

Expressão da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) em embriões bovinos produzidos *in vitro*. Resultados preliminares

Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by *in vitro* produced bovine embryos. Preliminary results

Rosa M. Pereira^{1*}, Jorge Pimenta², Jorg D. Becker³, Maria C. Baptista¹, Maria I. Vasques¹,
António E. Horta¹, Carla C. Marques¹

¹ Departamento de Reprodução Animal e ² Departamento de Genética e Melhoramento Animal, Estação Zootécnica Nacional – INIAP, 2005-048 Vale de Santarém, Portugal.

³ Affymetrix Core Facility, Instituto Gulbenkian de Ciência, R. Quinta Grande, nº 6, 2780-156 Oeiras, Portugal.

Resumo: Neste estudo foi investigada a expressão das duas isoformas do enzima ciclo-oxigenase, ciclo-oxigenase-1 (COX-1) e ciclo-oxigenase-2 (COX-2), em embriões bovinos produzidos *in vitro*. Os oócitos, aspirados de ovários provenientes do matadouro, foram maturados e fertilizados *in vitro* e os presumíveis zigotos cultivados em monocamadas de células da granulosa com TCM199+10% de soro de vaca superovulada em cio durante 12 dias. Procedeu-se à extração e RT-PCR (Reverse transcriptase-Polymerase chain reaction ou Transcriptase reversa-Reacção em cadeia da polimerase) do RNA de embriões nos estádios de blastócisto expandido (n=30) e eclodido (n=16). Utilizaram-se iniciadores específicos para o COX-1 e COX-2, assim como para a β -actina bovina, que constituiu o controlo positivo. O produto amplificado foi avaliado num Agilent Bioanalyzer. A taxa de embriões produzidos foi de $33,7 \pm 4,0$ % e a taxa de embriões eclodidos de $59,6 \pm 6,8$ %. Estes embriões no estádio de blastócito eclodido expressavam a COX-2, mas não a COX-1, enquanto que no estádio de blastócito expandido não foi identificada a expressão de nenhuma das enzimas. A β -actina foi expressa em ambos os estádios. Os presentes resultados demonstram que os embriões bovinos produzidos *in vitro* expressam a COX-2 apontando para a importância da via metabólica do ácido araquidónico no desenvolvimento embrionário preimplantatório.

Palavras chave: COX-2, embriões, *in vitro*, bovinos

Summary: Expression of the two isoforms of cyclooxygenase enzyme, cyclooxygenase-1 (COX-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2), by *in vitro* produced bovine embryos was examined. Cumulus-oocyte complexes were recovered from ovaries of slaughtered animals and subsequently *in vitro* matured and *in vitro* fertilized. Presumptive zygotes were cultured in serum containing medium (TCM 199+10% bovine superovulated oestrus serum) on a granulosa cell monolayer for 12 days. RNA from expanded (n=30) and hatched (n=16) blastocysts were extracted and transcribed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Specific primers either for COX-1 and COX-2 or for positive control bovine β -actin were used. Amplified product was evaluated on an Agilent Bioanalyzer. Embryo production and hatched rates were 33.7 ± 4.0 % and 59.6 ± 6.8 %, respectively. COX-2 but not COX-1 was expressed in hatched embryos.

None of the enzyme isoforms were expressed at the expanded blastocyst stage, while bovine β -actin was expressed at both stages of embryo development. The results presented indicate that COX-2 is expressed by *in vitro* produced bovine embryos, emphasizing the importance of the arachidonic acid metabolic pathway on the development of preimplantation embryos.

Key words: COX-2, embryos, *in vitro*, bovine

Introdução

As prostaglandinas (PG) têm sido implicadas em vários processos do desenvolvimento embrionário precoce, nomeadamente na expansão e eclosão dos blastócitos (Biggers et al., 1978; Lewis, 1986 e 1989). A ciclo-oxigenase (COX) é o enzima responsável pela metabolização do ácido araquidónico em PGH₂, precursor de todas as PG. A COX foi identificada nos embriões bovinos logo a partir do estádio de 2 células apresentando, no entanto, uma expressão transitória associada às primeiras clivagens e decrescendo no estádio de mórula (Gurevich et al., 1994). Um segundo pico de expressão da COX poderá existir nos embriões bovinos uma vez que foi detectada uma produção crescente de PG a partir da eclosão da zona pelúcida até à implantação (Shemesh et al., 1979; Lewis et al., 1982).

