

DIFERENTES MÉTODOS PARA PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS DE CÉLULAS DA GRANULOSA OBTIDAS POR ASPIRAÇÃO FOLICULAR PARA A EXTRAÇÃO DE RNA

HAAS, Cristina Sangoi¹;
FERST, Juliana Germano²;
D'ÁVILA, Camila Amaral¹;
MORAES, Fabiane Pereira de¹;
OLIVEIRA, Fernando Caetano de¹;
VARGAS JÚNIOR, Sergio Farias¹;
GONÇALVES, Paulo Bayard Dias²;
GASPERIN, Bernardo Garziera³.

Recebido: 17/01/2019

Aceito: 09.04.2019

¹Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas;

²Laboratório de Reprodução Animal, Universidade Federal de Santa Maria; ³Departamento de Patologia Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

RESUMO

O estudo da expressão gênica das células foliculares pode ser a chave para o entendimento dos processos de crescimento folicular, ovulação e luteinização. As células foliculares de animais podem ser recuperadas *in vivo* através da aspiração folicular (AF) guiada por ultrassonografia, uma alternativa para não submeter as fêmeas ao procedimento cirúrgico de ovariectomia. Entretanto, a AF comumente possibilita a recuperação de uma pequena quantidade de células em fluido folicular, geralmente contaminado por células sanguíneas, o que prejudica a extração de RNA e interfere na qualidade da amostra. No presente estudo foram comparadas a coleta e o armazenamento de células foliculares com solução salina, dois tampões de lise de eritrócitos, ou RNA *later*[®]. Quantidades adequadas de RNA e amostras de melhor qualidade com base na expressão dos genes de referência *18S rRNA*, *GAPDH*, *RPL19* e *PPIB* foram obtidas nas células foliculares tratadas com os dois tampões de lise celular imediatamente após a coleta.

Palavras-chave: Expressão gênica. Extração de RNA. Lise celular. RNA *later*. Trizol.

Nos mamíferos, o controle endócrino da foliculogênese, diferenciação folicular, ovulação e luteinização é bem estabelecido. Entretanto, os mediadores endócrinos interagem com fatores produzidos localmente no ovário. Neste contexto, os fatores produzidos pelos oócitos e demais células foliculares desempenham papéis importantes na regulação das funções ovarianas (FORTUNE et al., 2004). Estudar os fatores produzidos pelas células foliculares pode ser a chave para o entendimento da diferenciação folicular e regulação da ovulação. Uma das formas de estudar a função precisa desses fatores nos processos ovarianos é através de análises moleculares, tais como as de expressão gênica.

A recuperação das células foliculares e do líquido folicular pode ser realizada através de ovariectomia por colpotomia (DROST et al., 1992), que possibilita um melhor isolamento das células foliculares, mas apresenta a desvantagem de ser um procedimento invasivo. Uma alternativa para não submeter as fêmeas a um procedimento cirúrgico é a utilização da aspiração folicular (AF) guiada por ultrassonografia para coleta das células da granulosa e *cumulus oophorus* (ARASHIRO et al., 2013; WHITE et al., 2008). A AF é menos invasiva, mas o procedimento de coleta das células foliculares necessita ser aprimorado, uma vez que são recuperadas poucas células foliculares e grande quantidade de células sanguíneas. Para contornar essa limitação, é necessário reduzir a coagulação das células sanguíneas, o que impossibilita a obtenção de RNA de qualidade. Dentre as alternativas, podemos citar: utilização de tampão de lise de células sanguíneas (SANCHEZ et al., 2014), coleta em reagente específico para extração de RNA ou armazenamento em tampão de preservação de RNA, como o RNA *later*. Com este objetivo, realizou-se um estudo para determinar um protocolo de coleta de células da granulosa adequado para avaliação de regulação gênica de amostras bovinas. Uma metodologia apropriada para esse tipo de experimento pode fornecer subsídios para melhorar a compreensão da função ovariana.

Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEA/UFPEL). Foram utilizadas 20 vacas *Bos taurus taurus* adultas cíclicas, não lactantes e não gestantes, com condição corporal ≥ 3 (escala de 1-5; 1 - muito magra e 5 - obesa). Estes animais foram submetidos a um protocolo convencional de sincronização de estro envolvendo estradiol e progesterona, para induzir a regressão

folicular e uma nova onda de crescimento, e prostaglandina, para promover a luteólise. O implante intravaginal permaneceu por oito dias, até que os folículos em crescimento atingissem um diâmetro entre 11 e 13 mm. Quatro dias após a inserção do dispositivo, iniciou-se o monitoramento diário para identificar um folículo dominante saudável em crescimento, utilizando ultrassonografia transretal com transdutor linear de 6 MHz (*SonoScope A5V*). Todas as estruturas maiores que 4 mm foram identificadas e desenhadas em três cortes esquemáticos dos ovários. Deste modo, os animais que atingiram diâmetro folicular desejado tiveram o folículo de maior diâmetro aspirado sob anestesia epidural utilizando um sistema adaptado que continha uma agulha 40x8 (21G) na extremidade. O sistema foi acoplado a uma guia de biópsia orientada através do ultrassom, utilizando transdutor microconvexo de 5 MHz. Após a aspiração e centrifugação, foram separados o líquido folicular e o *pellet* de células foliculares. Com o objetivo de testar metodologias de coleta de células da granulosa para serem utilizadas em estudos de expressão gênica, os folículos das fêmeas bovinas (n=17) aspirados com sucesso (volume compatível com o diâmetro folicular) foram distribuídos em quatro protocolos distintos. No grupo controle - *pellet* celular puro coletado em solução salina, as amostras (n=4) foram centrifugadas (10 min a 845 G/rcf), o sobrenadante descartado, e os tubos armazenados imediatamente em NL₂. No grupo tampão comercial de lise de eritrócito R7757 (Sigma®), as amostras (n=5) foram centrifugadas (7 min a 845 G/rcf), o sobrenadante descartado, e foi adicionado 200 µL de tampão (R7757 Sigma® Aldrich) ao *pellet* de células e homogeneizado com pipetador durante um minuto. Após esse período, adicionou-se 1000 µL de solução salina (NaCl 0,9%) sobre o *pellet* com o *buffer* e foi realizada a centrifugação por 5 min a 500 G/rcf. Posteriormente, retirou-se o sobrenadante e o *pellet* celular formado foi ressuspensão em 200 µL de Trizol®, sendo homogeneizado com pipetagens e vórtex (40 seg). As amostras foram armazenadas em NL₂. No grupo tampão de lise de eritrócitos CSH (155 mM NH₄Cl, 12 mM NaHCO₃ e 0,1 mM EDTA), as amostras (n=3) foram centrifugadas (7 min a 845 G/rcf) e o sobrenadante foi descartado. Após, o *pellet* formado foi ressuspensão em 1,5 mL de tampão de lise celular de eritrócitos confeccionado segundo o protocolo de *Cold Spring Harbor Protocols* (CSHP, 2006). Em seguida, foi realizada a incubação por 5 min à temperatura ambiente (25 °C) e realizada uma nova centrifugação a 3000 rpm (845 G/rcf) também por 5

min. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* ressuspenso em 200 µL de Trizol®, sendo homogeneizado com pipetagens e vórtex. Essas amostras foram armazenadas em NL₂. No grupo RNA *later*, as amostras (n=5) foram centrifugadas (10 min a 587 G/rcf) e o sobrenadante descartado. Após, foi ressuspenso o *pellet* celular em 200 µL de solução de NaCl 0,9% e novamente centrifugado (587 G/rcf) por 3 min. O sobrenadante foi removido e o *pellet* ressuspenso em 200 µL de RNA *later* (R090 Sigma® Aldrich). As amostras foram armazenadas a -20 °C até a extração de RNA.

Para quantificação da expressão gênica, o RNA total das células coletadas foi extraído utilizando o protocolo Trizol (*Life Technologies*; Cat. 15596026), de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação do RNA extraído foi realizada através de espectrofotômetro, considerando a taxa de absorção da relação OD260/OD280, de forma que não foram utilizadas amostras que continham valores inferiores a 1,6. O RNA total foi tratado com DNase (*Amplification Grade, Life Technologies*). Após a inativação da DNase (65 °C – 10 min), a reação de transcrição reversa foi realizada com o *kit* iScript cDNA Synthesis (BioRad Hercules, CA), conforme instruções do fabricante.

A Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) foi conduzida na máquina CFX384™ (Real Time System, BioRad), usando o fluoróforo BRYT Green® e a Taq DNA Polimerase presentes na GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), e iniciadores específicos para bovinos. Primeiramente, foi feita uma diluição seriada do cDNA a fim de gerar uma curva padrão utilizada para calcular a eficiência da reação. Todas as amostras foram analisadas em duplicata. Foi avaliada a expressão dos genes constitutivos: *PPIB* (F-GGTCATCGGTCTCTTTGGAA e R-TCCTTGATCACACGATGGAA), *GAPDH* (F-GATTGTCAGCAATGCCTCCT e R-GGTCATAAGTCCCTCCACGA), *RPL19* (F-GCCAACTCCCGTCAGCAGA e R-TGGCTGTACCCTCCGCTT) e *18S rRNA* (F-CCTTCCGCGAGGATCCATTG e R-CGCTCCCAAGATCCAACACTAC). As variações nos níveis de expressão foram analisadas por ANOVA, com múltiplas comparações com o teste t de Student. As variáveis contínuas apresentaram distribuição normal. O nível de significância utilizado foi de 5% e os dados são representados como média ± erro padrão da média (EPM). Conforme mencionado anteriormente, estudos *in vivo* e *in vitro* em diferentes espécies

demonstram que o controle autócrino e parácrino da foliculogênese desempenha um papel essencial no desenvolvimento folicular. O modelo bovino possibilita estudos *in vivo* com avaliação da dinâmica folicular e obtenção de amostras através de aspiração folicular guiada por ultrassonografia (ROVANI et al., 2017). No entanto, a coleta por AF muitas vezes resulta em um baixo número de células e contaminação com células sanguíneas, o que prejudica a qualidade da amostra.

No presente estudo, as células foliculares do grupo controle, coletadas e armazenadas imediatamente em NL₂, foram extraídas com protocolo idêntico aos demais grupos, mas não apresentaram quantidade de RNA satisfatório (inferiores a 30 ng/ μ L) para as análises de expressão gênica. Provavelmente este resultado deveu-se à grande quantidade de hemácias presentes no material aspirado.

Com base no exposto acima, foram avaliados os dados apenas das amostras tratadas com tampão de lise de eritrócitos e RNA *later*. Para impedir a coagulação das células sanguíneas e melhorar a qualidade do RNA extraído, foram utilizados os tampões de lise de eritrócitos R7757 e CSH (cloreto de amônio, bicarbonato de sódio e EDTA). Foi possível observar que o tratamento dos *pellets* celulares com os tampões de lise impediu a coagulação das células sanguíneas e possibilitou a extração de RNA de forma adequada, obtendo-se concentração (Figura 1A) e pureza (Figura 1B) de RNA adequados para as análises moleculares. Também foi possível observar que os transcritos dos genes de referência *18S rRNA* e *RPL19* foram amplificados mais precocemente quando foram utilizados os tampões de lise em comparação com a utilização de RNA *later* (Figura 2).

Além da relevância para estudos envolvendo modelos animais, métodos de obtenção de células da granulosa em contato com eritrócitos têm sido avaliados em amostras de fluido folicular humano obtido após aspiração folicular (AGHADAVOD et al., 2015; CHILVER et al., 2012; QUINN et al., 2006). Aghadavod et al. (2015) compararam protocolos de purificação de células da granulosa em amostras de fluido folicular humano utilizando Ficoll®, Percoll® e tampão de lise de eritrócitos e, concordando com os achados do presente estudo, concluíram que o uso de tampão de lise é o método mais conveniente para obtenção de ácidos nucleicos provenientes de células da granulosa contaminadas com eritrócitos.

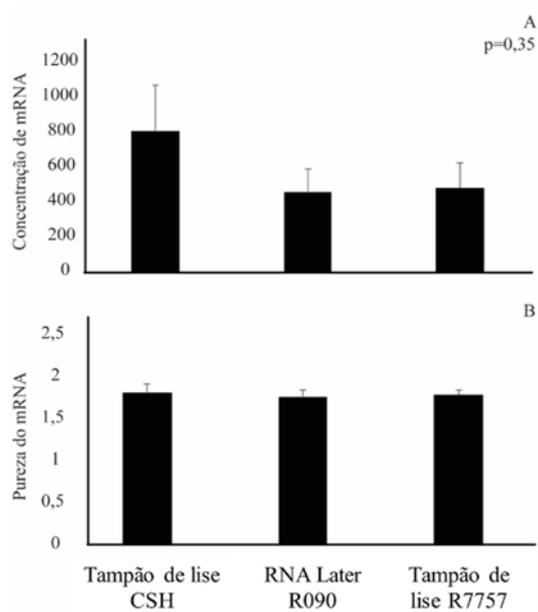


Figura 1 - (A) Concentração de RNA (ng/uL) e (B) pureza do RNA em amostras de células foliculares aspiradas de folículos dominantes, tratadas com diferentes tampões e submetidas à extração de RNA com Trizol.

