

FUNÇÃO E REGULAÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO E DIFERENCIACÃO 9 NO CRESCIMENTO FOLICULAR E OVULAÇÃO EM BOVINOS.

VITÓRIA GASPERIN GUAZZELLI COSTA¹; CRISTINA SANGOI HAAS², MONIKE QUIRINO DOS SANTOS³; MONIQUE TOMAZELE ROVANI⁴, FERNANDO CAETANO DE OLIVEIRA⁵; BERNARDO GARZIERA GASPERIN⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – vitoria.guazzelli@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – cristinasangoi@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas - monikequirino@gmail.com

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

⁵Universidade Federal de Pelotas- fcoliveiravet@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – bggasperin@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Há muito tempo se atribui ao oócito a função de regular o crescimento e diferenciação folicular que culminam com a ovulação. O controle autócrino/parácrino da foliculogênese desempenha um papel essencial na modulação do desenvolvimento folicular e fatores produzidos pelo oócito são cruciais no processo de crescimento e diferenciação dos folículos. Porém, a sua participação neste mecanismo de regulação não é totalmente compreendida. Grande parte do conhecimento acerca desses fatores tem sido obtido em modelos *in vitro* ou através de mutações em ovinos (Galloway et al., 2000; Hanrahan et al., 2004).

Entre as principais proteínas oocitárias, destacam-se as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) que, do mesmo modo que os fatores de crescimento e diferenciação (GDFs), pertencem à superfamília dos fatores de crescimento transformantes beta (TGF-β; revisado por (Knight and Glister, 2006). A participação do sistema BMP na regulação parácrina da foliculogênese é incontestável. Resultados demonstram um grande potencial de utilização da regulação das proteínas oocitárias como ferramenta para incrementar a taxa ovulatória, ou como contraceptivo.

Há evidências de funções inibitórias da BMP15 e GDF9 sobre a diferenciação e esteroidogênese folicular. Por outro lado, alguns estudos *in vitro* demonstram um efeito estimulatório sobre a proliferação e síntese de esteróides. Uma vez que não são conhecidos todos os fatores produzidos pelo oócito durante o crescimento folicular, uma alternativa para investigar a função dos mesmos seria o modelo de injeção intrafolicular destas. Em vista disso, o presente estudo teve como objetivo determinar o efeito da injeção intrafolicular de GDF9 sobre o crescimento folicular final e ovulação e determinar o padrão de expressão dos receptores de GDF9 antes e após o pico de LH que leva a ovulação.

2. METODOLOGIA

Todos os procedimentos foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA-UFPel). Em um primeiro momento, foi investigado o efeito da injeção da proteína recombinante GDF9 na concentração final de 100ng/mL (n=6) e 1000ng/mL (n=5). As vacas do grupo controle (n=10) receberam uma injeção intrafolicular de PBS. As doses utilizadas foram determinadas multiplicando-se por dez as doses efetivas observadas *in vitro*. Foram utilizadas fêmeas cíclicas das raças Holandesa e Jersey, do rebanho da

Fazenda da Palma/UFPel. Estes animais receberam uma aplicação de prostaglandina F2 α (25mg, IM), 2mg de benzoato de estradiol e um implante intravaginal de liberação lenta contendo progesterona (DIB®; 1g), para induzir a regressão folicular e uma nova onda de crescimento folicular. Somente vacas que apresentaram folículos com diâmetro adequado (8 a 12mm) foram utilizadas nos estudos. Após a injeção intrafolicular, foi realizada diariamente a dinâmica folicular para identificar o destino dos folículos tratados em comparação aos folículos controle. Todas as estruturas maiores que 6mm foram identificadas e desenhadas em cortes esquemáticos dos ovários. Os procedimentos de injeção intrafolicular foram realizados conforme Ferreira et al. (2007). Os folículos injetados foram acompanhados até a regressão ou ovulação espontânea. Para a injeção das proteínas oocitárias e/ou PBS, o volume total a ser administrado foi adequado com base no volume de fluido folicular total (Ferreira et al., 2007).

