

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Veterinária**  
**Programa de Pós-Graduação em Veterinária**



**Dissertação**

**Função e regulação de membros da família TGF beta no crescimento folicular  
final e ovulação em bovinos.**

**Cristina Sangoi Haas**

Pelotas, 2015

**Cristina Sangoi Haas**

**Função e regulação de membros da família TGF beta no crescimento folicular final e ovulação em bovinos.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Garziera Gasperin

Coorientador: Prof. Dr. Arnaldo Diniz Vieira

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

H112f Haas, Cristina Sangoi

Função e regulação de membros da família TGF beta no crescimento folicular final e ovulação em bovinos. / Cristina Sangoi Haas ; Bernardo Garziera Gasperin, orientador ; Arnaldo Diniz Vieira, coorientador. — Pelotas, 2015.

43 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. BMP. 2. GDF9. 3. Fatores locais. 4. Foliculogênese. 5. Ovulação. I. Gasperin, Bernardo Garziera, orient. II. Vieira, Arnaldo Diniz, coorient. III. Título.

CDD : 636.2

Cristina Sangoi Haas

Função e regulação de membros da família TGF beta no crescimento folicular final e ovulação em bovinos.

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 02/10/2015

Banca examinadora:

Prof. Dr. Bernardo Garziera Gasperin (Orientador)

Doutor em Fisiopatologia da Reprodução pela Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Augusto Schneider

Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Joabel Tonello dos Santos

Doutor em Fisiopatologia da Reprodução pela Universidade Federal de Santa Maria

Dr<sup>a</sup>. Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro

Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus por estar sempre presente, pelo amparo ao longo desta jornada e por todas as bênçãos alcançadas.

À minha família pelo amor e apoio incondicional sempre. Em especial aos meus pais Linda Cristina e Ivan, ao Roberto e Leonardo, pelo carinho, paciência, apoio, confiança e incentivo em seguir na carreira acadêmica.

Ao meu orientador Prof. Bernardo pelos ensinamentos, dedicação, paciência e amizade. Por nunca medir esforços para me ajudar, explicar e solucionar questionamentos e por inspirar a todos pela sua motivação e dedicação. Também, agradeço ao meu coorientador Prof. Arnaldo, pelos conhecimentos transmitidos, incentivo, confiança e amizade.

Aos meus amigos, pelos momentos de alegria e apoio durante este período.

A toda equipe do ReproPEL pela parceria nas horas do mate, companheirismo e paciência no convívio diário. Aos colegas de grupo que sempre me auxiliaram nas atividades, em especial a Monike, Fabi, Fernando, Kauê, Serginho e Henrique, pela disponibilidade de ajuda sempre.

Aos membros do BioRep/UFSM pelo auxílio, e por disponibilizarem reagentes e infraestrutura para os experimentos. Em especial à Monique pelos conhecimentos transmitidos, parceria e paciência durante minhas idas à UFSM. Ao Centro Agropecuário da Palma/UFPel pela estrutura e cedência dos animais para o estudo.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), pelo financiamento do estudo.

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma para alcançar este objetivo, auxiliando no meu aprendizado, pela dedicação e paciência, agradeço.

Muito obrigada!

## Resumo

HAAS, Cristina Sangoi. **Função e regulação de membros da família TGF beta no crescimento folicular final e ovulação em bovinos**. 2015. 43f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

A foliculogênese culmina com a ovulação sendo que, em espécies monovulares, apenas um folículo é selecionado, enquanto que os demais entram em processo de atresia. Uma vez que todos os folículos encontram-se sob o mesmo ambiente endócrino, fica evidente que fatores produzidos no ovário são reguladores do crescimento e da diferenciação. Neste contexto, destacam-se fatores pertencentes à superfamília dos fatores de crescimento transformantes beta (TGF- $\beta$ ) e seus receptores. Apesar da grande relevância, a real função dos TGF- $\beta$  na fisiologia ovariana ainda não foi elucidada. Desta forma, o presente estudo teve por objetivo avançar no entendimento da função e regulação de fatores locais no ovário bovino, avaliando a função do fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF9) no crescimento folicular final. Além disso, objetivou-se caracterizar a expressão de membros da família TGF- $\beta$ , em especial as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e seus receptores, na luteinização e ovulação em bovinos. Em um primeiro experimento, a injeção intrafolicular de GDF9 em folículos dominantes ( $9\pm 0,2$  mm de diâmetro), nas concentrações finais de 100 ou 1000 ng/mL, não teve efeito sobre o crescimento folicular final, estro e ovulação ( $P > 0,05$ ). No segundo estudo, utilizando células da granulosa provenientes de folículos pré-ovulatórios ( $> 12$  mm), coletados *in vivo* em diferentes momentos (0, 3, 6, 12 e 24 h) após aplicação i.m de GnRH, a expressão de RNAm das *BMPs 1* e *4* não foi regulada. Por outro lado, a expressão de *BMP2* aumentou significativamente 3 e 6 h após GnRH ( $P < 0,05$ ). A expressão dos receptores *BMPR2* e *TGFBR1* aumentou significativamente 12 h após tratamento, enquanto que os receptores *BMPR-1A* e *-1B* foram mais expressos 0 e 12 h após GnRH. Os níveis de progesterona no fluido folicular decresceram linearmente com o aumento da expressão de *BMPR-1A* ( $R^2=0,49$ ) e *-1B* ( $R^2=0,5$ ). O aumento na expressão de *TGFBR1* determinou uma diminuição quadrática nos níveis de progesterona ( $R^2=0,45$ ). O aumento na expressão de *BMP2* ( $R^2=0,4$ ) e *BMPR1A* ( $R^2=0,28$ ) determinou um aumento na concentração de estradiol, apresentando efeito linear e quadrático, respectivamente. Por outro lado, os níveis de estrógeno decresceram linearmente com o aumento na expressão de *BMPR2* ( $R^2=0,31$ ). Os dados sugerem que a elevação nos níveis de GDF9 em folículos diferenciados não altera o destino dos mesmos. A expressão da *BMP2* está associada a maiores níveis de estradiol, enquanto que a expressão dos receptores de BMPs sugere uma inibição no processo de luteinização. A elucidação do papel dos fatores locais na fisiologia ovariana contribui com o entendimento de patologias reprodutivas e desenvolvimento de tecnologias com fins de contracepção ou aumento da taxa ovulatória.

**Palavras-chave:** BMP15; BMP; GDF9; fatores locais; foliculogênese; ovulação

## Abstract

HAAS, Cristina Sangoi. **Function and regulation of TGF beta members during final follicular growth and ovulation in cattle.** 2015. 43f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Antral follicle development culminates with ovulation and, in monovulatory species, only one follicle is selected to grow whereas all the others undergo atresia. During these processes, all the follicles are under the same endocrine environment, indicating the participation of locally produced factors in the regulation of follicular growth and differentiation. In this context, the involvement of transforming growth factors-beta (TGF- $\beta$ ) family members and their receptors is highlighted. Despite their high relevance, the real functions of TGF- $\beta$  proteins in ovarian physiology is still poorly understood. In this regard, the aim of this study was to gain insight into the function and regulation of ovarian factors, investigating the function of growth and differentiation factor 9 (GDF9) during dominant follicle growth. Furthermore, we tested the hypothesis that TGF- $\beta$  members, especially bone morphogenetic proteins (BMPs) and their receptors are regulated during luteinization and ovulation processes in cattle. In a first experiment, the intrafollicular injection of GDF9 in dominant follicles ( $9\pm 0.2$  mm diameter) at final concentrations of 100 and 1000ng/mL did not affect follicular growth, estrus manifestation and ovulation ( $P>0.05$ ). In a second study, using granulosa cells from preovulatory follicles ( $>12$ mm), collected *in vivo* at different time-points (0, 3, 6, 12 and 24 h) after GnRH treatment, mRNA expression of *BMPs 1* and *4* was not regulated. By the other size, *BMP2* expression was significantly upregulated at 3 and 6 h ( $P<0.05$ ). The mRNA expression of *BMPR2* and *TGFBR1* increased 12 h after GnRH treatment ( $P<0.05$ ), whereas the receptors *BMPR-1A* and *-1B* were more expressed at the moment (0 h) and 12 h after GnRH injection. Follicular fluid progesterone concentrations decreased linearly with increased *BMPR-1A* ( $R^2=0.49$ ) and *-1B* ( $R^2=0.5$ ) mRNA expression. The increase in *TGFBR1* had a negative quadratic effect on progesterone concentration ( $R^2=0.45$ ). The increase in *BMP2* ( $R^2=0.4$ ) and *BMPR1A* ( $R^2=0.28$ ) determined an increase in estradiol, having linear and quadratic effects, respectively. By the other side, follicular fluid estradiol concentrations decreased linearly with increased *BMPR2* ( $R^2=0.31$ ) expression. Collectively, the results suggest that increasing the levels of GDF9 in differentiated follicles does not affect their fate. *BMP2* expression is associates to high levels of estradiol in follicular fluid, whereas *BMPRs* expression suggests an inhibitory effect on luteinization. Elucidating the functions of local factors in ovarian physiology would allow to better understand pathological processes and the development of technologies for contraception or, paradoxally, to increase ovulation rates.

