

EXPRESSÃO DE ONCOSTATINA M E SEU RECEPTOR NO CORPO LÚTEO DE BOVINOS

BETINA CAPELETTI¹; KAUE RODRIGUEZ MARTINS², BERNARDO GARZIERA GASPERIN³, CRISTINA SANGOI HAAS⁴, MONIQUE TOMAZELE ROVANI⁵; RAFAEL GIANELLA MONDADORI⁶.

¹Universidade Federal de Pelotas – betina.capeletti@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – kauerodriguez@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – bggasperin@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – cristinasangoi@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – mtrovani@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – rgmondadori@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento folicular dos mamíferos ocorre nos ovários durante a fase fetal. Assim, a fêmea bovina nasce com uma reserva de células germinativas que ficam em estado de quiescência até que haja sua ativação e recrutamento (FORTUNE, 1994). Durante o desenvolvimento folicular, as estruturas respondem aos efeitos do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH), aumentando seu diâmetro e liberando um óócito maduro, apto a ser fecundado. Após a ovulação, as células foliculares remanescentes (células da teca e da granulosa) dão origem ao corpo lúteo, estrutura responsável pela liberação de progesterona e consequente manutenção da gestação. Caso a gestação não se estabeleça, o corpo lúteo sofre luteólise, havendo a perda da função e consequente involução de sua estrutura (DAVIS & RUEDA, 2002), ocorrendo a apoptose das células que o compõe.

Na vaca, vários folículos são recrutados em uma onda folicular e iniciam seu desenvolvimento, porém apenas um estabelece dominância e é capaz de ovular. Os demais folículos entram em atresia através de apoptose, devido aos baixos níveis de FSH, decorrentes da elevação dos níveis de estradiol e inibina produzidos, principalmente, pelo folículo dominante. O processo de apoptose pode ocorrer de forma intrínseca, através da mitocôndria, ou extrínseca, a partir de receptores de morte, o que varia conforme o tipo e origem da sinalização (KONDRATSKY et al., 2015). No ovário, a apoptose está envolvida nos processos de recrutamento de células germinativas, atresia folicular, ovulação e luteólise (CAROU et al., 2015). A sinalização desses eventos resulta na expressão de genes e na transcrição de proteínas específicas.

Estudos desenvolvidos por GASPERIN et al. (2015) indicam que a rota transdutor de sinal e ativador da transcrição (STAT3) esteja provavelmente relacionada à regressão folicular, uma vez que esta encontra-se ativa somente nas células da granulosa de folículos atrésicos. Ainda, ROVANI et al. (2017) demonstraram que a rota STAT3 também é ativada nas células de corpos lúteos em regressão. Entretanto, os ligantes responsáveis pela ativação da STAT3 durante a atresia folicular e regressão do corpo lúteo ainda não são conhecidos. As proteínas da família STAT são fosforiladas por receptores associados a quinases, translocam-se para o núcleo da célula e atuam na transcrição de genes-alvo (LEVY & LEE, 2002).

Sabe-se que a citocina oncostatina M (OSM) atua na hematopoese, remodelação óssea e de gorduras, desenvolvimento do sistema nervoso central, regeneração do fígado e que também exerce papel pró-inflamatório nas articulações, pele, pulmões e doenças vasculares (revisado por RICHARDS,

2013), o que sugere que sua ação varia conforme o tipo de tecido e citocinas presentes. Além disso, a OSM tem capacidade de regular a apoptose de células humanas através da ativação de algumas caspases (AUERNHAMMER et al., 2004; CHIPOY et al., 2007).

Sugere-se que a OSM, através da ativação da STAT3, induza apoptose mediada por lisossomos de células da glândula mamária de camundongos (KREUZALER et al., 2011) e seu receptor (OSMR) é mais expresso em folículos subordinados (FORDE et al., 2008). Sendo assim, este trabalho buscou identificar a expressão de OSM e OSMR durante a luteólise de bovinos, a fim de verificar sua relação com a apoptose das células da granulosa.

