

Expressão de enzimas esteroidogênicas nas células da granulosa bovina sob diferentes perfis endócrinos periovulatórios

**BIANCA DA SILVA AMARAL¹; JOÃO EDUARDO DE CASTRO CAMPOS²;
FERNANDO CAETANO DE OLIVEIRA³; CRISTINA SANGOI HAAS⁴; BERNARDO
GARZIERA GASPERIN⁵**

¹Universidade Federal de Pelotas – biancaamaral-cavg@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - jeducaastro@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Pelotas – fernando_oliveira88@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas - cristinasangoi@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – bggasperin@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As prostaglandinas são derivadas do ácido araquidônico, sendo produzidas em praticamente todos os tecidos do organismo, exercendo diversas funções. Especificamente, no trato reprodutivo, estão relacionadas a processos como ovulação, regulação da função luteal/luteólise, contratilidade uterina e dilatação cervical (revisado por WEEMS et al., 2006). O uso da PGF e seus analogos como agente luteolítico levou a um grande avanço na manipulação do ciclo estral de bovinos, sendo utilizada em protocolos para inseminação com observação de cio ou em inseminação artificial em tempo fixo (IATF) (MILLER, 1980). Além dos efeitos clássicos da PGF sobre a função luteal, as prostaglandinas também são produzidas pelo folículo ovulatório e são reguladas durante a ovulação decorrente do pico de LH (BRIDGES et al., 2006), desempenhando um importante papel (MURDOCH et al., 1983).

Em ovelhas, quando a síntese de PGs foi bloqueada pela injeção intrafolicular de indometacina, ocorreu a inibição da ovulação, porém sem afetar a luteogênese e produção de progesterona (P4) (MURDOCH et al., 1983). Há evidências de que a PGF possui um importante papel no processo de ovulação em diversas espécies como bovinos (De SILVA e REEVES, 1985) e ovinos (MURDOCH e DUNN, 1983), visto que ao se bloquear as PGs com indometacina, não ocorre ovulação. Ainda, estudos sugerem que a PGF é capaz de induzir o processo ovulatório que, sabidamente, envolve uma drástica alteração na esteroidogênese folicular. Portanto. O presente estudo tem por objetivo identificar os efeitos da administração sistêmica de PGF sobre a expressão de enzimas esteroidogênicas nas células da granulosa de folículos pré-ovulatórios sob diferentes níveis de progesterona.

2. METODOLOGIA

Os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de ética em experimentação animal da UFPel. Experimento 1: Para a realização dos procedimentos envolvendo a ação da PGF com progesterona alta, foram utilizadas 15 vacas da raça Jersey, cíclicas, multíparas e não lactantes. Uma nova onda folicular foi induzida pela aplicação de 2mg de benzoato de estradiol (BE) no dia da inserção do dispositivo intravaginal (DIV P4, 1g progesterona). No dia 6 foi administrado 500µg de D-closprotenol (luteólise) e 400UI de eCG, para estimular o

crescimento folicular sob elevados níveis de P4. No D9, foi realizada uma administração i.m. de 500µg de D-clospirotenol (n=8; grupo PGF) ou solução salina (n=7; grupo controle). No D11 os DIVs foram removidos e, 42 horas após os tratamentos, se realizou a aspiração folicular guiada por ultrassonografia para coleta de fluido folicular (FF) e células da granulosa (CG). Após centrifugação, FF e CG foram imediatamente congelados em N2 líquido até o momento das análises.

Experimento 2: Foram avaliados os efeitos da PGF em um ambiente endócrino de níveis basais de P4. Foram utilizadas fêmeas bovinas cíclicas (n=30), predominantemente da raça Angus, não lactantes, as quais foram sincronizadas conforme descrito no experimento 1 com algumas modificações. No dia 6 foi administrado apenas PGF e no dia 8, o DIV foi removido, sendo que no D10 metade das fêmeas não recebeu nenhum tratamento (n=15, grupo controle), enquanto que as demais (n=15, grupo PGF) receberam uma administração i.m. de PGF. No D11, foi realizada a coleta de fluido folicular e células da granulosa, 24 h após os tratamentos. Os procedimentos de coleta e processamento das amostras foram realizados conforme descrito no experimento 1.

O RNA total das células da granulosa foi extraído com Trizol (Invitrogen, Brasil), sendo quantificado pela densidade ótica, determinada através de espectrofotômetro (NanoDrop). O RNA total foi tratado com DNase e a reação de transcrição reversa foi realizada utilizando o kit iScript (BioRad), conforme instruções do fabricante. A expressão relativa dos genes foi realizada por PCR em tempo real (CFX384, BioRad) com SsoFast EvaGreen supermix (BioRad), sendo a variabilidade na quantidade de RNAm acessada em relação à amplificação dos genes constitutivos ciclofilina, histona e GAPDH. A sequência dos iniciadores dos genes constitutivos e de genes relacionados ao processo de esteroidogênese que foram investigados estão descritos na Tabela 1.

Gene	Iniciador <i>sense</i>	Iniciador <i>antisense</i>
<i>GAPDH</i>	GATTGTCAGCAATGCCTCCT	GGTCATAAGTCCCTCCACGA
<i>CYP191</i>	GTGTCCGAAGTTGTGCCTATT	GGAACCTGCAGTGGGAAATGA
<i>3βHSD</i>	GCCCAACTCCTACAGGGAGAT	TTCAGAGCCCACCCATTAGCT
<i>Cyclophiin</i>	GGTCATCGGTCTCTTTGGAA	TCCTTGATCACACGATGGAA
<i>Histone H2A</i>	GAGGAGCTGAACAAGCTGTTG	TTGTGGTGGCTCTCAGTCTTC

Tabela 1 – Genes e sequências de iniciadores que foram utilizados neste estudo.