**Key-words:** BMP15; BMP; GDF9; local factors; contraception; folliculogenesis; ovulation

## Lista de Figuras

- Figura 1: Efeito da injeção intrafolicular de GDF9rh no crescimento folicular bovino..... 25
- Figura 2: Expressão de RNAm dos genes *BMP1* (A), *BMP2* (B) e *BMP4* (C) em células da granulosa nos momentos 0, 3, 6, 12 e 24 horas após a administração de GnRH..... 26
- Figura 3: Expressão de RNAm dos genes *BMPR2* (A), *TGFBR1* (B), *BMPR1B* (C) e *BMPR1A* (D) em células da granulosa nos momentos 0, 3, 6, 12 e 24 horas após a administração de GnRH..... 27
- Figura 4: A, C, E: Correlação dos níveis de progesterona no fluido folicular e expressão de RNAm dos genes *TGFBR1* (A), *BMPR1B* (C) e *BMPR1A* (E) nas células da granulosa. B, D, F: Correlação dos níveis de estradiol folicular e expressão de RNAm dos genes *BMP2* (B), *BMPR1A* (D) e *BMPR2* (F). ..... 28



## Lista de Tabelas

Tabela 1	<i>Primers</i> usados para a análise da expressão de genes.....	23
----------	---	----

## Lista de Abreviaturas e Siglas

BMP	Proteína morfogenética óssea
BMPR1A	Receptor de BMP tipo 1A
BMPR1B	Receptor de BMP tipo 1B (ou ALK6)
BMPR2	Receptor de BMP tipo 2
FGF10	Fator de crescimento fibroblástico 10
FSH	Hormônio folículo-estimulante
FSHR	Receptor de FSH
GDF9	Fator de crescimento e diferenciação 9
GnRH	Hormônio Liberador de gonadotrofina
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
IGF1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IGFBP	Proteína de ligação do IGF
LH	Hormônio luteinizante
LHCGR	Receptor de LH
SMAD	<i>Similar to mothers against decapentaplegic</i>
StAR	<i>Steroidogenic acute regulatory protein</i>
TGFBR1	Receptor do GDF9 tipo 1 (ou ALK5)
TGF- $\beta$	Fatores de crescimento transformantes beta
HSD3B	<i>3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase</i>
CYP19A1	<i>Cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1</i>

## Sumário

<b>1 Introdução.....</b>	<b>10</b>
<b>2 Revisão da Literatura.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Controle endócrino da foliculogênese antral.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2 Participação dos fatores oocitários na foliculogênese.....</b>	<b>14</b>
<b>2.3 Proteínas morfogenéticas ósseas expressas nas células foliculares</b>	<b>16</b>
<b>2.4 Receptores de TGF-beta na foliculogênese antral.....</b>	<b>18</b>
<b>3 Metodologia.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Experimento 1: Efeito da injeção intrafolicular de GDF9 sobre o crescimento do folículo dominante e ovulação .....</b>	<b>20</b>
<b>3.2 Experimento 2: Expressão de membros da família TGF beta e de seus receptores nas células da granulosa após a indução da ovulação com GnR.....</b>	<b>21</b>
<b>3.3. Dosagens hormonais.....</b>	<b>23</b>
<b>3.4 Análise estatística.....</b>	<b>23</b>
<b>4 Resultados.....</b>	<b>25</b>
<b>5 Discussão.....</b>	<b>29</b>
<b>6 Considerações Finais.....</b>	<b>33</b>
<b>Referências.....</b>	<b>34</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>42</b>

## 1 Introdução

A foliculogênese antral culmina com a ovulação, sendo controlada primariamente por mecanismos endócrinos bem estabelecidos, o que se deve a estudos pioneiros acerca da dinâmica de crescimento folicular, através de ultrassonografia aliada às dosagens hormonais. Em espécies monovulares, a emergência folicular caracteriza-se pelo crescimento de um grupo de folículos recrutados através da elevação dos níveis do hormônio folículo-estimulante (FSH). Desse grupo de folículos, apenas um é selecionado para continuar o desenvolvimento (dominante), enquanto que os demais regredem no processo de atresia (subordinados) (GINTHER et al., 1996). Uma vez que todos os folículos encontram-se sob os mesmos níveis de gonadotrofinas no momento da emergência e seleção folicular, os fatores produzidos localmente no ovário são considerados reguladores do ambiente folicular local, auxiliando na determinação do destino de cada folículo: regressão ou ovulação (GINTHER et al., 1996), em parte pela regulação da diferenciação das células da granulosa.

Dentre os fatores produzidos e regulados localmente, pode-se citar o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1) e suas proteínas de ligação (IGFBPs). O sistema IGF já foi amplamente estudado, sendo conhecidas sua regulação e função no ovário bovino (MONGET et al., 2002). Além deste sistema, outras proteínas produzidas nas células foliculares e nos oócitos têm despertado a atenção de diversos grupos de pesquisa. Neste contexto, destacam-se alguns fatores como os membros da superfamília dos fatores de crescimento transformantes beta (TGF- $\beta$ ; revisado por (KNIGHT & GLISTER, 2006), especialmente a proteína morfogenética óssea 15 (BMP15) e o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF9), juntamente com seus receptores. Enquanto o GDF9 e a BMP15 parecem regular principalmente a diferenciação folicular (SPICER et al., 2008; MCNATTY et al., 2009), outros membros da mesma família, como as BMPs 4, 6 e 7, embora menos estudados, parecem atuar como importantes reguladores da esteroidogênese (GLISTER et al., 2004). Nosso grupo demonstrou a regulação das BMPs 1, 2, 4 e 6 (dados não publicados) e dos receptores de GDF9 e BMP15 (BMPR2, TGFBR1 e BMPR1B) (GASPERIN et al., 2014),

durante o divergência folicular. Porém, pouco se sabe sobre a regulação e função das BMPs no crescimento folicular final.

As proteínas BMP15 e GDF9 parecem atuar em sinergia na regulação das funções ovarianas (GALLOWAY et al., 2000; JUENGEL, 2002; HANRAHAN et al., 2004). São consideradas moduladoras da foliculogênese e fertilidade (JUENGEL et al., 2004a), além de indispensáveis para o desenvolvimento do ovário, uma vez que a ausência das mesmas resulta em infertilidade (GALLOWAY et al., 2000). A estas proteínas foram atribuídas funções no desenvolvimento folicular, na maturação oocitária, produção de esteroides, expressão de receptores de gonadotrofinas e determinação do número de folículos ovulatórios (CHANG et al., 2013). Há evidências de que estes fatores podem estar envolvidos nos processos de luteinização e ovulação (JUENGEL et al., 2004a), embora esta hipótese não tenha sido investigada em espécies monovulares.

Quanto aos receptores de BMPs, importantes funções no controle do crescimento e regressão folicular foram atribuídas, em especial para o receptor tipo 1 da BMP15, o BMPR1B. Uma mutação que altera a sinalização deste receptor está associada a aumento na taxa ovulatória em ovinos, sendo que a introdução desta mutação em rebanhos possui um efeito direto na produção animal, por aumentar o número de cordeiros nascidos (MULSANT et al., 2001; SOUZA et al., 2001). Além disto, tanto o BMPR1A quanto o BMPR1B parecem atuar conjuntamente no controle do crescimento e regressão folicular, evitando a formação de tumores (EDSON et al., 2010).

Uma vez que membros da família TGF- $\beta$  sintetizados no folículo atuam em sinergia ou, muitas vezes, como antagonistas, é necessário investigar não apenas proteínas expressas pelo oócito, mas também as produzidas por outras células foliculares. Neste contexto, diferenças na regulação e função dos TGFs e seus receptores têm sido descritas nas diferentes espécies, estando associadas ao desenvolvimento da foliculogênese, ovulação e luteogênese (ERICKSON & SHIMASAKI, 2003; KNIGHT & GLISTER, 2006). Entretanto, a identificação da expressão e da regulação dos membros da família TGF- $\beta$  e seus respectivos receptores nas células foliculares após o pico pré-ovulatório de GnRH/LH ainda é desconhecida.

Experimentos funcionais *in vivo* são necessários para melhor estabelecer a regulação e função fisiológica dos fatores locais e seus receptores ao longo da foliculogênese. Nesse contexto, o bovino fornece um modelo *in vivo* bastante adequado para o estudo de eventos relacionados à seleção folicular e manipulação individual do folículo. Deste modo, possibilita estudar a importância de determinado fator, para posterior utilização deste conhecimento, promovendo um ganho em termos de produção e aplicação prática na reprodução.

