

## DIFERENTES MÉTODOS DE TRATAMENTO DE CÉLULAS DA GRANULOSA PARA ESTUDO DO CONTROLE DA OVULAÇÃO

BIANCA DA SILVA AMARAL<sup>1</sup>; CRISTINA SANGOI HAAS<sup>2</sup>; CAMILA AMARAL D'AVILA<sup>3</sup>; FABIANE P. MORAES<sup>4</sup>; ARNALDO DINIZ VIEIRA<sup>5</sup>; BERNARDO GARZIERA GASPERIN<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas, ReproPEL – biancaamaral-cavg@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas, ReproPEL - cristinasangoi@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas, ReproPEL - camila.amaral.davila@hotmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas, ReproPEL - fabypmoraes@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas, ReproPEL - vieira\_ad@yahoo.com.br

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas, ReproPEL – bbgasperin@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

Os fatores produzidos pelos oócitos e demais células foliculares desempenham papéis importantes na regulação das funções ovarianas (revisado por JUENGEL et al., 2018) e, ao contrário do controle endócrino da reprodução, ainda não estão bem estabelecidos. Estudos sobre o desenvolvimento folicular e ovulação muitas vezes avaliam a expressão gênica das células da granulosa (CG) (ROVANI et al., 2017). Entretanto, após a aspiração folicular para obtenção das CG, é frequente a presença de eritrócitos e coágulos, que dificultam a extração de RNA e prejudicam a qualidade das amostras.

Diversas são as possibilidades para coleta e processamento das células da granulosa anteriormente à extração de RNA. Dentre as alternativas podemos citar: utilização de tampão de lise de células sanguíneas; coleta em reagente específico para extração de RNA ou armazenamento em tampão de preservação de RNA, como o RNA later. Portanto, o objetivo do presente estudo foi determinar o protocolo de coleta de células da granulosa mais adequado para estudos de expressão gênica, utilizando o modelo bovino. Uma metodologia apropriada para esse tipo de experimento pode facilitar os estudos para melhorar a compreensão da função ovariana, especialmente quanto à regulação de genes envolvidos no processo ovulatório.

### 2. METODOLOGIA

Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel. Após a aspiração folicular e centrifugação, foram separados o fluido folicular (FF) e o pellet de células foliculares. Com o objetivo de testar metodologias de coleta para serem utilizadas em estudos de expressão gênica, as amostras foram distribuídas aleatoriamente em cinco protocolos distintos: Grupo controle: Pellet celular puro no nitrogênio líquido (NL2; controle; n=4); Grupo Trizol: as amostras (n=3) foram centrifugadas, o sobrenadante descartado, e o pellet ressuspense em 250 µl de Trizol®; Grupo tampão de lise de eritrócito (TLE-R7757): as amostras (n=5) foram centrifugadas, o sobrenadante descartado, e foi adicionado 200 µL de tampão (R7757 Sigma® Aldrich) ao pellet de células, realizada a homogeneização com pipetador e, após, adicionou-se 1000 µL de salina (NaCl 0,9%) sobre o pellet com o buffer e foi realizada a centrifugação. Posteriormente, foi retirado o sobrenadante do pellet celular formado e este foi ressuspense em 200 µL de Trizol®; Grupo tampão de lise de eritrócitos CSH: as amostras (n=3) foram centrifugadas e o sobrenadante

foi descartado. Após, o pellet formado foi ressuspenso em 1,5 mL do tampão de lise celular de eritrócitos “Red Blood Cell Lysis Buffer, (2006)” descrito pelo Cold Spring Harbor. Após incubação (5 min à temperatura ambiente), foi realizada nova centrifugação por 5 min. O sobrenadante foi retirado e o pellet ressuspenso em 200 µL de Trizol®; Grupo RNA later: as amostras (n=5) foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. Após, foi ressuspenso o pellet celular em 200 µL de solução de NaCl 0,9% e novamente centrifugado por 3 min. O pellet ressuspenso em 200 µL de RNA later (R090 Sigma® Aldrich). Todas as amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido, exceto as do grupo RNA Later, que foram armazenadas a -20°C até a extração de RNA. A quantificação do RNA extraído e avaliação da pureza, foi realizada através de espectrofotômetro, considerando a taxa de absorção da relação OD260/OD280.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Da mesma forma como observado em estudos anteriores do nosso grupo, as células foliculares coletadas e armazenadas imediatamente em NL2 (grupo controle), embora tenham sido extraídas da mesma forma que nos demais grupos, não apresentaram quantidade de RNA satisfatório para expressão gênica. É provável que a presença de células sanguíneas e coágulo tenham prejudicado a ação dos reagentes utilizados na extração. Da mesma forma, uma das amostras tratadas diretamente no reagente específico para a extração de RNA (Trizol), também não apresentou níveis detectáveis de expressão de três genes de referência e, portanto, as amostras do grupo Trizol não foram analisadas. É possível que a adoção de protocolos mais atuais, que minimizam a presença de contaminantes, possibilite uma melhor qualidade de RNA conforme sugerem Toni et al. (2018).

Para evitar a coagulação e induzir a ruptura das células sanguíneas, foram utilizados dois tampões de lise de eritrócitos. Foi possível observar que o tratamento dos pellets celulares com os tampões de lise possibilitou uma melhor extração de RNA, obtendo-se quantidade e pureza adequadas para as análises moleculares. Também foi possível observar que os genes de referência *18S rRNA* e *RPL19* foram expressos antecipadamente quando foram utilizados os tampões de lise em comparação com a utilização de RNA later. Já a utilização de RNA later possibilitou a obtenção de quantidade adequada de RNA para o estudo de expressão gênica, entretanto, as amostras apresentaram expressão dos genes de referência mais tardia em relação aos demais grupos. É possível que, apesar deste produto ser indicado para preservar a qualidade do RNA, não impede a formação de coágulos.

### 4. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo indicam que o tratamento das células da granulosa, após aspiração folicular, com tampão de lise de eritrócitos possibilita uma melhor qualidade de RNA extraído para estudos de expressão gênica. A utilização de uma metodologia apropriada pode facilitar os estudos para melhorar a compreensão da regulação de genes envolvidos no processo ovulatório.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

JUENGEL, J.L.; SMITH, P. R.; QUIRKE, D. L.; FRENCH, C. M.; EDWARDS, J. S. The local regulation of folliculogenesis by members of the transforming growth factor superfamily and its relevance for advanced breeding programmes. **Animal Reproduction**. Belo Horizonte. v. 15, n. 3, p. 180-190, 2018.

TONI, L.S. .; GARCIA, A.M.; JEFFREY, D.A.; JIANG, X.; STAUFFER, B.L.; MIYAMOTO, S.D; SUCHAROV, C.C. Optimization of phenol-chloroform RNA extraction. **MethodsX**, v. 5, p. 599–608, 2018.

**Red Blood Cell Lysis Buffer**. Cold Spring Harbor Protocols, v. 2006, n. 1, p. pdb.rec390, June 1, 2006. Online. Disponível em: <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.rec390.short>

ROVANI, M. T.; GASPERIN, B. T.; FERREIRA, R.; DUGGAVATHI, R.; BORDIGNON, V.; GONÇALVES, P. B. D. et al. Methods to study ovarian function in monovulatory species using the cow as a model. **Animal Reproduction**. Belo Horizonte. v. 14, n.2, p.383-391, 2017.