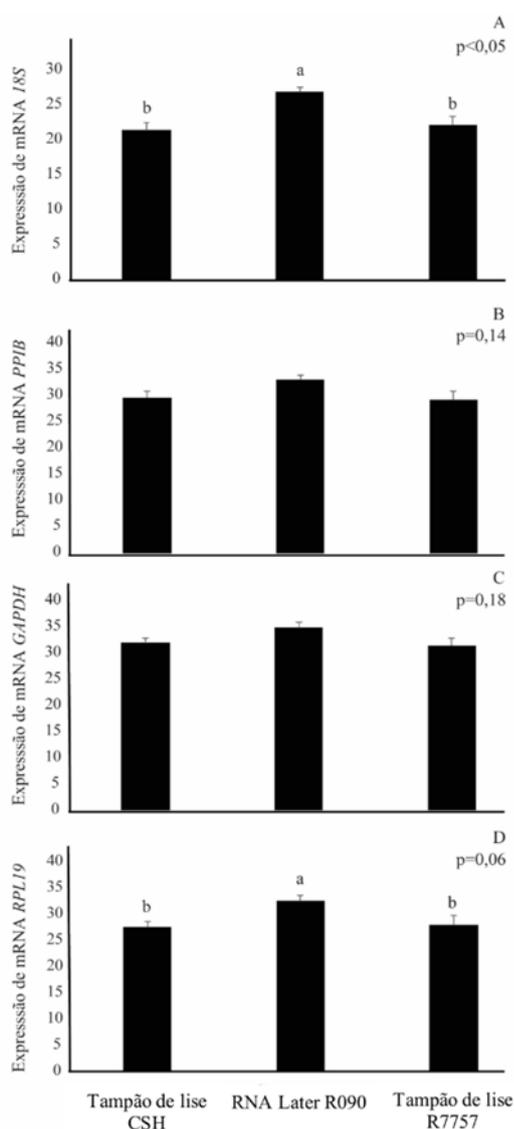


Figura 2 - Média dos ciclos de amplificação dos genes de controle interno *18S rRNA* (A), *PPIB* (B), *GAPDH* (C) e *RPL19* (D) no cDNA de células foliculares coletadas *in vivo* por aspiração folicular guiada por ultrassonografia e submetidas a diferentes técnicas de processamento.

No presente estudo, a utilização do tampão RNA *later* (R090, Sigma) possibilitou a obtenção de RNA para o estudo de expressão gênica. Porém, aparentemente este não é o protocolo mais indicado, pois apresentou amplificação mais tardia dos genes de referência. Além disso, esse produto é indicado para preservar a qualidade do RNA, o que não resolve o problema da contaminação da amostra com as células sanguíneas.

Os resultados encontrados no presente estudo sugerem que o tratamento dos *pellets*

celulares obtidos após aspiração folicular com tampão de lise de eritrócitos possibilita uma melhor qualidade do RNA extraído. Portanto, a utilização desta metodologia possibilitará a coleta de material biológico de maneira minimamente invasiva, fornecendo amostras com melhor qualidade para estudar a regulação da expressão gênica durante a foliculogênese em bovinos.

DIFFERENT METHODS FOR PROCESSING GRANULOSA CELLS OBTAINED THROUGH FOLLICULAR ASPIRATION FOR RNA EXTRACTION

ABSTRACT

Studies investigating gene expression in follicular cells may represent the key to elucidate the mechanisms involved in follicular growth, ovulation and luteinization processes. Follicular cells can be obtained *in vivo* through ovariectomy or ultrasound-guided follicular aspiration (FA), which represents an alternative to surgical procedures. However, FA usually provides a low number of follicular cells contaminated with blood cells, which negatively affect RNA extraction and quality. In the present study, different methods to collect and preserve follicular cells using saline, two different red blood cells lysis buffers or RNA later® were compared. Adequate amounts of RNA and samples with higher quality were obtained when follicular cells were treated with red blood cells lysis buffers immediately after follicular aspiration, as assessed by expression of reference genes *18S rRNA*, *GAPDH*, *RPL19* and *PPIB*.