Com base no acima exposto, o presente estudo teve por objetivo avançar no entendimento da função e regulação de fatores locais no ovário bovino, avaliando a função do fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF9) no crescimento folicular final. Além disso, testou-se a hipótese de que os membros da família TGF- $\beta$ , em especial as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) 1, 2, 4 e 6 e receptores associados, são regulados durante o processo de luteinização e ovulação em bovinos. A elucidação da função dos fatores locais pode contribuir no entendimento de patologias ovarianas nas diferentes espécies e no desenvolvimento de tecnologias que tenham por objetivo a contracepção, ou aumento da taxa ovulatório.

## **2 Revisão da Literatura**

### **2.1 Controle endócrino da foliculogênese antral**

A formação do gameta feminino (oogênese) e a foliculogênese são processos simultâneos que culminam na ovulação e liberação de um oócito maduro. A foliculogênese é dividida em pré-antral, que vai desde a formação dos folículos primordiais, passando pelas fases de folículo primário e secundário; e antral, a partir da formação dos folículos terciários (antrais). O número de folículos primordiais, que compõem a reserva de células germinativas, já se encontra estabelecido nas gônadas ao nascimento. Esses folículos permanecem em estado de quiescência até a sua ativação ao longo da fase reprodutiva da fêmea, sendo que uma vez ativados são destinados à ovulação ou atresia, levando a uma perda constante de células germinativas ao longo da vida. Este desenvolvimento pré-antral é controlado por fatores autócrinos/parácrinos, produzidos localmente nos ovários (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

Após a puberdade, o ciclo estral ocorre devido a uma sequência de eventos, em intervalos regulares, até que aconteça o seu bloqueio, como em caso de gestação ou de períodos de anestro fisiológico (devido ao fotoperíodo, à lactação, etc) ou patológico. O crescimento folicular antral na espécie bovina ocorre em ondas, tendo como principal regulador os fatores endócrinos. Deste modo, é regulado principalmente pelas gonadotrofinas hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), além de seus receptores (FSHR e LHCGR) e esteróides ovarianos. As ondas foliculares iniciam com a emergência em resposta à elevação dos níveis de FSH, o qual estimula o recrutamento de um grupo de folículos antrais pequenos (ADAMS et al., 1992; GINTHER et al., 1996), que são dependentes de gonadotrofinas. Esses folículos recrutados, em crescimento, secretam estradiol que ocasiona a redução dos níveis de FSH.

Nestas condições endócrinas, com a diminuição dos níveis de FSH, apenas um folículo deste grupo é selecionado para continuar o desenvolvimento (folículo dominante), completar a maturação e ovular (na presença de baixos níveis de

progesterona), enquanto que os demais entram em atresia (folículos subordinados) durante o processo conhecido como divergência folicular (GINTHER et al., 1996). A diferenciação do folículo dominante em fêmeas bovinas *Bos taurus taurus* ocorre quando esta estrutura atinge diâmetro aproximado de 8,5 mm, quando as células da granulosa passam a expressar receptores de LH (LHCGR), embora maior expressão seja observada em folículos a partir de 9 mm (GASPERIN et al., 2015). Cabe ressaltar que apenas folículos dominantes selecionados em um ambiente com níveis de progesterona decrescentes, irão ovular em consequência do aumento dos níveis de LH.

Considerando que todos os folículos da mesma onda estão sob influência dos mesmos hormônios endócrinos, os fatores produzidos pelas células foliculares são cruciais no processo de seleção e diferenciação do folículo dominante (EVANS & FORTUNE, 1997). Sendo assim, os oócitos e demais células foliculares participam da regulação da função ovariana produzindo fatores que atuam regulando o crescimento e diferenciação (EPPIG et al., 1997; OTSUKA et al., 2001b; CHANG et al., 2013)

## **2.2 Participação dos fatores oocitários na foliculogênese**

Nos mamíferos, a seleção folicular e consequente taxa de ovulação são determinadas pela interação de mediadores endócrinos e parácrinos (locais). Entre os fatores produzidos pelas células ovarianas, destacam-se os membros da superfamília dos fatores de crescimento transformantes beta (TGF- $\beta$ ) (JUENGEL et al., 2004a), em especial a BMP15 e o GDF9 (KNIGHT & GLISTER, 2006), expressos principalmente pelos oócitos, e seus respectivos receptores. Os dados presentes na literatura demonstram funções distintas das proteínas oocitárias em diferentes espécies e modelos utilizados (MCNATTY et al., 2005; SPICER et al., 2006). Membros da família TGF- $\beta$ , em especial os BMPs, possuem funções reguladoras nos ovários de mamíferos, como recrutamento de folículos, proliferação celular, síntese de esteróides, atresia, ovulação, luteinização e formação do corpo lúteo, além de agir em vias de sinalização das gonadotrofinas, como o FSH (revisado por (KRISTENSEN et al., 2014)

O GDF9 e a BMP15 são capazes de regular tanto a foliculogênese pré-antral como a antral. Oócitos bovinos apresentam um padrão elevado de expressão de RNAm de BMP15 e GDF9, porém, sem regulação ao longo do desenvolvimento



folicular antral (CAIXETA et al., 2009). Contudo, durante o desenvolvimento pré-antral, atuam sinergicamente e são essenciais na transição do folículo primário para secundário, fato que foi demonstrado através de mutações espontâneas em ovinos que, em homozigose, na ausência de proteína funcional, estão associadas à esterilidade (GALLOWAY et al., 2000; HANRAHAN et al., 2004). Além disso, a administração de GDF9 em ratas imaturas induz a progressão de folículos primordiais e primários (VITT et al., 2000). Em contrapartida, a diminuição da expressão de GDF9 leva à redução do número de folículos funcionais nos ovários de ratas (CHOUDHURY & KHOLE, 2015).

Na regulação da foliculogênese antral, ambas as proteínas foram associadas à determinação da taxa de ovulação, diferenciação folicular, maturação oocitária, regulação da síntese de esteroides e da expressão de receptores de gonadotrofinas (EPPIG et al., 1997; OTSUKA et al., 2001b; CHANG et al., 2013). Também regulam a proliferação, expansão, o metabolismo e a apoptose das células do *cumulus* (GILCHRIST et al., 2008). Além disto, foi demonstrado que o GDF9 e a BMP15 previnem a luteinização prematura (SPICER et al., 2008).

Grande parte do conhecimento acerca das funções das proteínas oocitárias na foliculogênese antral em ruminantes foi obtido através das mutações espontâneas inativadoras nos genes BMP15 e GDF9 que, em heterozigose, com a redução nos níveis funcionais das proteínas, induzem superovulação (GALLOWAY et al., 2000; HANRAHAN et al., 2004). Os dados obtidos a partir dos diferentes genótipos destas mutações sugerem que estas proteínas são indispensáveis no desenvolvimento folicular inicial mas, posteriormente, atuam como inibidores da diferenciação folicular (JUENGEL et al., 2009). Acredita-se que a diminuição nos níveis de BMP15 funcional, nos casos em que apenas um alelo do gene é inativado, induza à diferenciação precoce dos folículos, resultando em maior responsividade ao LH nas células da granulosa (MCNATTY et al., 2009).

De forma similar ao observado nos casos de mutações em heterozigose, a imunização contra BMP15 e GDF9 durante curto período promoveu aumento na taxa ovulatória em ovinos e bovinos (JUENGEL et al., 2004b; JUENGEL et al., 2009). A diminuição da disponibilidade das proteínas alterou a taxa ovulatória sem efeitos negativos na fecundação, no desenvolvimento embrionário e na manutenção da gestação em ovinos (JUENGEL et al., 2004b). Estes dados demonstram a viabilidade de utilizar a manipulação dos fatores oocitários para obter incremento produtivo.

Por outro lado, a imunização passiva, utilizando anticorpos que bloqueiam a atividade do GDF9 ou BMP15, afetou negativamente a ovulação, função luteal e síntese de progesterona (JUENGEL, 2002). Ainda, a imunização contra tais proteínas, por períodos prolongados, causou um bloqueio no desenvolvimento folicular em ovinos (MCNATTY et al., 2007). Sendo assim, pode-se supor a possibilidade de promover contracepção através do bloqueio da atividade do GDF9 e/ou BMP15.

Em humanos, alterações no padrão fisiológico de expressão do sistema BMP parecem estar associadas à falência ovariana precoce (DIXIT et al., 2006). Em oócitos e células da granulosa de mulheres, os níveis de expressão de BMP15 e GDF9 varia conforme o desenvolvimento folicular. Em pacientes com a síndrome do ovário policístico, ocorre redução da expressão destas proteínas na fase folicular inicial em comparação a ovários normais (WEI et al., 2014). Ademais, uma mutação no GDF9 em mulheres jovens foi associada à reserva ovariana diminuída devido à redução da produção da proteína na sua forma madura, o que levou à diminuição no efeito indutor do GDF9 na proliferação de células da granulosa humana em cultivo *in vitro* (WANG et al., 2013).