A COX apresenta duas isoformas, a COX-1 e a COX-2, com constituições e funções diferentes. A COX-1 é expressa constitutivamente e a sua expressão parece ser relativamente independente dos estímulos. Já a COX-2, identificada mais recentemente, pode ser induzida por vários factores como as citocinas, factores de crescimento ou outros (Kniss, 1999). A importância relativa da expressão e função das duas isoformas da COX no desenvolvimento embrionário precoce é pouco conhecida. Charpigny et al. (1997) demonstraram

*Correspondência: email: rosalnp@hotmail.com Fax: 351 243 767 307; Telefone: 351 243 767 316.

que a COX-2 é altamente expressa em embriões ovinos do dia 8 ao 17 de desenvolvimento, enquanto a COX-1 é indetectável durante o mesmo período, sugerindo uma função para a COX-2 na eclosão e posterior implantação dos embriões.

O objectivo deste estudo foi identificar a expressão das duas isoformas da COX, COX-1 e COX-2, em embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Material e Métodos

Produção *in vitro* de embriões

A produção *in vitro* de embriões foi realizada a partir de oócitos aspirados de ovários bovinos provenientes de um matadouro próximo, segundo técnica descrita por Pereira (2001). Resumidamente, os complexos cumulus-oócitos aspirados, após selecção, foram colocados para maturação em meio de cultura (TCM199 - GibCo, ref. 22340-020 + 10% de soro de vaca superovulada em cio (SOCS) + 100 UI mL⁻¹ de penicilina e 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina - Sigma, ref. P-0781) em estufa incubadora a 39° C, com 5% de CO₂ e saturada de humidade durante 22 a 24 horas. Após este período, os oócitos maturados foram inseminados (D0=dia da inseminação) com sêmen bovino descongelado e submetido a um processo de “swim-up” em meio Talp (meio modificado de Tyrode) com cafeína (2.4 mM, Sigma, ref. C-0750). A fertilização foi realizada em gotas de 40 µL de meio de fertilização constituído por meio TALP suplementado com 30 µg mL⁻¹ de heparina (Sigma, ref. H-3393), 10 mM penicilamina (Sigma, ref. P-4875), 20 mM de hipotaurina (Sigma, ref. H-1384) e 0,25 mM de epinefrina (Sigma, ref. E-1635) submersas em óleo mineral (Sigma, ref. M-8410). Os oócitos (10 por gota) e espermatozoides (1×10⁶ mL⁻¹) permaneceram 22 horas neste meio, após o que foram transferidos para monocamadas de células da granulosa. Os embriões prosseguiram o seu desenvolvimento *in vitro* até ao estadio de blastócito (BL) eclodido (dia 9 e 10 de cultura). Nos dias 7 e 8, foram retirados da cultura embriões no estadio de blastócito expandido e, nos dias 9 e 10, no estadio de blastócito eclodido que foram lavados três vezes numa solução de PBS suplementada com 0,1% de álcool polivinílico (PVA; Sigma ref. P-8136). Após a lavagem, procedeu-se à congelação dos embriões neste meio em palhinhas de 0,25 ml em azoto líquido. Apenas foram congelados para o PCR embriões de boa qualidade e proveniente de sessões de produção *in vitro* com taxas de pelo menos 57% de clivagem e 20% de embriões.

Extracção do RNA e RT-PCR

Os embriões nos estadios de blastócistos expandidos (n=30) e eclodidos (n=16) foram descongelados, procedendo-se à extracção do RNA total, segundo o protocolo estabelecido no Mini RNA Isolation Kit (Zymo

Research, ref. R1006). Ao RNA eluído foi adicionada 1 U de um inibidor de RNases (Ambion RNase Inhibitor, ref. 2682) e, posteriormente, avaliada a sua concentração com auxílio de um espectrofotómetro (Nanodrop, ND-1000), assim como a integridade das suas unidades ribossomais 18 S e 28 S usando o RNA 6000 Nano Assay do Agilent 2100 Bioanalyzer. Para a remoção do DNA genómico utilizaram-se 2 U de DNase I (Ambion, ref. 2226G Ambion) seguindo as normas do fabricante (para incubação e inactivação do enzima). A precipitação do RNA total foi posteriormente realizada com 25 µl de NH₄OAc a 7.5 M (Sigma, ref. A-2706), 125 µl de etanol (Merck ref. 1.00983.100) e 0.5 µl de glicogénio (5 mg/ml, Ambion ref. 9510) a -20°C durante 2 horas. Após centrifugação e lavagem, o *pellet* obtido foi dissolvido em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC; Ambion ref. 9915G) e avaliada a concentração do RNA total precipitado obtido em cada estadio do desenvolvimento embrionário (Nanodrop ND-1000).