Keywords: Gene expression. RNA extraction. Cell lysis. RNA later. Trizol.

DIFERENTES MÉTODOS PARA CONSERVACIÓN DE MUESTRAS DE CÉLULAS DE GRANULOSA OBTENIDAS POR ASPIRACIÓN FOLICULAR PARA LA EXTRACCIÓN DE ARN

RESUMEN

El estudio de la expresión génica de las células foliculares puede ser la clave para el entendimiento de los procesos de crecimiento folicular, ovulación y luteinización. Las células foliculares de animales pueden ser recuperadas *in vivo* a través de la aspiración folicular (AF) guiada por ultrasonografía, una alternativa para no someter a las hembras al procedimiento quirúrgico de ovariectomía. Sin embargo, la AF comúnmente posibilita la recuperación de una pequeña cantidad de células en fluido folicular generalmente contaminado por células sanguíneas, lo que perjudica la extracción de RNA e interfiere en la calidad de la muestra. En el presente estudio se compararon la recolección y el almacenamiento de células foliculares con salina, dos tampones de lisis de eritrocitos o RNA later®. Las cantidades adecuadas de ARN y muestras de mejor calidad basadas en la expresión de los genes de referencia *18S rRNA*, *GAPDH*, *RPL19* y *PPIB* se obtuvieron en las células foliculares tratadas con tampón de lisis celular inmediatamente después de la recolección.

Palabras clave: Expresión génica. Extracción de ARN. Lisis celular. ARN later. Trizol.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Edital PRONEX 12/2014, 16/2551-0000494-3). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS

AGHADAVID, E.; ZARGHAMI, N.; FARZADI, L.; et al. Isolation of granulosa cells from follicular fluid; applications in biomedical and molecular biology experiments. **Advanced Biomedical Research**, v. 4, n. 250, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4746942/>> .

ARASHIRO, E. K.; PALHAO, M. P.; WOHLRES-VIANA, S.; et al. *In vivo* collection of follicular

fluid and granulosa cells from individual follicles of different diameters in cattle by an adapted ovum pick-up system. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 11, n. 73, p. 1-8, 2013. doi: <https://doi.org/10.1186/1477-7827-11-73>

CHILVERS, R. A.; BODENBURG, Y. H.; DENNER, L. A.; et al. Development of a novel protocol for isolation and purification of human granulosa cells. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 29, n. 6, p. 547-556, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3370046/#CR10>>.

CSHP - COLD SPRING HARBOR PROTOCOLS. **Red Blood Cell Lysis Buffer**, 2006. Disponível em: <<http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.rec390.full>> .

DROST, M. D.; SAVIO, J. D.; BARROS, C. M.; et al. Ovariectomy by colpotomy in cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 200, n. 3, p. 337-339, 1992. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1548167>> .

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; YANG, M. Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 109-126, 2004. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.031>

ROVANI, M. T.; GASPERIN, B. G.; FERREIRA, R.; et al. Methods to study ovarian function in monovulatory species using the cow as a model. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 2, p. 383-391, 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-AR832>

QUINN, M. C. J.; MCGREGOR, S. B.; STANTON, J. L.; et al. Purification of granulosa cells from human ovarian follicular fluid using granulosa cell aggregates. **Journal of Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, n. 5, p. 501-508, 2006. doi: <https://doi.org/10.1071/RD05051>

SANCHEZ, R.; SCHUERMANN, Y.; GAGNON-DUVAL, L.; et al. Differential abundance of IGF1, bile acids, and the genes involved in their signaling in the dominant follicle microenvironment of lactating cows and nulliparous heifers. **Theriogenology**, v. 81, n. 6, p. 771-779, 2014. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.01.005>

WHITE, F. J.; RUBIO, I.; LENTS, C. A.; et al. Effect of days after calving on insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor binding proteins, progesterone, androstenedione, estradiol, and aromatase mRNA in dominant follicles of postpartum beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 108, n. 3-4, p. 364-374, 2008. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.09.004>

Autor para correspondência:
Bernardo Garziera Gasperin.
Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário,
Capão do Leão (RS), CEP 96160-000.
bggasperin@gmail.com