A quantificação de GDF9 no fluido folicular foi realizada em humanos, sendo os níveis da proteína madura positivamente correlacionados à maturação nuclear e qualidade embrionária, e negativamente correlacionados aos níveis de progesterona no fluido folicular (GODE et al., 2011). Em primatas, os níveis de GDF9 no fluido folicular não foram alterados após a indução da ovulação com hCG (DUFFY, 2003). No fluido folicular de bovinos esta proteína foi detectada em abundância, no entanto não diferiu entre os folículos dominantes e subordinados (dados não publicados). Ao nosso conhecimento, não há estudos manipulando os níveis de GDF9 no ambiente folicular, o que poderia auxiliar na identificação da função desta proteína.

### **2.3 Proteínas morfogenéticas ósseas expressas nas células foliculares**

Além das proteínas BMP15 e GDF9, sintetizadas principalmente pelo oócito, outras BMPs também parecem desempenhar funções no controle da foliculogênese. Recentemente, nosso grupo demonstrou a regulação das BMPs 1, 2, 4 e 6 (dados não publicados) durante a divergência folicular, onde o padrão de expressão da BMP4 sugere uma função na proliferação celular e/ou esteroidogênese, enquanto que a BMP2 parece não ser regulada no período próximo à divergência folicular. Entretanto,

a regulação destas proteínas e de seus receptores durante o processo de luteinização e ovulação em bovinos é desconhecida.

Há evidências do envolvimento das BMPs no remodelamento da matriz extracelular e regulação da esteroidogênese ovariana. Algumas BMPs foram pouco estudadas, como a BMP1 que foi descrita no ovário, sendo negativamente regulada durante o crescimento folicular final, apresentando uma atividade de colagenase *in vitro* (CANTY-LAIRD et al., 2010), o que sugere um envolvimento na ovulação.

A BMP2 parece desempenhar um papel regulador no desenvolvimento do folículo dominante. Selvaraju et al. (2013), observaram uma maior expressão de BMP2 e BMPR2 na fase de dominância em relação a fases anteriores de desenvolvimento. Além disso, a BMP2 estimulou a síntese de estradiol pela granulosa bovina, enquanto inibiu a síntese de progesterona. Estes dados estão de acordo com a hipótese de que as BMPs podem atuar como inibidores da luteinização precoce. Outras BMPs também estão fortemente associadas à esteroidogênese, como as BMPs 4, 6 e 7 que, em cultivo de células da granulosa aumentam a síntese de estradiol estimulada por IGF (GLISTER et al., 2004). Por outro lado, a BMP4 suprime a síntese de progesterona inibindo a expressão do gene da enzima *steroidogenic acute regulatory protein* (StAR) (YAMASHITA et al., 2010), responsável pela internalização de colesterol na mitocôndria. Em ratas, a BMP6, do mesmo modo que a BMP15, diminui a resposta das células da granulosa ao FSH (OTSUKA et al., 2001a), enquanto que na granulosa bovina, a BMP6 inibe a expressão de importantes enzimas esteroidogênicas como a *cholesterol side-chain cleavage* (CYP11A1), HSD3B e aromatase (CYP19A1) (KAYANI et al., 2009). Em cultivo primário de células da teca bovina, as BMPs 4, 6 e 7 inibiram fortemente a síntese de andrógenos, principalmente através da supressão da enzima *17-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase* (GLISTER et al., 2005).

Com base no acima exposto, há evidências suficientes para inferir sobre uma participação das BMPs na regulação da esteroidogênese em eventos como luteinização e luteólise. Corroborando com esta hipótese, recentemente demonstrou-se que as BMPs 2, 4 e 6 são mais expressas em corpos lúteos de mulheres durante a luteólise, sendo negativamente reguladas por hCG (NIO-KOBAYASHI et al., 2015). Coletivamente, a maioria dos dados sugerem que as BMPs e seus receptores atuam regulando negativamente a síntese de progesterona, o que sugere que as mesmas estejam envolvidas na transição da síntese de estrógeno para progesterona,

estimulada pelo pico ovulatório de LH. Entretanto, até o presente momento, esta hipótese ainda não foi testada.

#### 2.4 Receptores de TGF- $\beta$ na foliculogênese antral

A regulação da expressão de algumas BMPs e de seus receptores em folículos antrais foi avaliada em roedores (ERICKSON & SHIMASAKI, 2003), suínos (PARADIS et al., 2009) e bovinos (GLISTER et al., 2010). Um sistema funcional de sinalização dos BMPs pelos receptores *BMPR1A*, *BMPR1B*, e *BMPR2* está presente nos folículos antrais bovinos e desempenha um papel no desenvolvimento ou na diferenciação das células foliculares de bovinos (FATEHI et al., 2005). A sinalização da BMP15 e GDF9 inicia através do mesmo receptor *BMPR2* (GILCHRIST et al., 2008). Após a ligação ao receptor tipo 2, a BMP15 sinaliza por meio do receptor *BMPR1B* (também conhecido como *ALK6*) (MOORE et al., 2004). Já o receptor tipo 1 do GDF9 é o *TGFBR1* (conhecido também como *ALK5*) (MAZERBOURG et al., 2004). Após ligação ao receptor tipo 2, e consequente fosforilação do tipo1, a sinalização ocorre a partir da ativação das “*similar to mothers against decapentaplegic*” reguladas por receptores (R-SMADs) que, isoladamente, ou em combinação a outros fatores, regulam a expressão gênica.

Uma mutação no receptor tipo 1 *BMPR1B* (*ALK6*), envolvido na sinalização da BMP15, e das BMPs 2 e 4, foi identificada em ovelhas estando associada a um marcado incremento na taxa ovulatória (MULSANT et al., 2001; SOUZA et al., 2001). Além disso, demonstrou-se recentemente que o *knockout* dos receptores *BMPR-1A* e *-1B* em camundongos induz a tumores ovarianos na maioria dos animais (EDSON et al., 2010), sugerindo uma importante função na regulação do desenvolvimento e regressão dos folículos.

Jayawardana et al. (2006) demonstraram maior expressão de *BMPR2* e *BMPR1A* na granulosa de folículos bovinos pré-ovulatórios (diâmetro médio de 15 mm) em comparação aos obtidos antes da divergência (diâmetro médio de 7,7 mm). Ainda, demonstraram que estradiol e FSH em combinação estimulam a expressão dos dois receptores e o FSH isoladamente diminuiu a expressão destes genes. Já Glister et al. (2010) utilizando folículos classificados pelo diâmetros, sem considerar a viabilidade folicular, demonstraram pouca regulação dos receptores de BMPs.

Em um estudo recente, nosso grupo demonstrou que a expressão de RNAm dos receptores do GDF9, *BMPR2* e *TGFRB1*, não é diferentemente regulada nas células da granulosa de folículos dominantes e subordinados no dia 4 da onda folicular (GASPERIN et al., 2014). Em contrapartida, no mesmo estudo, demonstrou-se que o *BMPR1B* é mais expresso em folículos subordinados atrésicos e após o bloqueio dos receptores de estrógeno e tratamento com FGF10, potente inibidor do desenvolvimento folicular. Portanto, pode-se inferir que a mutação no receptor *BMPR1B*, além de estar associada a folículos responsivos ao LH precocemente (MCNATTY et al., 2009), também pode influenciar na resistência à atresia.

Além da participação dos receptores de BMPs no desenvolvimento folicular, há evidências de funções durante a luteólise. Em células luteais humanas, o tratamento com hCG diminui a expressão dos receptores *BMPR1A*, *BMPR1B*, *BMPR2* *in vitro*, sugerindo que estes estão envolvidos na regressão do corpo lúteo (NIO-KOBAYASHI et al., 2015). Portanto, estas evidências sugerem que os receptores de BMPs também são regulados negativamente após o pico ovulatório de LH, uma vez que neste período que antecede a ovulação, inicia-se a síntese de progesterona pelas futuras células luteais.

Apesar da regulação das BMPs e de seus receptores já ter sido investigada ao longo do desenvolvimento folicular e luteólise, a regulação dos mesmos nas células da granulosa de folículos pré-ovulatórios estimulados ou não com GnRH, ainda é desconhecida. A identificação da expressão e da regulação dos membros da família TGF- $\beta$  e seus respectivos receptores nas células representa uma alternativa para inferir sobre suas funções no período periovulatório e na luteinização.

Em espécies monovulares, a regulação e função dos fatores locais produzidos no ovário ainda não estão claras. Devido a isso o estudo da regulação destes fatores no período pré-ovulatório fornecerá subsídios para melhor compreendermos funções elementares como esteroidogênese e luteogênese, assim como a interação dos mesmos com hormônios já conhecidos, como a progesterona e o estradiol. A associação do uso de modelos *in vivo* se torna uma importante ferramenta para elucidar mecanismos fisiológicos de sistemas locais ovarianos em eventos reprodutivos.