A produção da 1^a cadeia de DNA complementar (cDNA) foi realizada partindo de 8 µl de RNA total extraído e com recurso à enzima *Superscript II* (Superscript first strand synthesis for RT PCR, Invitrogen, ref. 11904-018) e a hexâmeros aleatórios fornecidos no Kit.

A expressão dos genes da COX-1 e da COX-2 foi determinada, respectivamente, pela amplificação por PCR de uma região do cDNA da COX-1, com 777 pb (Genebank, AF004943) e da COX-2, com 449 pb (Genebank, AF004944). Para tal utilizaram-se iniciadores específicos: COX-1, sense com a sequência 5'-CAT GGC GAT GCG GTT GC-3' e o antisense com a sequência 5'-TCC AAC CTT ATC CCC AGC C-3'; COX-2 sense com a sequência 5'-TCT TTG ACT GTG GGA GGA TAC A-3' e o antisense com a sequência 5'-TCC AGA TCA CAT TTG ATT GAC A-3', partindo de um volume de 2 µl de cDNA (em cadeia simples) e seguindo as restantes condições descritas por Anselin et al. (1997) para a reacção de PCR. As mesmas condições foram também usadas para a amplificação da sequência da β-actina bovina que constituiu o controlo positivo. Os iniciadores utilizados foram todos adquiridos à Bio-Portugal, sendo a sequência dos da β-actina 5'-CAA CTG GGA CGA CAT GGA GAA GAT CTG GCA-3' para o sense, e 5'-GAG GAT CTT CAT GAG GTA GTC TGT CAG GTC-3' para o antisense. Os produtos amplificados (1 µL de cada) foram avaliados num Agilent 2100 Bioanalyzer usando o DNA 7500 Assay.

Resultados

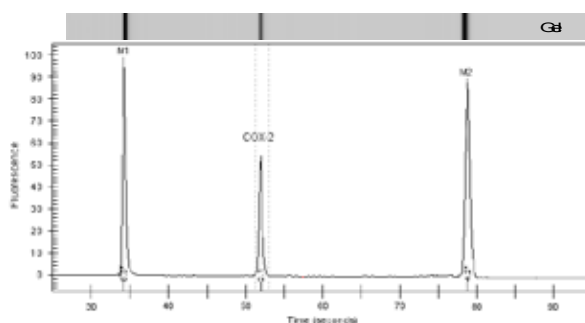
As taxas da produção de embriões obtidos nas 6 sessões realizadas estão representadas na tabela 1.

O método descrito permitiu extrair 85,6 ng/µl de RNA total dos BL expandidos e 23,4 ng/µl de RNA total dos BL eclodidos com a integridade necessária para prosseguir para o RT-PCR. Os produtos amplificados, avaliados no Bioanalyzer, mostraram existir expressão

da COX-2 (figura 1), mas não da COX-1 nos embriões no estadio de BL eclodido. No estadio de BL expandido não houve expressão da COX-1 nem da COX-2. A β -actina foi expressa em ambos os estadios de BL expandido e eclodido.

Tabela 1. Produção *in vitro* de embriões em co-cultura com células da granulosa (6 réplicas).

	n	Taxa (média \pm s.e.m.) %
Clivagem	676	74,4 \pm 2,1
Embriões D7/D8	214	33,7 \pm 4,0
Embriões eclodidos	99	59,6 \pm 6,8



Pico	Tempo (s)	Área	Tamanho (pb)	Concentração (ng/ μ l)
M1 (marcador)	34,20	43,20	50	8,3
COX-2	51,95	24,19	441	2,1
M2 (marcador)	78,75	56,18	10380	4,2

Figura 1. Identificação da expressão do mRNA para o enzima ciclo-oxigenase-2 (COX-2) em embriões bovinos produzidos *in vitro*, no estadio de blastócito eclodido, por análise no Bioanalyzer. A avaliação da expressão gênica foi realizada por amplificação do cDNA do gene da COX-2 obtido do RNA total extraído dos embriões.

