

## REGULAÇÃO DOS RECEPTORES DE BMP15 PELAS GONADOTROFINAS FSH E LH

GUSTAVO JACO HARTMANN<sup>1</sup>; BIANCA DA SILVA AMARAL<sup>2</sup> CRISTINA SANGOI HAAS<sup>3</sup>; FABIANE P. MORAES<sup>4</sup>; BERNARDO GARZIERA GASPERIN<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas, ReproPEL – gustavohartmann95@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas, ReproPEL – biancaamaral-cavg@hotmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas, ReproPEL - cristinasangoi@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas, ReproPEL - fabypmoraes@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas, ReproPEL – bggasperin@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), membros da superfamília dos fatores de crescimento transformante beta (TGFs), estão envolvidas em diversos eventos reprodutivos. Alterações na expressão destes fatores estão associadas com maior proliferação ou com infertilidade. Portanto, a modulação deste sistema pode possibilitar novas abordagens para aumentar a taxa de ovulação ou promover a contracepção, de maneira minimamente invasiva, em diversas espécies animais.

Apesar da importância, diversos aspectos relacionados à função das BMPs e seus receptores ainda são desconhecidos. Estudos anteriores demonstram que os receptores BMPR1B e BMPR2 são regulados nas células da granulosa durante o desenvolvimento folicular em bovinos. Portanto, a identificação de um modelo in vitro adequado para avaliar a regulação dos mesmos pelas gonadotrofinas FSH e LH e outros hormônios reprodutivos, possibilitaria o melhor entendimento do envolvimento destes fatores na regulação de eventos reprodutivos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a regulação da expressão dos receptores de BMP15 por FSH e LH in vitro.

### 2. METODOLOGIA

Para avaliar o efeito das gonadotrofinas FSH e LH sobre a expressão dos receptores *BMPR2* e *BMPR1B*, foram utilizadas amostras provenientes de dois modelos de cultivo celular. Inicialmente, foi utilizado um modelo de cultivo que mimetizar o ambiente de folículos saudáveis em crescimento Zamberlam et al. (2011). As células da granulosa (CG) obtidas de ovários de abatedouro foram cultivadas por 4 dias (D2-D6) sem tratamento (controle) ou com FSH 1 ng/mL, em seis replicações. A expressão de *CYP19A1*, foi utilizada para validar o modelo. Para reproduzir o ambiente folicular de folículos pré-ovulatórios, as CG foram incubadas com LH (100 ng/mL) ou sem tratamento (controle) por 6 h, em seis replicações, conforme modelo descrito por Zamberlam et al. (2014) e Santos et al. (2018). Para validar o modelo, foi avaliada a expressão de *EREG* e *ADAM17*, sendo observada um aumento na abundância de RNAm após o tratamento com LH, validando o modelo.

Para avaliação da expressão gênica, o RNA total das células da granulosa foi extraído utilizando colunas de sílica, de acordo com as recomendações do fabricante. Para quantificar o RNA extraído, a densidade ótica foi determinada

através de espectrofotômetro (NanoDrop). A pureza do RNA foi avaliada através da taxa de absorção da relação OD260/OD280. O DNA complementar foi sintetizado a partir de 100 ng de RNA, que foi primeiramente tratado com 0,1 U de DNase a 37°C por 5min, para digerir qualquer DNA contaminante. Após a inativação da DNase, a reação de transcrição reversa foi realizada com SuperScript Vilo cDNA synthesis kit (Thermo Scientific-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), conforme instruções do fabricante.

