

Efeito do tratamento com prostaglandina F2alfa sobre as células epiteliais uterinas bovinas

GUSTAVO JACO HARTMANN¹; BIANCA DA SILVA AMARAL²; FABIANE PEREIRA DE MORAES³; BERNARDO GARZIERA GASPERIN⁴

¹Universidade Federal de Pelotas, ReproPEL – gustavohartmann95@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas, ReproPEL – biancaamaral-cavg@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas, ReproPEL – fabypmoraes@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas, ReproPEL – bggasperin@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O ambiente uterino é determinante no reconhecimento e estabelecimento da gestação. Em bovinos, especialmente em vacas leiteiras no pós-parto, processos inflamatórios e infecciosos causam grandes prejuízos para os produtores. Um melhor entendimento dos fatores que modulam as características endometriais pode possibilitar que novas tecnologias sejam geradas para minimizar as perdas econômicas.

Sabe-se que o perfil endócrino influencia diretamente o ambiente uterino (Araújo et al., 2015). Mais recentemente, fatores produzidos localmente também têm sido investigados. Ainda a prostaglandina F2alfa exerce importante modulação no útero e seu uso na prevenção e terapia de doenças puererais é controverso (Haimerl et al., 2018). Portanto, o objetivo do estudo foi estabelecer um modelo de cultivo celular de células endometriais bovinas e determinar se as mesmas expressam genes envolvidos na síntese (*PTGS2*) e transporte (*PGT*) da prostaglandina F2alfa (PGF), bem como investigar se o tratamento com PGF é capaz de modular os referidos genes.

2. METODOLOGIA

Foi usado um cultivo estabelecido de células de epitélio endometrial bovino, mantidas em placas de 75 cm² em ambiente com 5% CO₂ a 37°C, em meio de cultivo específico (meio de crescimento para endométrio bovino; B911-500), trocado a cada 48 h até a confluência das células. Após a confluência, as células foram removidas usando solução tripsina-EDTA (Sigma T3924) e posteriormente tratadas com inibidor de tripsina (Sigma T6414). Após multiplicações, as células (em quinta passagem) foram semeadas em placa de 24 poços, com 5x10⁴ células por poço em placa de 24 poços (25x10³ células por cm²), mantidas por 42 h para condicionamento. Previamente ao tratamento, as células tiveram o meio de crescimento lavado por 2 h com meio basal (Sigma B910-500) para remoção dos fatores de crescimento contidos no meio. O tratamento foi realizado com prostaglandina F2alfa (Cayman; Chemical; Ref. 16010) diluída em meio basal para obtenção de concentrações finais de 0, 35 e 70 ng/mL. As células foram expostas ao meio contendo os tratamentos por 24 h, sendo posteriormente recuperadas em Trizol. A expressão relativa dos genes foi realizada por PCR em tempo real (CFX384 real-time PCR; BioRad, CA) utilizando SYBR Green (Wisent Bioproducts, CA) e primers específicos. As sequências dos iniciadores dos genes investigados foram: *PGT*: F-GTCATCGCTGGCCTCTAC e R-CAGCTACACGGGAATGGTT e *PTGS2*: F-TTGACCCAGAGCTGCTTT e R-GAAAGACGTCAGGCAGAAGG. As amostras foram analisadas em duplicita e os resultados foram expressos em relação aos

valores médios de Ct do controle interno 18S rRNA: F- ATGAGCTTCTGGAGGCGTA e R- TCAAGCCATCTGTGACCAAA. A análise estatística foi realizada com o software JMP (SAS Institute Inc., Cary, USA). Os dados foram normalizados através de transformação para logaritmo e as médias comparadas através de ANOVA seguido do teste T de Student.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O modelo utilizado mostrou-se adequado para o estudo da função da PGF sobre as células epiteliais uterinas, uma vez que tanto o gene do transportador da PGF (*PGT*) como da enzima responsável pela sua síntese (*PTGS2*) foram expressos nas células em cultivo. A expressão de *PGT* foi detectada nas células do estroma, lúmen e epitélio glandular em humanos, sendo que a proteína foi mais abundante nas fases proliferativas e secretória inicial (Kang et al., 2005). Os autores sugerem que o *PGT* é um importante regulador da função da PGF no útero humano. No presente estudo, observou-se uma tendência ($P=0.08$) a menor expressão de *PGT* nas células epiteliais tratadas com PGF na concentração de 70 ng/mL.

Apesar de termos detectado a expressão de *PTGS2* nas células em cultivo, não houve efeito do tratamento com PGF sobre a expressão. É bem estabelecido que as células uterinas de vacas expressam o gene desta enzima, sendo que recentemente foi relatada maior expressão em biópsias provenientes de vacas com endometrite subclínica em comparação com vacas sadias (Janowski et al., 2017). Portanto, o entendimento da regulação da expressão de *PTGS2* e consequente síntese de PGF pode contribuir na elucidação de mecanismos envolvidos nos processos inflamatórios que afetam a fertilidade de fêmeas bovinas.

4. CONCLUSÕES

O modelo utilizado no presente estudo é adequado para o estudo da função da PGF, uma vez que as células expressam genes envolvidos na sua síntese (*PTGS2*) e transporte (*PGT*). O tratamento das células com PGF parece inibir a expressão do seu transportador, indicando uma possível auto regulação. A partir dos dados do presente estudo será possível avaliar a regulação do *PGT* pelos esteroides estrógeno e progesterona, bem como por fatores locais como os fatores de crescimento transformantes (TGFs) beta.

Agradecimentos: FAPERGS e CNPq (Edital PRONEX-16/2551-0000494-3) e CAPES (código de financiamento 001).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araújo, E.R., Sponchiado, M., Pugliesi, G., Van Hoeck, V., Mesquita, F.S., Membrive, C.M., Binelli, M. Spatio-specific regulation of endocrine-responsive gene transcription by periovulatory endocrine profiles in the bovine reproductive tract. *Reproduction, Fertility and Development*, v.28, p.1533-1544, 2015.
- Haimerl, P., Heuwieser, W., Arlt, S. Short communication: Meta-analysis on therapy of bovine endometritis with prostaglandin F2alpha-An update. *Journal of dairy science*, v.101, p.10557-10564, 2018.

Janowski, T., Baranski, W., Lukasik, K., Skarzynski, D., Zdunczyk, S., Malinowska, K. Endometrial mRNA expression of prostaglandin synthase enzymes PTGS 2, PTGFS and mPTGES 1 in repeat-breeding cows with cytologically determined endometritis. **Acta veterinaria Hungarica**, v.65, p.96-104, 2017.

Kang, J., Chapdelaine, P., Parent, J., Madore, E., Laberge, P.Y., Fortier, M.A. Expression of human prostaglandin transporter in the human endometrium across the menstrual cycle. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v.90, p.2308-2313, 2005.