Discussão

Os resultados deste trabalho demonstram pela primeira vez que embriões bovinos produzidos *in vitro* expressam a isoforma induzida da COX, a COX-2, durante a eclosão. A isoforma constitutiva, COX-1, não é expressa nesta fase. A expressão deste enzima parece apresentar um padrão comum nos embriões dos ruminantes durante a eclosão, pois Charpigny et al. (1997) também detectaram a expressão da COX-2 e não da COX-1 em blastócitos ovinos. Embora a COX-2 apareça geralmente associada aos mecanismos inflamatórios, tem sido recentemente implicada em funções fisiológicas como a ovulação e a maturação dos oócitos (Tsai et al., 1996; Calder et al., 2001) e, também, no transporte de embriões e gâmetas nas trompas de Falópio (Huang et al., 2002). Não existem, no entanto, certezas sobre os factores e mecanismos que induzem a sua expressão.

O facto de não ter sido detectada a expressão da COX-1 nem da COX-2 nos embriões no estadio de BL expandido poderá confirmar os resultados de Gurevich et al. (1994), que referem uma expressão transitória da

COX associada às primeiras clivagens e decrescendo no estadio de mórula em embriões bovinos. No entanto, foi possível localizar a COX no retículo endoplasmático de embriões de rato através de imunocitocoloração intracitoplasmática nos estadios de 2 células, 4-8 células, mórula e também, embora com menor intensidade, no estadio de BL. Estes embriões apresentavam RNAm para a COX1 e COX2 (Sato et al., 1994; Van der Weiden et al., 1996). A avaliação obtida pelo Bioanalyzer da amplificação da sequência da β -actina bovina (controlo positivo) no estadio de BL expandido, ao contrário da do estadio de BL eclodido, identificou apenas um pequeno pico, o que pode sugerir uma menor amplificação neste estadio. A ausência ou possibilidade de menor expressão das COXs durante o estadio de BL expandido deverá ser confirmada.

Posteriormente, a partir do estadio de BL eclodido foi identificada a expressão da COX-2 nos embriões bovinos que, como referido, é acompanhada por uma produção crescente de PG pelos embriões a partir desta fase (Lewis et al., 1982; Shemesh et al., 1979). A importância das PG no mecanismo de eclosão dos embriões já é conhecida desde 1978 quando Biggers et al. verificaram que a presença da indometacina, um inibidor da síntese de PG, diminuía a taxa de eclosão em embriões de rato. O mesmo se verifica em embriões ovinos (Sayre e Lewis, 1993) e bovinos (Pereira, 2001; Pereira et al., 2001). As PG parecem interferir na eclosão através de mecanismos diferentes, apresentando as PG da série E, E1 e E2, um efeito positivo, enquanto que a PGF2 α a prejudica (Sayre e Lewis, 1993; Pereira, 2001; Scenna et al., 2002).

Os conceitos ovinos e bovinos produzem quantidades crescentes de PG da eclosão à implantação que, para além da interferência na eclosão e alongamento dos embriões, participam no reconhecimento materno da gestação (Lewis et al., 1982; Shemesh et al., 1979; Wilson et al., 1992). O facto da COX-2 ser expressa em grande concentração após a eclosão e durante o período de implantação sugere uma importante função das PG sintetizadas pelo embrião na mediação das interacções com o útero (Charpigny et al., 1997).

Os presentes resultados demonstram que os embriões bovinos produzidos *in vitro* expressam a COX-2 apontando para a importância da via metabólica do ácido araquidónico no desenvolvimento embrionário preimplantatário.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio e participação na implementação da técnica de extracção de RNA em embriões aos Srs Prof. Doutor Ana e Pedro João Coutinho do Instituto Gulbenkian da Ciência sem os quais a realização deste trabalho não teria sido possível. Agradecem também a colaboração do Sr. Dr. Mário Filipe que amavelmente disponibilizou o kit para extracção do RNA.