### **3 Metodologia**

Os procedimentos envolvendo animais foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA-UFPel, registro nº 3531).

#### **3.1 Experimento 1: Efeito da injeção intrafolicular de GDF9 sobre o crescimento do folículo dominante e ovulação.**

O primeiro experimento teve por objetivo avaliar a função do fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF9) no crescimento folicular final e ovulação em bovinos. Testou-se a hipótese de que a injeção intrafolicular de GDF9 inibe a diferenciação folicular, afetando o crescimento folicular final e a ovulação nesta espécie.

Foram utilizadas 10 fêmeas adultas cíclicas, não lactantes e não gestantes, da raça Jersey, com condição corporal  $\geq 3$  (escala de 1-5). Estes animais foram submetidos a um protocolo hormonal de sincronização de estro (Zoetis, São Paulo, Brasil) que consistiu de uma aplicação de prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  (25 mg, i.m.), 2 mg de benzoato de estradiol e um implante intravaginal de liberação lenta contendo 1 g de progesterona, para induzir a regressão folicular e uma nova onda de crescimento. O implante intravaginal permaneceu por 7 dias, até que os folículos em crescimento atingissem diâmetro entre 8,5 e 9,5 mm.

Foram realizadas, no mínimo, duas avaliações de diâmetro folicular através de ultrassonografia transretal utilizando transdutor linear de 6 MHz (Pie Medical AquilaVet, Maastricht, The Netherlands) antes da administração do tratamento para garantir que os folículos estavam em crescimento. Todas as estruturas maiores que 6 mm foram identificadas e desenhadas em três cortes esquemáticos dos ovários. As fêmeas bovinas foram submetidas a tratamento intrafolicular com PBS (grupo controle; n=3) ou GDF9 recombinante humano (GDF9rh; Sigma Aldrich) nas concentrações finais de 100 (n=3) ou 1000 (n=4) ng/mL. As doses de GDF9rh foram determinadas multiplicando-se por dez as doses efetivas observadas *in vitro*

(MOTTERSHEAD et al., 2011). Previamente à injeção intrafolicular, os animais foram submetidos à limpeza perineal e anestesia epidural, utilizando 3 mL de lidocaína a 2%. Os procedimentos de injeção intrafolicular foram realizados conforme FERREIRA et al. (2007). Brevemente, este procedimento foi realizado com auxílio de um equipamento de ultrassom acoplado à uma sonda vaginal de 5 MHz. Utilizou-se um sistema com duas agulhas estéreis, uma interna (25G) e outra externa (20G), na qual a agulha externa foi introduzida no ovário até uma distância de aproximadamente 2 mm do folículo de interesse. Nesse momento, a agulha interna foi inserida até ser visualizada no interior do folículo. A injeção foi confirmada através da visualização de um turbilhão no interior do folículo. Os folículos injetados foram acompanhados a cada 24 h até a regressão, ou a manifestação de estro e ovulação espontânea. A ovulação foi caracterizada pelo desaparecimento do folículo tratado entre duas avaliações, após manifestação de estro.

Para a injeção intrafolicular, o volume total administrado foi adequado com base no volume de fluido folicular total. Esse volume foi estimado pela equação de regressão linear  $V = -685,1 + 120,7D$ , em que "V" corresponde ao volume em microlitros e "D" ao diâmetro do folículo a ser injetado em milímetros (FERREIRA et al., 2007). A concentração inicial de GDF9rh era dez vezes maior do que a concentração final desejada no interior do folículo, uma vez que foi injetado um volume equivalente a um décimo do volume total de fluido folicular.

### **3.2. Experimento 2: Expressão de membros da família TGF beta e de seus receptores nas células da granulosa após a indução da ovulação com GnRH**

O objetivo do segundo experimento foi investigar a regulação de fatores da família TGF- $\beta$  e dos seus receptores durante a ovulação. Testou-se a hipótese de que estes fatores são regulados nas células da granulosa durante o processo de luteinização e ovulação induzidos por GnRH em bovinos.

Para caracterizar a expressão das proteínas morfogenéticas ósseas (*BMPs*) 1, 2, 4 e 6 e dos receptores *BMPR2*, *TGFR1*, *BMPR1A* e *BMPR1B* durante a ovulação, foram utilizadas amostras provenientes de um banco de fluido e células da granulosa provenientes de folículos com mais de 12 mm coletados nos momentos 0 (n=4), 3 (n=5), 6 (n=5), 12 (n=5) e 24 (n=4) horas após a administração i.m. de GnRH (SANTOS et al., 2012).

Brevemente, essas amostras foram coletadas a partir de vacas cíclicas, não gestantes e não lactantes das raças Hereford e Angus com condição corporal  $\geq 3$  (escala de 1-5) e peso de aproximadamente 450Kg (n= 23), que tiveram uma nova onda folicular induzida conforme protocolo descrito no experimento 1. Os animais nos quais o maior folículo em crescimento atingiu diâmetro  $\geq 12$  mm receberam uma injeção de GnRH (100  $\mu$ g de acetato de gonadorelina, i.m.; Tortuga, Brasil) e foram aleatoriamente distribuídos para a ovariectomia via colpotomia em momentos específicos (0, 3, 6, 12 e 24 horas após a administração de GnRH). O líquido folicular, células da granulosa e da teca foram armazenados em nitrogênio líquido para posterior extração de RNA e proteína. Este banco de material encontra-se disponível no Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria. Neste modelo é possível determinar se há regulação da expressão de ligantes e receptores que podem estar envolvidos no processo de luteinização e ovulação.

Para quantificação da expressão gênica, o RNA total das células da granulosa foi extraído por protocolo baseado em colunas de sílica (RNAeasy Mini Kit; Qiagen, Mississauga, ON, Canadá) de acordo com as recomendações do fabricante. Para quantificar o RNA extraído, a densidade ótica foi determinada através de espectrofotômetro (NanoDrop- Thermo Scientific - Waltham, USA; Abs 260/280 nm ratio). A pureza do RNA foi avaliada através da taxa de absorção da relação OD260/OD280, de forma que não foram utilizados valores inferiores a 1,8. O RNA total foi tratado com DNase (Promega, Madison, WI) a 37°C por 5 min para digerir qualquer DNA genômico 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. Para testar uma possível contaminação das amostras de granulosa com células da teca, o gene que codifica para a enzima *CYP17A* foi detectado através de PCR, sendo que todas estavam livres de contaminação após 30 ciclos de PCR. 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 média da amplificação dos genes constitutivos *ciclofilina* e *GAPDH*. O cálculo da expressão relativa foi baseado numa curva de diluição seriada do cDNA, conforme descrito



anteriormente (GASPERIN et al., 2014). Os genes investigados e os respectivos iniciadores estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1:** *Primers* usados para a análise da expressão de genes.

Gene	Sequência	Referência/nº acesso
<i>BMP1</i>	F GGCACGCAAGCTCTACAAGTG	desenhado
	R GTGGGCAGAGTAGCCATTGG	
<i>BMP2</i>	F CCAAGAGGCATGTGCGGATTAGCA	Kayani et al., 2009
	R TCCTTTCCCATCGTGGCCAAAAGT	
<i>BMP4</i>	F TTTATGAGGTTATGAAGCCCCGGC	Kayani et al., 2009
	R AGTTTCCCACCGCGTCACATTGTG	
<i>BMP6</i>	F GGCCCCGTTAACTCGACTGTGACAAA	Kayani et al., 2009
	R TTGAGGACGCCGAACAAAACAGGA	
<i>BMPR1A</i>	F TGGATTGCCCTTACTGGTTCAGCGA	Kayani et al., 2009
	R CCACGCCATTTACCCATCCACA	
<i>BMPR1B</i>	F AAAGTGGCGTGGCGTGGCGAAAAGGTAGCT	Kayani et al., 2009
	R CCCGTCCCTTTGATATCTGCAGCAA	
<i>BMPR2</i>	F CCCACTCTTCGGCACCCCTGG	Kayani et al., 2009
	R CCCCAGCAGTTATTTCCCCCG	
<i>TGFBR1</i>	F ACCACTGCAATAAAATAGAACTTCCA	NM_174621.2
	R TGACAGCTGCCAGTTCAACAG	
<i>GAPDH</i>	F GATTGTCAGCAATGCCTCCT	NM_001034034.
	R GGTCATAAGTCCCTCCACGA	
<i>Ciclofilina</i>	F GGTCATCGGTCTCTTTGGAA	SANTOS et al., 2011
	R TCCTTGATCACACGATGGAA	

F, Forward primer; R, Reverse primer.

### 3.3 Dosagens hormonais

As amostras de fluido folicular provenientes dos folículos pré-ovulatórios foram centrifugadas e armazenadas em tubos criogênicos a -80°C. As dosagens de progesterona e estradiol do fluido folicular foram realizadas através da técnica de eletroquimioluminescência em laboratório comercial.

