

CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE FATORES OOCITÁRIOS E PROTEÍNAS RELACIONADAS NAS CÉLULAS DA GRANULOSA E FLUÍDO FOLICULAR DE FÊMEAS BOVINAS

MONIKE QUIRINO DOS SANTOS¹; VITÓRIA GASPERIN GUAZZELLI COSTA²;
CRISTINA SANGOI HAAS³, MONIQUE TOMAZELE ROVANI⁴, VITOR BRAGA RISSI⁵; BERNARDO GARZIERA GASPERIN⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – monikequirino@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – vitoria.guazzelli@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – cristinasangoi@gmail.com

⁴Universidade Federal de Santa Maria – mtrovani@gmail.com

⁵Universidade Federal de Santa Maria - vbragarissi@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – bggasperin@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A emergência folicular caracteriza-se pela determinação do crescimento de um único folículo selecionado e da atresia dos demais folículos presentes no ovário, tendo-se, assim, um folículo dominante e folículos atrésicos, respectivamente. Este processo de crescimento e diferenciação folicular é responsável pela ovulação, sendo que fatores produzidos pelo óvulo são considerados os principais reguladores de tais eventos (GINTHER et al., 1996). O controle autócrino/parácrino da foliculogênese exerce fundamental papel na modulação do desenvolvimento folicular. Neste contexto, sabe-se que todos os folículos estão sob o mesmo ambiente endócrino, e por isto evidencia-se o fato da divergência folicular ser regulada por fatores ovarianos (FORTUNE et al., 2004).

Dentre as principais proteínas oocitárias, destacam-se as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), as quais pertencem à superfamília dos fatores de crescimento transformantes beta (TGF-β), assim como os fatores de crescimento e diferenciação (GDFs; revisado por KNIGHT & GLISTER, 2006). Diversas funções, muitas vezes contraditórias, têm sido atribuídas aos fatores oocitários em relação à diferenciação e esteroidogênese das células da granulosa, a partir de estudos *in vitro*. Porém, resultados de estudos funcionais *in vivo* demonstram o grande potencial dos fatores oocitários BMP15 e GDF9 quanto incremento da taxa ovulatória ou contraceptivo em humanos e animais domésticos. Desta forma, a participação do sistema BMP na regulação parácrina da foliculogênese é incontestável.

Uma alternativa para determinar a função dos membros da família TGF-β ao longo do crescimento folicular consiste na identificação da expressão e regulação destes fatores, bem como de seus respectivos receptores, utilizando modelos *in vivo*. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar a expressão e regulação das proteínas oocitárias no ambiente folicular de bovinos a fim de aprimorar o conhecimento sobre a interação óvulo-células foliculares.

2. METODOLOGIA

Utilizaram-se amostras oriundas de um banco de fluido e células foliculares provenientes do maior e segundo maior folículo de cada fêmea bovina. Estes folículos foram coletados nos dias 2, 3 ou 4 em relação ao início da onda folicular.

Fêmeas cíclicas, foram submetidas a um protocolo hormonal para induzir a regressão folicular e uma nova onda de crescimento folicular. O dia “0” caracterizou-se como o dia da emergência da onda de desenvolvimento folicular, o qual se estabeleceu, de forma retrospectiva, como o último dia em que o folículo dominante possuía diâmetro inferior a 5 mm. Este modelo possibilita avaliar a regulação da expressão de fatores locais antes (dia 2), durante a divergência (dia 3) e após a seleção do folículo dominante (dia 4).

Estes animais foram ovariectomizados, conforme o momento de interesse para a análise de expressão gênica relacionada à ovulação, e após, extraiu-se o RNA total por meio do protocolo Trizol ou colunas de sílica (RNAeasy Mini Kit). A quantificação do RNA extraído ocorreu por meio da determinação de sua densidade óptica (NanoDrop – espectrofotômetro) e da avaliação de pureza, realizada através da taxa de absorção da relação OD260/OD280 (não se utilizaram valores inferiores a 1.8). A fim de digerir qualquer DNA contaminante, o RNA total foi tratado com DNase (Promega, Madison, WI) a 37°C durante 30 min.

Realizou-se, então, a reação de transcrição reversa (kit iScript – BioRad) e, por fim, a expressão relativa dos genes foi realizada por PCR em tempo real (CFX384 real-time PCR; BioRad, Hercules, CA) utilizando SsoFast™ EvaGreen® supermix e primers específicos para bovinos. A variabilidade na quantidade de RNAm foi corrigida pela amplificação dos genes constitutivos GAPDH e ciclofilina. Para a detecção e quantificação proteica no fluido folicular (FF), foi realizada a técnica de Western Blot utilizando anticorpo primário de coelho anti-GDF9 humano (1:500; GTX108410; GeneTex., CA, USA) ou e anticorpo secundário caprino anti-IgG de coelho (1:5000; ab6721; Abcam Inc., USA).