2. METODOLOGIA

O presente estudo foi desenvolvido utilizando amostras de corpos lúteos obtidas em um estudo anterior (ROVANI et al., 2017). Todos os procedimentos envolvendo animais foram submetidos e aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da UFSM. Brevemente, foram sincronizadas 21 vacas adultas não lactantes, utilizando-se dispositivo intravaginal de liberação controlada de progesterona (DIB), juntamente com benzoato de estradiol, visando a indução do início de uma nova onda folicular. Após sete dias, o DIB foi removido e os animais receberam uma injeção intramuscular de Cloprostenol, que é um análogo de prostaglandina (PGF), para a indução da luteólise. O estro destes animais foi observado de 3 a 5 dias após a injeção.

Visando a confirmação da ovulação dos animais tratados, foram realizadas ultrassonografias por via transretal às 24 e 48h do primeiro estro. Após 10 dias da ovulação os animais receberam 25 mg de PGF e foram alocados aleatoriamente em grupos de quatro ou cinco animais. Na sequência, as vacas passaram por nova ultrassonografia transretal para confirmação da presença de corpo lúteo, e foram submetidas à ovariectomia unilateral 0, 2, 12, 24 ou 48h após o tratamento com PGF, de acordo com o grupo ao qual haviam sido designadas. A coleta de corpos lúteos foi realizada seguindo a metodologia descrita por ROVANI et al. (2017). Os fragmentos de corpo lúteo coletados foram armazenados em criotubos em nitrogênio líquido para posteriores análises de RNA e proteína.

Para a quantificação da expressão de RNAm, a extração de RNA foi realizada utilizando Trizol. O RNA extraído foi quantificado através de densidade ótica, que foi determinada através de espectrofotômetro (NanoDrop), e da pureza, que foi avaliada através da taxa de absorção da relação OD260/OD280, sem considerar valores inferiores a 1,6. O RNA total foi tratado com DNase I, Amplification Grade (Thermo Fisher Scientific, USA) a 37°C por 15 minutos, visando digerir DNA genômico contaminante. A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando o kit *iScript* (BioRad), seguindo as instruções do fabricante. A expressão relativa dos genes foi feita através de PCR em tempo real (CFX384, BioRad) com GoTaq® qPCR Master Mix for Dye-Based Detection (Promega, Madison, WI), sendo a variabilidade na quantidade de RNAm acessada em relação à amplificação dos genes constitutivos ciclofilina, histona e GAPDH.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ambos, *OSM* e *OSMR* foram detectados nas células luteais. Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo demonstrando a expressão destes fatores no corpo lúteo. A expressão relativa de RNAm de *OSM* foi mais elevada ($p < 0,01$) às 24h ($0,54 \pm 0,18$) e 48h ($0,73 \pm 0,12$), quando comparado com a 0h ($0,07 \pm$

0,03). Enquanto isso, o *OSMR* apresentou aumento significativo de expressão relativa ($p < 0,05$) às 2h ($1,11 \pm 0,14$), quando comparadas a 0h ($0,66 \pm 0,03$). Os dados confirmam que tanto a *OSM* quanto seu receptor apresentam modificação na sua expressão em células luteais em processo de regressão.

O aumento na expressão de *OSM* ocorrido às 24 horas após a aplicação de PGF sugere que pode haver participação da mesma no processo de luteólise estrutural, uma vez que a luteólise funcional, ou seja, o decréscimo na síntese de progesterona, ocorre mais precocemente, conforme demonstrado por ROVANI et al. (2017). Conforme já relatado, é sabido que a *OSM* ativa a STAT3 (FOSSEY et al., 2015) e está envolvida no processo de apoptose das células da glândula mamária (KREUZALER et al., 2011), além disso, seu receptor é mais expresso em folículos subordinados (FORDE et al., 2008).