### 3.4 Análise estatística

O efeito dos tratamentos sobre a dinâmica folicular foi avaliado através de análise de dados repetidos utilizando o *Mixed Procedure* (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Os efeitos do tratamento, do momento e a interação foram determinados.

Diferenças entre os diâmetros foliculares em momentos específicos foram comparadas entre os grupos utilizando o *estimates*. Os resultados de expressão gênica foram comparados por análise de variância (PROC GLM; General Linear Models Procedure) e a comparação entre grupos foi realizada através de *least square means* (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). A análise de regressão e a correlação entre a expressão dos receptores e níveis de progesterona e estradiol no fluido folicular foram realizadas através do *software* JMP. Todas as variáveis contínuas foram testadas para normalidade e normalizadas quando necessário. Em todas as análises, o nível de significância utilizado foi de 5%. Os dados foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

## 4 Resultados

No primeiro estudo foram injetados folículos com diâmetro médio de  $9,1 \pm 0,2$  mm. Após a aplicação dos tratamentos, foi realizado monitoramento ultrassonográfico a cada 24 h. A ovulação foi caracterizada quando se observou o desaparecimento do folículo tratado entre duas avaliações e, posteriormente, a formação do corpo lúteo. Neste estudo, demonstrou-se que a injeção intrafolicular da proteína oocitária GDF9rh em duas concentrações (100 e 1000 ng/mL) não alterou o crescimento folicular final, ovulação (Figura 1) e manifestação de estro.

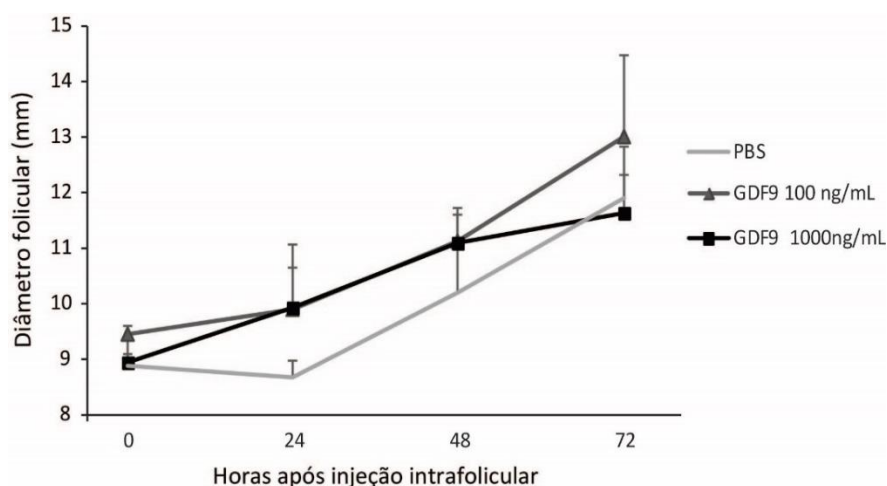


Figura 1: Efeito da injeção intrafolicular de GDF9rh no crescimento folicular bovino. Uma nova onda folicular foi induzida e quando o maior folículo atingiu o diâmetro entre 8,5 e 9,5 mm, foi realizada a injeção intrafolicular de PBS (controle, n=3) ou GDF9rh na concentração final de 100 (n=3) ou 1000 ng/mL (n=4). Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ).

Para investigar uma possível participação de fatores da família TGF- $\beta$  e dos seus receptores no processo ovulatório, a expressão das *BMPs 1, 2, 4 e 6* e dos receptores *BMPR2, TGFBR1, BMPR1B e BMPR1A* foi investigada nas células da granulosa de folículos pré-ovulatórios (>12 mm) antes e após a administração i.m. de GnRH. A expressão das *BMPs 1 e 4* não foi regulada pela aplicação de GnRH (hora 0) (Figura 2-A e C). A expressão de *BMP2* aumentou significativamente às 3 e 6 h pós-GnRH, retornando aos níveis iniciais 12 e 24 h após ( $P < 0,05$ ) (Figura 2B), enquanto que a *BMP6* não foi expressa nas células da granulosa.

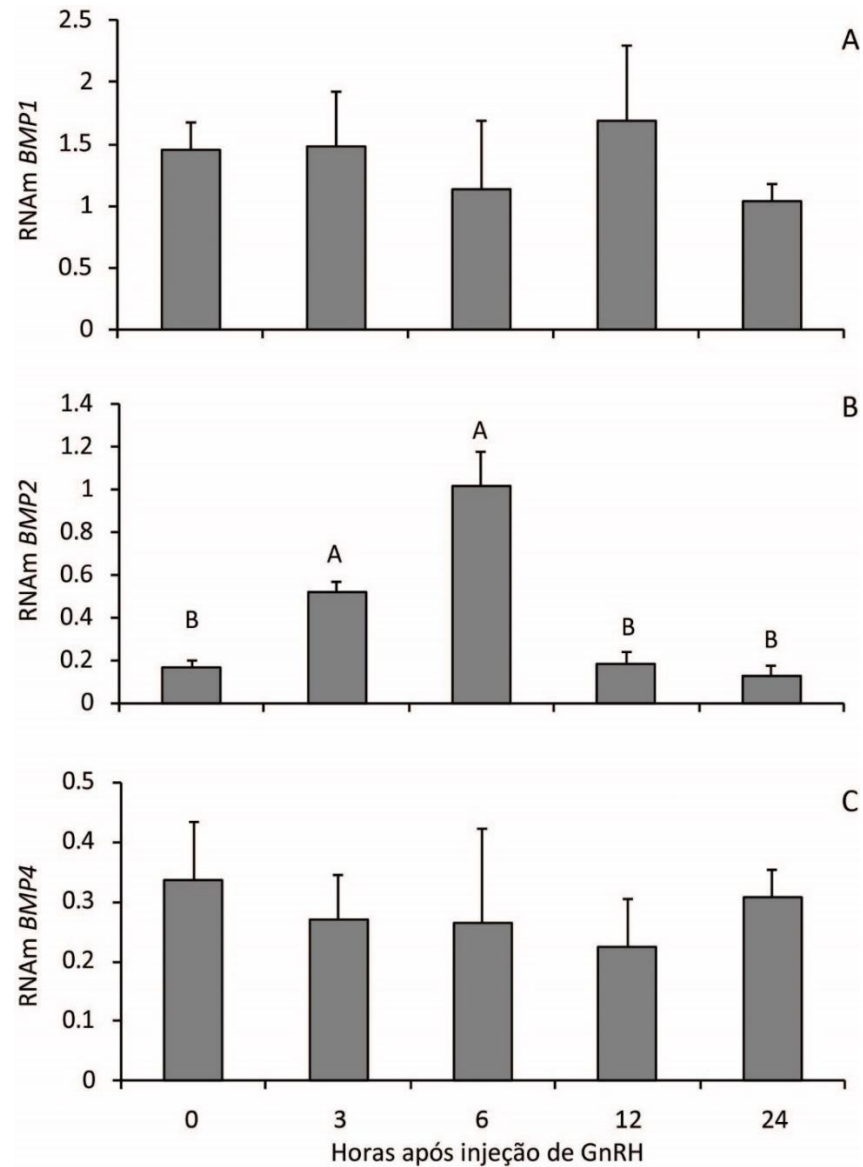


Figura 2: Expressão de RNAm dos genes *BMP1* (A), *BMP2* (B) e *BMP4* (C) em células da granulosa nos momentos 0 (n=4), 3 (n=5), 6 (n=5), 12 (n=5) e 24 (n=4) horas após a administração de GnRH. Letras diferentes indicam significância estatística ( $P < 0,05$ ).

A expressão de RNAm dos receptores *BMP2* e *TGFBR1* nas células da granulosa aumentou significativamente 12 h após tratamento com GnRH (Figura 3A e B, respectivamente). Já os receptores *BMP1B* e *1A* foram mais expressos no momento do tratamento (hora 0), diminuindo 3 e 6 h após, apresentando uma elevação às 12 h, diminuindo novamente nas 24 h (Figura 3C e D, respectivamente).