Posteriormente, foi caracterizado a expressão de receptores de proteínas oocitárias durante a ovulação. Foram utilizadas amostras provenientes de um banco de fluido e células foliculares coletados nos momentos 0, 3, 6, 12 e 24 horas após a administração de GnRH. Esses animais eram fêmeas cíclicas, submetidas a um protocolo de sincronização da ovulação e com acompanhamento da dinâmica folicular, semelhante ao descrito inicialmente. Estes animais foram ovariectomizados conforme o momento de interesse para a análise de expressão gênica relacionada à ovulação. Após ovariectomia, o RNA total das células da granulosa foi extraído por protocolo baseado em colunas de sílica (RNAeasy Mini Kit®) de acordo com as recomendações do fabricante. Para quantificar o RNA extraído, a densidade ótica foi determinada através de espectrofotômetro (NanoDrop). O RNA total foi tratado com DNase (Promega, Madison, WI) a 37°C por 5min para digerir qualquer DNA contaminante. Após a inativação da DNase a 65°C por 10 min, a reação de transcrição reversa foi realizada com o kit iScript cDNA Synthesis (BioRad), conforme instruções do fabricante. A expressão relativa dos genes foi realizada por PCR em tempo real (CFX384 real-time PCR; BioRad, Hercules, CA) utilizando SsoFast™ EvaGreen® supermix (BioRad, Hercules, CA) e primers específicos para bovinos. A variabilidade na quantidade de RNAm foi corrigida pela amplificação dos genes constitutivos GAPDH e ciclofilina. O cálculo da expressão relativa foi baseado numa curva de diluição seriada do cDNA, conforme descrito por (Gasperin et al., 2014). Para o PCR em tempo real foram utilizados os seguintes iniciadores:
BMPR2: F – CCACTGGCCTCACTCCAAGT e R – CCCGACTGGCTGTGAAACAT; **TGFBR1:** F – ACCACTGCAATAAAATAGAACCTCCA e R – TGACAGCTGCCAGTTCAACAG;
CYCLOPHILIN: F – GGTCATCGGTCTTTGGAA e R – TCCTTGATCACACGATGGAA. Os resultados de expressão gênica 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, demonstrou-se que a injeção intrafolicular da proteína oocitária GDF9 em duas doses (100 e 1000ng/mL; Sigma Aldrich) não alterou o

crescimento folicular final, sem efeitos negativos sobre a ovulação e manifestação de estro. Os dados presentes na literatura demonstram funções distintas das proteínas oocitárias nas diferentes espécies e modelos utilizados (McNatty et al., 2005; Spicer et al., 2006). Baseando-se nos resultados obtidos *in vivo* em bovinos e ovinos descritos por outros grupos de pesquisa (Juengel et al., 2009; Juengel et al., 2004), e nos dados obtidos pelo nosso grupo (Gasperin et al., 2014), esperava-se que o GDF9 inibisse a diferenciação folicular. O efeito negativo esperado seria identificado através do atraso no crescimento e ovulação ou então através da atresia dos folículos injetados. Entretanto, os folículos injetados com GDF9 continuaram seu crescimento em taxa similar aos folículos do grupo controle (PBS), até atingir completa diferenciação e ovularem normalmente. Entretanto, não foi observada a inibição do crescimento folicular, nem uma relação dose-dependente com o GDF9, sugerindo que a esteroidogênese não tenha sofrido alteração, bem como a expressão de receptores de LH, que determina a dominância e responsividade à essa gonadotrofina.

O efeito sinérgico entre BMP15 e GDF9 é mediado pelo receptor BMPR2 (Edwards et al., 2008). A ativação do BMPR2 leva a fosforilação do receptor tipo I, sendo o BMPR1B responsável pela sinalização da BMP15 e o TGFBR1 do GDF9. Determinou-se a expressão dos genes BMPR2 e TGFBR1 nas células foliculares antes e após a administração de GnRH para avaliar sua regulação no período periovulatório e de luteinização. Este modelo experimental mimetiza a ovulação e permite avaliar os processos desencadeados após a liberação de GnRH (Tonellotto dos Santos et al., 2012). Ambos receptores sofrem regulação da expressão gênica após o pico de LH (aproximadamente 3h após o GnRH), principalmente se observado o horário 12h em relação ao 3h (Figura 1). Entretanto, a relevância fisiológica deste achado ainda é desconhecida. Uma alternativa seria avaliar o efeito do tratamento com GDF9 intrafolicular neste período periovulatório, desafiando-os com GnRH exógeno.