Nas análises feitas no fluido folicular, foram dosados E2 e P4 por quimioluminescência em laboratório particular, com coeficiente de variabilidade intra e interensaio inferior a 10%. O efeito dos tratamentos sobre os níveis hormonais e expressões das células da granulosa foi calculado pelo método de análise de variância utilizando o SAS. O nível de significância utilizado foi 5%.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, não foi observado efeito do tratamento sobre os níveis de P4 no fluido folicular. Em um ambiente endócrino de alta P4, os grupos controle e

PGF apresentaram $66,7 \pm 25,6$ ng/mL e $35,6 \pm 7,3$ ng/mL, respectivamente ($P > 0,05$). Os níveis observados são inferiores ao esperado no fluido folicular após um pico de LH, que dá início ao processo de ovulação/luteinização (SANTOS et al., 2011). Portanto, os resultados sugerem que os folículos não sofreram luteinização.

Nas células da granulosa, o tratamento com PGF também não alterou a expressão das principais enzimas esteroidogênicas, aromatase (*CYP19A1*) e *3βHSD* ($P > 0,05$), envolvidas na regulação da produção de estradiol e progesterona, respectivamente. A modulação gênica destas enzimas, aumento da expressão da *3βHSD* e diminuição da *CYP19A1*, é observada no início da cascata ovulatória, onde ocorre a diminuição na produção de E2 e se inicia a produção de P4 (WALSH et al., 2012). O padrão de expressão de *CYP19A1* e *3βHSD* demonstrou que os folículos dominantes estavam saudáveis, sem alteração decorrente de um pico de LH (BAO e GARVERICK, 1998).

Quando a PGF foi administrada durante o proestro, em um ambiente endócrino de baixa P4, não se observou alteração dos níveis de E2 no fluido folicular ($P > 0,05$), tendo o grupo controle apresentado 426 ± 75 ng/mL e o grupo PGF 444 ± 118 ng/mL. Estes níveis intrafoliculares de estradiol mostram a viabilidade dos folículos em ambos os casos, não tendo o tratamento influenciado nos folículos pela modulação do LH, validando o modelo para trabalho com folículos durante o proestro de vacas.

De forma geral, a PGF não modulou a expressão das células da granulosa. Estudos anteriores demonstram que outra prostaglandina, a PGE2, é capaz de modular o ambiente folicular possuindo efeitos similares ao LH (RICHARDS, 1994), o que não foi observado após o tratamento com PGF neste estudo. Entretanto, o presente estudo investigou apenas o efeito sobre a esteroidogênese, sendo que os efeitos da PGF no remodelamento da matriz extracelular e no processo inflamatório que leva a ruptura do estigma ovulatório, devem ser melhor investigados.

4. CONCLUSÕES

O tratamento sistêmico com PGF não afeta a esteroidogênese folicular em bovinos sob ambientes endócrinos de alta ou baixa progesterona. Contudo, possíveis efeitos sobre remodelação da matriz extracelular e ruptura do estigma ovulatório não podem ser descartados e serão futuramente avaliados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRIDGES, P., KOMAR, C., FORTUNE, J., 2006. Gonadotropin-induced expression of messenger ribonucleic acid for cyclooxygenase-2 and production of prostaglandins E and F2α in bovine preovulatory follicles are regulated by the progesterone receptor. **Endocrinology**147, 4713-4722.

De SILVA, M., REEVES, J., 1985. Indomethacin inhibition of ovulation in the cow. **Journal of reproduction and fertility**75, 547-549.

MILLER, H., 1980. Prostaglandins for Estrous Synchronization in Beef Cows. Disponível em: http://openprairie.sdstate.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1005&context=sd_cow-calf_1980

MURDOCH, W., DUNN, T., 1983. Luteal function after ovulation blockade by intrafollicular injection of indomethacin in the ewe. **Journal of reproduction and fertility** 69, 671-675.

MURDOCH, W., NIX, K., DUNN, T., 1983. Dynamics of ovarian blood supply to periovulatory follicles of the ewe. **Biology of reproduction** 28, 1001-1006.

RICHARDS, J.S., 1994. Hormonal control of gene expression in the ovary. **Endocrine reviews** 15, 725-751.

WALSH, S.W., MEHTA, J.P., McGETTIGAN, P.A., BROWNE, J.A., FORDE, N., ALIBRAHIM, R., MULIGAN, F., LOFTUS, B., CROWE, M.A., MATTEHWS, D., 2012. Effect of the metabolic environment at key stages of follicle development in cattle: focus on steroid biosynthesis. **Physiological genomics** 44, 504-517.

WEEMS, C.W. et al. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. **The Veterinary Journal**, v. 171, p. 206-228, 2006.

SANTOS, J., FERREIRA, R., GASPERIN, B.G., SIQUEIRA, L.C., DE OLIVEIRA, J.F., SANTOS, R.A., REIS, A.M., GONCALVES, P.B., 2011. Molecular characterization and regulation of the angiotensin-converting enzyme type 2/Angiotensin-(1-7)/MAS receptor axis during the ovulation process in cattle. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst** 13 (-1), 91-98.

BAO, B., GARVERICK, H.A., 1998. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **Journal of animal science** 76, 1903-1921.