A expressão relativa dos genes foi realizada por PCR em tempo real (CFX384 real-time PCR; BioRad, CA) utilizando SYBR Green (Wisen Bioproducts, CA) e primers específicos. As sequencias dos iniciadores dos genes investigados foram: BMPR2: F- CCACTGGCCTCACTCCAAGT e R- CCCGACTGGCTGTGAAACAT e BMPR1B: F- AAAGTGGCGTGGCGAAAAGGTAGCT e R- CCCGTCCCTTGATATCTGCAGCAA. As amostras foram analisadas em duplicita e os resultados foram expressos em relação aos valores médios de Ct para GAPDH: F-ACCCAGAAGACTGTGGATGG e R- CAACAGACACGTTGGGAGTG e 18S rRNA: F- ATGAGCTTCTGGAGGCGTA e R- TCAAGCCATCTGTGACCAAA, como controles internos.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme demonstrado anteriormente em amostras obtidas *in vivo* (Gasperin et al., 2014), no presente estudo as células da granulosa obtidas de ovários de abatedouro e cultivadas *in vitro*, expressaram os dois receptores de BMP15. No primeiro modelo utilizado, o tratamento com FSH não alterou ( $P>0.05$ ) a expressão de RNAm dos receptores *BMPR2* e *BMPR1B*. Esperava-se uma redução na expressão de *BMPR1B* após o tratamento com FSH, uma vez que, *in vivo*, foi observado que folículos atrésicos apresentam maior expressão do referido receptor (Gasperin et al., 2014) em comparação aos folículos saudáveis. Faz-se necessária a avaliação da expressão gênica mais precocemente após o tratamento com FSH, para identificar um possível efeito agudo da gonadotrofina.

Após o tratamento com LH, não foi observada regulação na expressão de *BMPR1B*, enquanto que se observou uma tendência a elevação na expressão de *BMPR2* ( $P=0.1$ ). Ambos receptores são positivamente regulados nas células da granulosa de folículos pré-ovulatórios bovinos cerca de 10 h após o pico de LH (12 h após tratamento com GnRH; dados não publicados). Novos estudos avaliando o efeito de diferentes doses de LH, por diferentes períodos, estão sendo conduzidos, uma vez que é possível que 6 h de tratamento com LH *in vitro* não tenham sido suficientes para observar o aumento na expressão. A identificação de um modelo adequado para o estudo da regulação e função destes receptores possibilitará o avanço no entendimento da fisiologia reprodutiva para o desenvolvimento de novas técnicas de controle do ciclo e formas minimamente invasivas de promover contracepção nas diferentes espécies.

### 4. CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo, o tratamento das células da granulosa com as gonadotrofinas FSH e LH não alterou significativamente a expressão dos receptores de BMP15. Devido à grande importância do sistema BMP na reprodução, novos estudos serão realizados para identificar o efeito destas gonadotrofinas nas células das gônadas masculinas e femininas.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GASPERIN, B.G.; FERREIRA, R.; ROVANI, M.T.; BORDIGNON, V.; DUGGAVATHI, R.; BURATINI, J.; OLIVEIRA, J.F.C.; GONÇALVES, P.B.D. Expression of receptors for BMP15 is differentially regulated in dominant and subordinate follicles during follicle deviation in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.144, n.3–4, p.72-78, 2014.
- SANTOS J.T.; DE CESARO M.P.; FERST, J.G.; PEREIRA DAU, A.M.; DA ROSA, P.R.A.; PASQUAL, B.M.; ANTONIAZZI, A.Q.; GASPERIN, B.G.; BORDIGNON, V.; GONÇALVES, P.B.D. Luteinizing hormone upregulates NPPC and downregulates NPR3 mRNA abundance in bovine granulosa cells through activation of the EGF receptor. **Theriogenology**, v.119, p.28-34, 2018.
- ZAMBERLAM, G.; PORTELA, V.; OLIVEIRA, J.F.C.; GONÇALVES, P.B.D.; PRICE, C.A. Regulation of inducible nitric oxide synthase expression in bovine ovarian granulosa cells. **Mol Cell Endocrinol**, v.335, n.2, p.189-94, 2011.
- ZAMBERLAM, G.; SAHMI, F.; PRICE, C.A. Nitric oxide synthase activity is critical for the preovulatory epidermal growth factor-like cascade induced by luteinizing hormone in bovine granulosa cells. **Free Radic Biol Med**, v.74, p.237-44, 2014.