Bibliografia

- Asselin, E., Drolet, P., Fortier, M.A. (1997). Cellular mechanisms involved during oxytocin-induced prostaglandin F2 α production in endometrial epithelial cells *in vitro*: role of cyclooxygenase-2. *Endocrinology*, 138, 4798-4805.
- Biggers, J.D., Leonov, B.V., Baskar, J.F., Fried, J. (1978). Inhibition of hatching of mouse blastocysts *in vitro* by prostaglandin antagonists. *Biol. Reprod.*, 19, 519-533.
- Calder, M.D., Caveney, A.N., Westhusian, M.E., Watson, A.J. (2001). Cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 (PGE2) receptor messenger RNAs are affected by bovine oocyte maturation time and cumulus-oocyte complex quality, and PGE2 induces moderate expansion of the bovine cumulus *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 65, 135-140.
- Charpigny, G., Reinaud, P., Tamby, J.P., Créminon, C., Guillemot, M. (1997). Cyclooxygenase-2 unlike cyclooxygenase-1 is highly expressed in ovine embryos during the implantation period. *Biol. Reprod.*, 57, 1032-1040.
- Gurevich, M., Shemesh, M. (1994). Induction of cyclooxygenase and prostaglandin E2 production by the bovine preembryos. *Reprod. Fertil. Dev.*, 6, 687-691.
- Huang, J.C., Arbag, F., Tumbusch, K.J., Goldsby, J.S., Matijevic-Alerksic, N., Wu, K.K. (2002) Human Fallopian tubes express prostacyclin (PGI) synthase and cyclooxygenase and synthesize abundant PGI. *J. Endocrinol. Metab.*, 87, 4361-4368.
- Kniss, D.A. (1999). Cyclooxygenase in reproductive medicine and biology. *J. Soc. Gynecol. Investig.*, 6, 285-292.
- Lewis, G.S. (1986). Indomethacin inhibits the uptake of ²²sodium by ovine trophoblastic tissue *in vitro*. *Prostaglandins*, 31, 111-122.
- Lewis, G.S. (1989). Prostaglandin secretion by the blastocyst. *J. Reprod. Fert.*, suppl. 37, 261-267.
- Lewis, G.S., Thaxter, W.W., Bazer, F.W., Curl, J.S. (1982). Metabolism of arachidonic acid *in vitro* by bovine blastocyst and endometrium. *Biol. Reprod.*, 27, 431-439.
- Pereira, R.M. (2001). Efeito de células em co-cultura e alterações induzidas na cascata metabólica do ácido araquidônico sobre o desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos. Tese de Doutorado em Ciências Agrárias - Ciências Veterinárias. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. pp. 279.
- Pereira, R.M., Marques, C.C., Baptista, M.C., Vasques, M.I., Horta, A.E.M. (2001). Effect of PGE2 and prostaglandin synthesis inhibition on bovine *in vitro* embryo development. In: *Proc. 3rd. Iberian Congress on Animal Reproduction*. Portuguese Animal Reproduction Society (Ed.), Porto: pp. 375-380.
- Satoh, K., Tsubata, K., Sakamoto, H., Tochigi, M., Hayakawa, S., Miyagawa, Y., Takami, M., Hashimoto, Y., Ige, S., Suzuki, M., Esumi, M., Tsutsumi, O., Yano, T. (1994). Dynamic alteration of metabolism in oocyte at the periferilization period – in reference to prostaglandin involvement. In: *Frontiers in Endocrinology – Perspectives on Assisted Reproduction*. T. Mori, T. Aono, T. Tominaga, M. Hiroi (Ed.), Ares-Serono Symposia Publications, Roma: pp 105-112.
- Sayre, B.L., Lewis, G.S. (1993). Arachidonic acid metabolism during early development of ovine embryos: a possible relationship to shedding of the zona pellucida. *Prostaglandins*, 45, 557-569.
- Scenna, F.N., Hockett, M.E., Backmon, H.E., Schrick, F.N. (2002). Development of *in vivo*-derived bovine embryos cultured with prostaglandin F2 α . *Theriogenology*, 57, 512 abstr.
- Shemesh, M., Milaguir F., Ayalon, N.; Hansen, W. (1979). Steroidogenesis and protaglandin synthesis by cultured bovine blastocysts. *J. Reprod. Fert.*, 56, 181-185.
- Tsai, S.W., Wiltbank, M.C., Bodensteiner, K.J. (1996). Distinct mechanisms regulate induction of messenger ribonucleic acid for prostaglandin (PG) G/H synthase-2, PGE (EP3) receptor, and PGF2 α receptor in bovine preovulatory follicles. *Endocrinology*, 137, 3348-3355.
- Van der Weiden, R.M., Wisse, L.J., Helmerhorst, F.M., Keirse, M.J., Poelmann, R.E. (1996). Immunohistochemical and ultrastructural localization of prostaglandin H synthase in the preimplantation mouse embryo. *J. Reprod. Fert.*, 107, 161-166.
- Wilson, J.M.; Zalesky, D.D.; Looney, C.R.; Bondioli, K.R.; Magness, R.R. (1992). Hormone secretion by preimplantation embryos in a dynamic *in vitro* culture system. *Biol. Reprod.*, 46, 295-300.