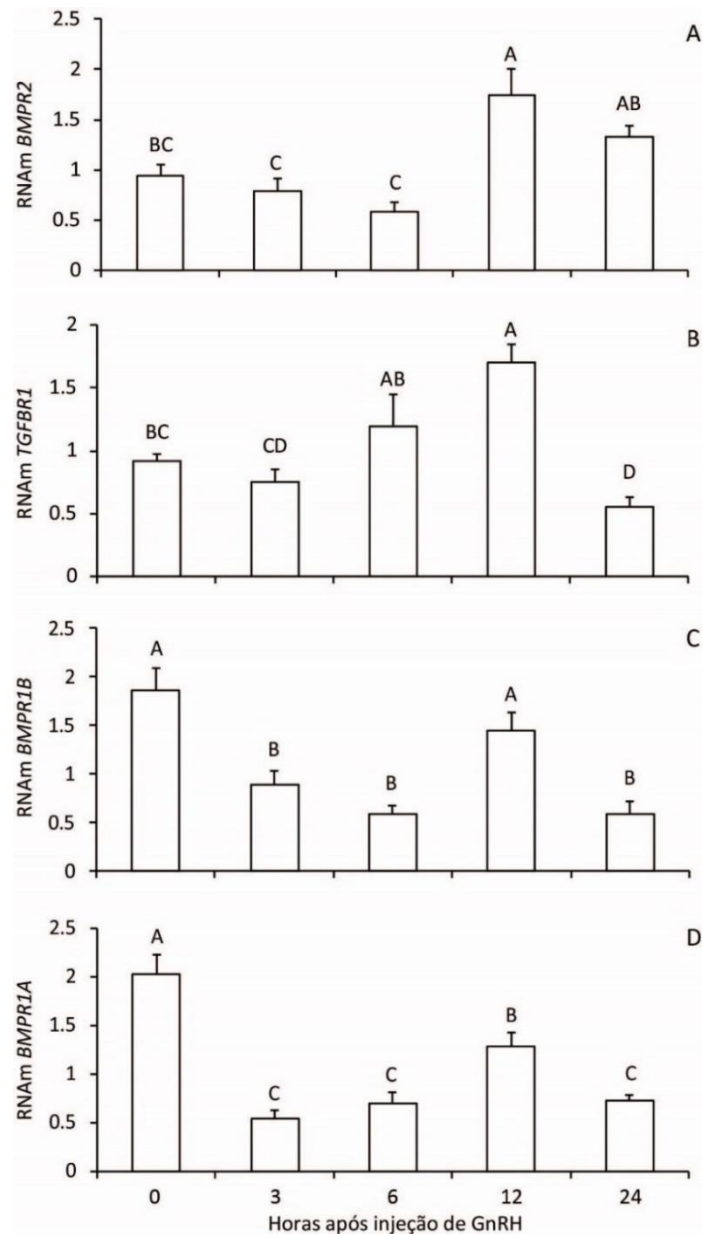


Figura 3: Expressão de RNAm dos genes *BMP2* (A), *TGFBR1* (B), *BMP1B* (C) e *BMP1A* (D) em células da granulosa nos momentos 0 (n=4), 3 (n=5), 6 (n=5), 12 (n=5) e 24 (n=4) horas após a administração de GnRH. Letras diferentes indicam significância estatística ( $P < 0,05$ ).

Os níveis de progesterona no fluido folicular decresceram linearmente ( $P < 0,001$ ) com o aumento da expressão de *BMP-1A* ( $R^2=0,49$ ) e *-1B* ( $R^2=0,5$ ) (Figura 4E e C, respectivamente). O aumento na expressão de *TGFBR1* determinou uma diminuição quadrática ( $P < 0,01$ ) nos níveis de progesterona ( $R^2=0,45$ ; Figura 4A). O aumento na expressão de *BMP2* ( $R^2=0,4$ ;  $P < 0,01$ ; Figura 4B) e *BMP1A* ( $R^2=0,28$ ;  $P < 0,05$ ; Figura 4D) determinou um aumento na concentração de estradiol, apresentando efeito linear e quadrático, respectivamente. Por outro lado, os níveis de

estrógeno decresceram linearmente com o aumento na expressão de *BMPR2* ( $R^2=0,31$ ;  $P<0,01$ ; Figura 4F).

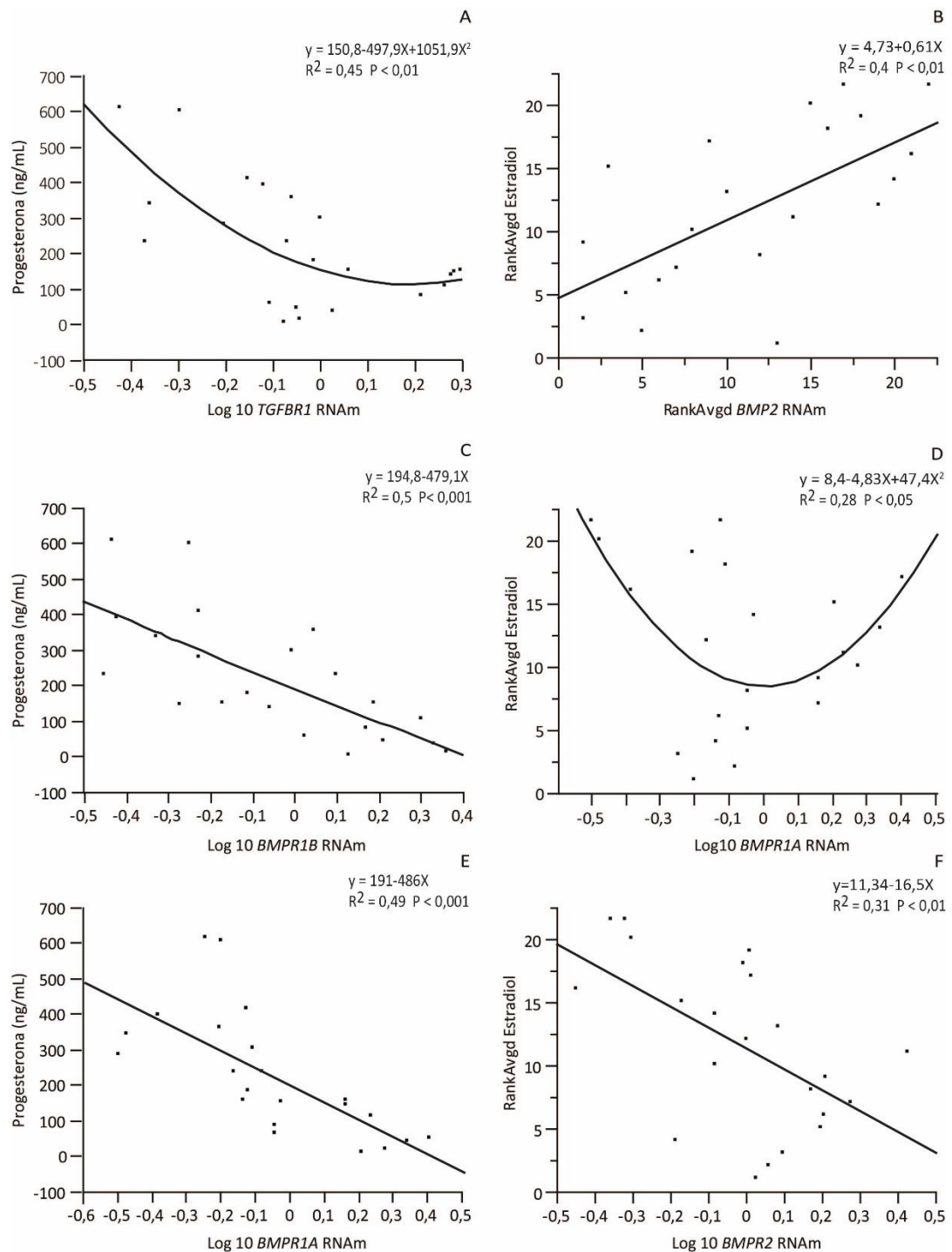


Figura 4: A, C, E: Correlação dos níveis de progesterona no fluido folicular e expressão de RNAm dos genes *TGFBR1* (A), *BMPR1B* (C) e *BMPR1A* (E) nas células da granulosa. B, D, F: Correlação dos níveis de estradiol folicular e expressão de RNAm dos genes *BMP2* (B), *BMPR1A* (D) e *BMPR2* (F).  $R^2$  é o índice de correlação entre as variáveis.

## 5 Discussão

Dados presentes na literatura demonstram funções distintas das proteínas oocitárias nas diferentes espécies e modelos utilizados (MCNATTY et al., 2005; SPICER et al., 2006). No presente experimento, utilizando o modelo proposto por LV et al. (2009), a injeção intrafolicular da proteína oocitária GDF9 nas concentrações finais de 100 ou 1000 ng/mL, em folículos com diâmetro médio de 9 mm, não afetou o crescimento folicular e a ovulação. Baseando-se nos resultados obtidos *in vivo* em bovinos e ovinos descritos por outros grupos de pesquisa (JUENGEL et al., 2004b; JUENGEL et al., 2009), esperava-se que o GDF9 afetasse negativamente o crescimento folicular pela suposta ação inibitória sobre a diferenciação folicular e esteroidogênese (SPICER et al., 2006).

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 GDF9rh continuaram seu crescimento em taxa similar aos folículos do grupo controle (PBS), até atingir completa diferenciação e ovularem normalmente. Não foi observada a inibição do crescimento folicular, nem uma relação dose-dependente, 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.