Os resultados de expressão gênica e abundância proteica foram comparados por análise de variância (PROC GLM; General Linear Models Procedure). Foi utilizado como efeito principal os distintos tratamentos e como efeito ao acaso as diferentes replicações. A multi-comparação entre grupos foi realizada pelo teste “t” de Student. Todas as variáveis contínuas foram testadas para normalidade e normalizadas quando necessário de acordo com cada distribuição. Em todas as análises, o nível de significância utilizado foi de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo identificou-se, pela primeira vez, a expressão da BMP1 em ovário bovino, sendo que uma maior expressão deste fator foi observada nos futuros folículos subordinados, anteriormente ao processo de divergência folicular (Figura 1). O estudo da BMP1 fez-se necessário, uma vez que há um único relato de sua expressão em células ovarianas em ovelhas. Os resultados demonstrados neste trabalho não identificaram a regulação na expressão deste fator na expressão nos dias 3 e 4, corroborando com outro estudo (Canty et al., 2010). Em contrapartida, a sua maior expressão nas células da granulosa de futuros folículos subordinados acaba por sugerir uma função no início do processo de regressão folicular.

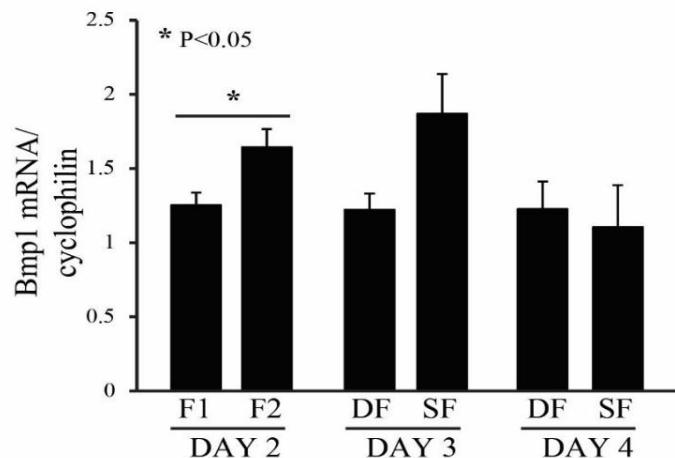


Figura 1. Expressão de BMP1 nas células da granulosa de folículos obtidos antes (F1 e F2), durante (DF e SF; Dia 3) ou após (DF e SF; Dia 4) a divergência folicular.

Não se observou diferença na expressão da BMP2 nas diferentes classes foliculares analisadas. Contudo, a expressão de BMP4 foi significativamente maior nos folículos dominantes ($P > 0,05$; Figura 2).

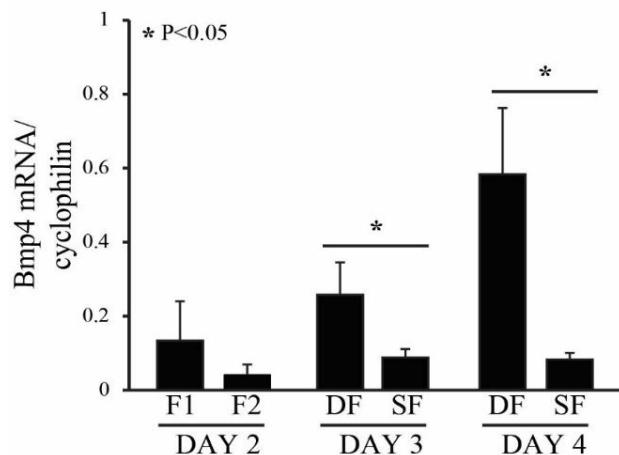


Figura 2. Expressão de BMP4 nas células da granulosa de folículos obtidos antes (F1 e F2), durante (DF e SF; Dia 3) ou após (DF e SF; Dia 4) a divergência folicular.

A investigação de tais proteínas ocorreu devido ao fato de que ambas compartilham o mesmo receptor da BMP 15, o BMPR1b (Alk6), no qual se identificou uma mutação, que por sua vez foi associada a um marcado incremento na taxa ovulatória em fêmeas ovinas (Mulsant et al. 2001, Souza et al. 2001). Logo, tais proteínas secretadas pelo oócito ou pelas células foliculares podem ser o ponto chave para a compreensão da diferenciação folicular.

Posteriormente, determinou-se a abundância de proteína GDF9 no fluido folicular de amostras coletadas no dia 4 de onda folicular, ou seja, momento após a divergência folicular. Esta proteína foi detectada em abundância no fluido folicular bovino, porém não diferiu entre os folículos dominantes e subordinados ($P > 0,05$).

4. CONCLUSÕES

O padrão de expressão da BMP4 sugere que este fator tenha função na proliferação celular e/ou esteroidogênese, enquanto que a BMP2 parece não ser regulada no período próximo à divergência folicular. Além disto, infere-se que uma maior expressão de BMP1 possa estar envolvida no início do processo de regressão dos folículos não selecionados. Quando avaliada a presença do ligante GDF9 no fluido folicular, não se observou diferença de expressão proteica em folículos dominantes e subordinados. Até o momento, os dados deste estudo fornecem subsídios para entender, em nível molecular, os mecanismos de ação das proteínas oocitárias, as quais provavelmente diminuirão a expressão de genes relacionados à diferenciação folicular.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CANTY-LAIRD E. et al. First evidence of bone morphogenetic protein 1 expression and activity in sheep ovarian follicles. **Biology of Reproduction**, v. 83, p. 138-146, 2010.

FORTUNE, J. E. et al. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 109-126, 2004.

GINTHER, O. J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 6, p. 1187-1194, 1996.

KNIGHT, P. G.; GLISTER, C. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 132, n. 2, p. 191-206, 2006.

MULSANT P. et al. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p. 5104-5109, 2001.