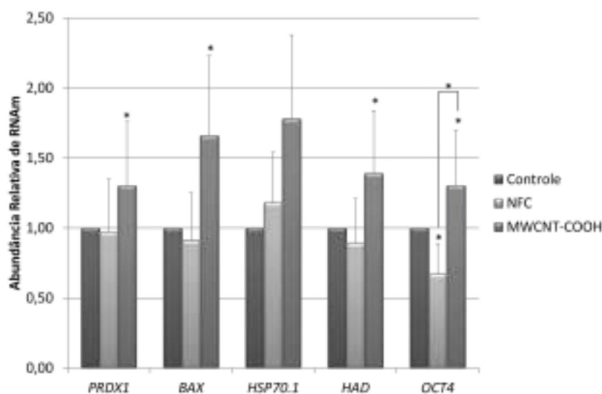


Fig. 2 Expressão relativa (média±EP) dos transcritos para Peroxiredoxina 1 (*PRDX1*), *B cell leukemia 2 associated X protein* (*BAX*), *Heat shock protein 70.1* (*HSP70.1*), Histona deacetilase 1 (*HAD1*) e *Octamero-binding transcription factor 4* (*OCT4*) em embriões bovinos cultivados sem nanomateriais (grupo controle), e com NFC ou MWCNT-COOH ($0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$). A expressão dos grupos CNF ou MWCNT-COOH foram comparadas com o grupo controle (expressão relativa = 1,00). * $P > 0,05$.

Assim, os resultados da PCR em tempo real demonstraram que MWCNT-COOH alteraram de forma mais acentuada a expressão de biomarcadores importantes para a homeostase e desenvolvimento embrionário que as NFC.

Conclusões

Nas condições analíticas testadas, as NFC e os MWCNT-COOH não alteraram a cinética de desenvolvimento e sobrevivência embrionária. Contudo, os MWCNT-COOH apresentaram maior impacto na expressão de genes relacionados ao estresse celular e apoptose em embriões bovinos cultivados *in vitro* quando comparados às NFC.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, Finep, Capes e Projeto MP1 Rede Agronano – Embrapa. À CAPES Rede Nanobiotec-Brasil (Edital CAPES04/CII-2008), CNPQ, FINEP, EMBRAPA, Rede AgroNano e ao Laboratório

Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio (LNNA).

Referências

ADACHI, K.; SUEMORI, H.; YASUDA, S.; NAKATSUJI, N.; KAWASE, E. Role of SOX2 in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells. *Genes to Cells*, v. 15, p. 455–469, 2010.

BAUMANN, C.G.; MORRIS, D.G.; SREENAN J.M.; LEESE, H.J. The quiet embryo hypothesis: molecular characteristics favoring viability. *Molecular Reproduction and Development*, v. 74, p. 1345-1353, 2007.

CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; SÁ, W. F.; FERREIRA, A.M.; RAMOS, A.A.; VALE FILHO, V.R. Factors influencing in vitro embryo production. *Animal Reproduction*, v. 3, p. 19-28, 2006.

HALDER, D.; PARK, J.H.; CHOI, M.R.; CHAI, J.C.; LEE, Y.S.; MANDAL, C.; JUNG, K.H.; CHAI, Y.G. Chronic ethanol exposure increases gooseoid (GSC) expression in human embryonic carcinoma cell differentiation. *Journal of Applied Toxicology*, 2013.

LEIDENFROST, S.; BOELHAUVE, M.; REICHENBACH, M.; GÜNGÖR, T.; REICHENBACH, H.D.; SINOWATZ, F.; WOLF, E.; HABERMANN, F.A. Cell arrest and cell death in mammalian preimplantation development: lessons from the bovine model. *PLoS One*, v. 6, n. 7, p. e22121, 2011.

PEREIRA, M.M.; BARBOSA, N.R.; BRAYNER, R.; TEIXEIRA, E.M.; OLIVEIRA, V.; QUINTÃO, C.C.R.; CAMARGO, L.S.A.; MATTOSO, L.H.C.; BRANDÃO, H.M. Cytotoxicity and expression of genes involved in the cellular stress response and apoptosis in mammalian fibroblast exposed to cotton cellulose nanofibers. *Nanotechnology*, v. 24, p. 075103, 2013.