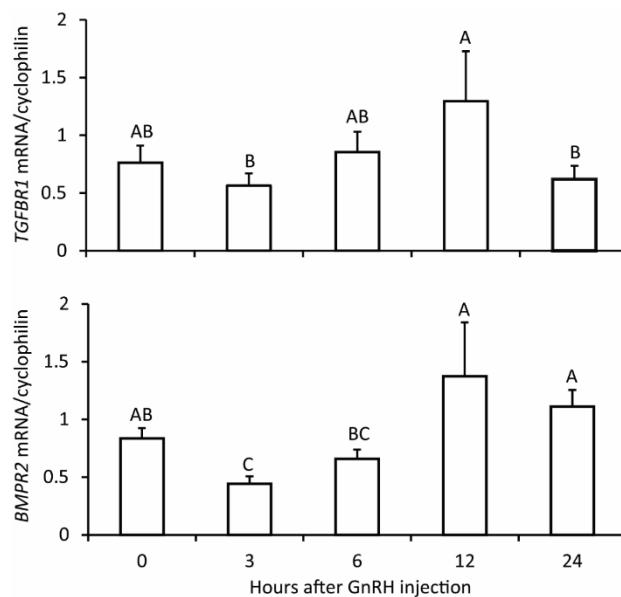


Figura 1: Caracterização da expressão dos genes TGFBR1 e BMPR2 em células da granulosa nos momentos 0, 3, 6, 12 e 24 horas após a administração de GnRH. Letras diferentes indicam significância estatística ($P < 0,05$).

4. CONCLUSÕES

No presente estudo, demonstrou-se que o GDF9 isoladamente, nas concentrações utilizadas, não interfere negativa ou positivamente no crescimento final do folículo e ovulação. Além disso, os padrões de expressão dos receptores de fatores oocitários foram caracterizados em folículos no período peri-ovulatório, sendo expressos e regulados nesse processo, o que pode indicar uma função no período de ovulação e luteinização.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Edwards, S.J., Reader, K.L., Lun, S., Western, A., Lawrence, S., McNatty, K.P., Juengel, J.L., 2008. The Cooperative Effect of Growth and Differentiation Factor-9 and Bone Morphogenetic Protein (BMP)-15 on Granulosa Cell Function Is Modulated Primarily through BMP Receptor II. *Endocrinology* 149, 1026-1030.
- Ferreira, R., Oliveira, J.F., Fernandes, R., Moraes, J.F., Gonçalves, P.B., 2007. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. *Reproduction* 134, 713-719.
- Galloway, S.M., McNatty, K.P., Cambridge, L.M., Laitinen, M.P., Juengel, J.L., Jokiranta, T.S., McLaren, R.J., Luiron, K., Dodds, K.G., Montgomery, G.W., Beattie, A.E., Davis, G.H., Ritvos, O., 2000. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet* 25, 279-283.
- Gasperin, B.G., Ferreira, R., Rovani, M.T., Bordignon, V., Duggavathi, R., Buratini, J., Oliveira, J.F.C., Gonçalves, P.B.D., 2014. Expression of receptors for BMP15 is differentially regulated in dominant and subordinate follicles during follicle deviation in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 144, 72-78.
- Hanrahan, J.P., Gregan, S.M., Mulsant, P., Mullen, M., Davis, G.H., Powell, R., Galloway, S.M., 2004. Mutations in the Genes for Oocyte-Derived Growth Factors GDF9 and BMP15 Are Associated with Both Increased Ovulation Rate and Sterility in Cambridge and Belclare Sheep (*Ovis aries*). *Biol. Reprod.* 70, 900-909.
- Juengel, J.L., Hudson, N.L., Berg, M., Hamel, K., Smith, P., Lawrence, S.B., Whiting, L., McNatty, K.P., 2009. Effects of active immunization against growth differentiation factor 9 and/or bone morphogenetic protein 15 on ovarian function in cattle. *Reproduction* 138, 107-114.
- Juengel, J.L., Hudson, N.L., Whiting, L., McNatty, K.P., 2004. Effects of Immunization Against Bone Morphogenetic Protein 15 and Growth Differentiation Factor 9 on Ovulation Rate, Fertilization, and Pregnancy in Ewes. *Biol. Reprod.* 70, 557-561.
- Knight, P.G., Glister, C., 2006. TGF-{beta} superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* 132, 191-206.
- McNatty, K.P., Juengel, J.L., Reader, K.L., Lun, S., Myllymaa, S., Lawrence, S.B., Western, A., Meerasahib, M.F., Mottershead, D.G., Groome, N.P., Ritvos, O., Laitinen, M.P.E., 2005. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function. *Reproduction* 129, 473-480.
- Spicer, L.J., Aad, P.Y., Allen, D., Mazerbourg, S., Hsueh, A.J., 2006. Growth differentiation factor-9 has divergent effects on proliferation and steroidogenesis of bovine granulosa cells. *J Endocrinol* 189, 329-339.
- Tonellotto dos Santos, J., Ferreira, R., Gasperin, B.G., Siqueira, L.C., de Oliveira, J.F., Santos, R.A., Reis, A.M., Gonçalves, P.B., 2012. Molecular characterization and regulation of the angiotensin-converting enzyme type 2/Angiotensin-(1-7)/MAS receptor axis during the ovulation process in cattle. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 13, 91-98.