Os dados aqui apresentados, juntamente com os publicados por ROVANI, et al. (2017), onde foi relatada maior expressão da rota STAT3 durante a luteólise, sugerem que a *OSM* ativa o processo de apoptose das células luteais através da ativação da rota STAT3.

4. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados neste trabalho sugerem que a *OSM* esteja relacionada ao processo de luteólise, possivelmente através da ativação da rota STAT3. São necessários novos estudos para a confirmação destas hipóteses.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUERNHAMMER, C. J., DORN, F., VLOTIDES, G. HENGGE, S., KOPP, F. B., SPOETTL, G. The oncostatin M receptor/gp130 ligand murine oncostatin M induces apoptosis in adrenocortical y-1 tumor cells. **J Endocrinol**, v. 180, p. 479 – 486, 2004.

CAROU, M. C., CRUZANS, P. R., MARURI, A., STOCKERT, J. C., LOMBARDO, D. M. Apoptosis in ovarian granulosa cells of cattle: Morphological features and clearance by homologous phagocytosis. **Acta Histochemica**, v. 117, p. 92 – 103, 2015.

CHIPOY, C., BROUNAIS, B., TRICHET, V., BATTAGLIA, S., BERREUR, M., OLIVER, L., JUIN, P., RÉDINI, F., HEYMANN, D., BLANCHARD, F. Sensitization of osteosarcoma cells to apoptosis by oncostatin M depends on STAT3 and p53. **Oncogene**, v. 27, p. 6653 – 6664, 2007.

DAVIS, J. S., RUEDA, B. R. The corpus luteum: Na ovarian structure with maternal instincts and suicidal tendencies. **Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library**, v. 7, p. 1949 – 1978, 2002.

FORDE, N., MIHM, M., CANTY, M. J., ZIELAK, A. E., BAKER, P. J., PARK, S., EVANS, A. C. O. Differential expression of signal transduction factors in ovarian follicle development: a functional role for betaglycan and FIBP in granulosa cells in cattle. **Physiological Genomics**, v. 32, n. 2, p. 193 – 204, 2008.

FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of reproduction**, v. 50, p. 225 – 232, 1994.



FOSSEY, S. L., BEAR, M. D., KISSEBERTH, W. C., PENNEL, M., LONDON, C. A.. Oncostatin M promotes STAT3 activation, VEGF production and invasion in osteosarcoma cells lines. **BMC Cancer**, v. 11, p. 125 – 135, 2011.

GASPERIN, B. G., ROVANI, M. T., FERREIRA, R., ILHA, G. F., BORDIGNON, V., GONÇALVES, P. B. D., DUGGAVATHI, R. Functional status of STAT3 and MAPK3/1 signaling pathways in granulosa cells during follicular deviation. **Theriogenology**, v. 83, p. 353 – 359, 2015.

KONDRATSKY, A., KONDRATSKA, K., SKRYMA, R., PREVARSKA, N. Ion channels in the regulation of apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**, v.1848, p. 2532 – 2546, 2015.

KREUZALER, P. A., STANISZEWSKA, A. D., LI, W., OMIDYAR, N., KEDJOUAR, B., TURKSON, J., WATSON, C. J. STAT3 controls lysosomal-mediated cells death *in vivo*. **Nat Cell Biol**, v. 13, n. 3, p. 303 – 309, 2011.

LEVY, D. E., LEE, C. K., What does STAT3 do? **Journal of Clinical Investigation**, v. 109, p. 1143 – 1148, 2002.

RICHARDS, C. D. The Enigmatic Cytokine Oncostatin M and Roles in Disease. **ISRN Inflammation**, v. 2013, p. 23, 2013.

ROVANI, M. T., ILHA, G. F., GASPERIN, B. G. Prostaglandin F2 α -induced luteolysis involves activation of signal transducer and activator of transcription 3 and inhibition of AKT signaling in cattle. **Molecular Reproduction Development**, v. 9999, p. 1 – 9, 2017.