A diferenciação folicular em bovinos ocorre a partir dos 8,5 mm, quando as células da granulosa passam a expressar receptores de LH, embora maior expressão seja observada em folículos a partir de 9 mm (GASPERIN et al., 2015). Portanto, com base no fato de que nenhum folículo regrediu, sugere-se que o aumento dos níveis de GDF9 no fluido folicular não possui um efeito significativo sobre a esteroidogênese e diferenciação, quando aplicado após a divergência. É possível que a ausência de efeito seja decorrente do momento do tratamento. A injeção de folículos com diâmetro entre 7,5 e 8 mm poderia ser utilizada para investigar se o GDF9 é capaz de inibir a diferenciação de folículos antes da divergência (GASPERIN et al., 2012), uma vez que estudos *in vitro* sugerem que as células de folículos pequenos (3-6 mm) são mais susceptíveis às ações do GDF9 sobre a proliferação e esteroidogênese (SPICER et

al., 2008). Outra possibilidade seria investigar o efeito da injeção de GDF9 em folículos pré-ovulatórios, após desafio com GnRH, uma vez que há evidências de que o GDF9 está envolvido na luteinização (JUENGEL, 2002; GODE et al., 2011).

A utilização de maiores concentrações para aumentar a biodisponibilidade de GDF9 no folículo, ou repetidas injeções intrafoliculares seria pouco viável do ponto de vista prático. Além disso, a espécie de origem da proteína pode influenciar no seu efeito, conforme demonstrado anteriormente (MCNATTY et al., 2005). Entretanto, a proteína GDF9 de origem bovina não é disponível comercialmente. Deste modo, é importante ter cautela em afirmar que o tratamento com GDF9 não afeta o ambiente folicular e a ovulação.

Estudos anteriores sugerem um envolvimento do GDF9 na regulação da esteroidogênese em bovinos (SPICER et al., 2008) e na ovulação e luteinização em ovinos (JUENGEL, 2002). Além disso, recentemente demonstrou-se que algumas BMPs e seus receptores são positivamente regulados durante a regressão do corpo lúteo em humanos, sendo negativamente reguladas pelo hCG, um hormônio luteotrófico (NIO-KOBAYASHI et al., 2015). Com base nestes estudos, testou-se a hipótese de que as BMPs 1, 2, 4 e 6 e os receptores BMPR2, TGFBR1, BMPR1B e BMPR1A estão envolvidos nas drásticas mudanças que ocorrem no interior do folículo durante o processo de luteinização e ovulação em bovinos.

Apesar de ter sido descrita no ovário (CANTY-LAIRD et al., 2010), a função da BMP1 na fisiologia ovariana é desconhecida. Um estudo realizado em ovinos sugere que esta proteína é negativamente regulada durante o crescimento folicular final e apresenta uma atividade de colagenase *in vitro* (CANTY-LAIRD et al., 2010). Uma vez que a BMP1 está envolvida na regulação da matriz extracelular, esperava-se um aumento na sua expressão após o pico de GnRH/LH, especialmente no momento final (24 h), que antecede a ruptura do folículo, o que não foi observado.

Glister et al. (2004) avaliaram a expressão das BMPs 4, 6 e 7 no ovário bovino e demonstraram que as BMPs 4 e 7 suprimem a secreção de progesterona em células da granulosa *in vitro*. Entretanto, no presente estudo a BMP4 não foi regulada durante o período que antecede a ovulação induzida por GnRH. À BMP6 também foi atribuída uma função inibitória na luteinização, uma vez que a mesma inibe a síntese de progesterona *in vitro*, através da diminuição na expressão das enzimas esteroidogênicas *CYP11A1* e *HSD3B1* (KAYANI et al., 2009). É possível que esse efeito da BMP6 seja mais pronunciado ao redor da divergência folicular, uma vez que



neste momento ela é expressa pelas células da granulosa (dados não publicados), enquanto que nos folículos pré-ovulatórios utilizados no presente estudo o gene não foi expresso

A sinalização das *BMPs* 2 e 4 através dos receptores *BMPR1A*, *BMPR1B*, e *BMPR2* está presente nos folículos antrais bovinos e desempenha um papel no desenvolvimento e diferenciação das células foliculares (FATEHI et al., 2005). No presente estudo, a expressão de *BMP2* foi significativamente maior 3 e 6 horas após GnRH, momentos em que os níveis de estradiol ainda estão elevados (SANTOS et al., 2012). A expressão do receptor *BMPR1A* também foi positivamente correlacionada com a concentração de estradiol no fluido folicular, embora os níveis de estrógeno decresceram linearmente com o aumento na expressão de *BMPR2*. Selvaraju et al. (2013) observaram uma elevada expressão de *BMP2* e *BMPR2* na fase de dominância em relação a fases anteriores de desenvolvimento e um aumento em folículos pré ovulatórios. Ainda, os mesmos autores demonstraram que a adição de *BMP2* ao cultivo de granulosa bovina *in vitro* aumenta a síntese de estradiol e diminui a de progesterona (SELVARAJU et al., 2013). Concordando com um suposto efeito inibitório sobre a síntese de progesterona, ambos receptores *BMPR-1A* e *-1B* apresentaram correlação negativa com os níveis deste hormônio no fluido folicular.

Além da participação dos receptores de *BMPs* no desenvolvimento folicular, há evidências de funções durante a regressão do corpo lúteo. Em células luteais humanas, o tratamento com hCG, hormônio luteotrófico, diminuiu a expressão dos receptores *BMPR1A*, *BMPR1B*, *BMPR2* *in vitro*, sugerindo que estes estão envolvidos na regressão do corpo lúteo (NIO-KOBAYASHI et al., 2015). Deste modo, determinou-se também a regulação dos receptores *BMPR2*, *TGFBR1*, *BMPR1B* e *BMPR1A* nas células da granulosa antes e após a administração de GnRH para inferir sobre um possível envolvimento no período periovulatório e de luteinização. O aumento significativo na expressão dos receptores *BMPR2* e *TGFR1* observado nas 12 h após aplicação de GnRH, sugere um envolvimento na regulação da esteroidogênese, pois neste momento observa-se uma drástica diminuição nos níveis de estrógeno (SANTOS et al., 2012), que precede a elevação nos níveis de progesterona (FORTUNE et al., 2009) no fluido folicular. Estudos utilizando cultivo de células da granulosa bovina demonstraram um efeito negativo do GDF9 sobre a síntese de progesterona e estradiol e um efeito positivo sobre a proliferação celular (SPICER et

al., 2006), porém este efeito parece ser mais pronunciado sobre as células de folículos pequenos (3-6mm) (SPICER et al., 2008).

No presente estudo, os receptores *TGFBR1*, *BMPR1B* e *BMPR1A* foram negativamente correlacionados aos níveis de progesterona no fluido folicular. Recentemente, Selvaraju et al. (2013) demonstraram maior expressão de RNAm dos receptores *BMPR2* e *BMPR1A* durante o período de dominância e, principalmente, pré-ovulação em bovinos. Entretanto, no modelo utilizado pelos autores não é possível inferir sobre a regulação dos fatores pelo pico de LH, uma vez que os folículos pré-ovulatórios foram coletados um dia após a aplicação de prostaglandina (administrada sete dias após a manifestação de estro), ou seja, provavelmente antes do pico de LH.

Embora não existam estudos funcionais em bovinos avaliando o envolvimento dos receptores de BMPs na síntese de progesterona, Chang et al. (2013) demonstraram que o efeito supressor da *BMP15* sobre a síntese de progesterona pelas células da granulosa humana é inibido após bloqueio do receptor *BMPR1A*. Do mesmo modo, Zhang et al. (2015) demonstraram que o tratamento de células da granulosa humana com *BMP4* ou *BMP7*, diminui a expressão da enzima *StAR* e a síntese de progesterona, também através do receptor *BMPR1A*. Apesar destes dados evidenciarem a atuação dos receptores de BMPs na inibição da luteinização, experimentos funcionais são necessários para elucidar a real função deste sistema no processo ovulatório em bovinos.

## **6 Considerações Finais**

Nas condições do presente estudo, o aumento dos níveis de GDF9 no fluído folicular não alterou significativamente o crescimento folicular final e a ovulação. Coletivamente, os dados demonstram uma associação positiva entre a expressão de BMP2 e a síntese de estradiol pelas células foliculares. Por outro lado, o padrão de expressão dos receptores de BMPs sugere uma inibição no processo de luteinização.

Ressalta-se, a importância deste estudo e seus resultados na compreensão dos mecanismos e fatores envolvidos nos eventos que controlam a dinâmica ovariana em espécies monovulares. Tal entendimento faz-se fundamental para otimizar as biotécnicas da reprodução, e conseqüentemente, a eficiência reprodutiva dos rebanhos. A elucidação do papel dos fatores locais na fisiologia ovariana pode contribuir com o entendimento de processos patológicos e no desenvolvimento de tecnologias que tenham por finalidade a contracepção ou o aumento da taxa ovulatória.

## Referências

ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; KASTELIC, J. P.; KO, J. C.; GINTHER, O. J. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 94, n. 1, p. 177-188, 1992.

CAIXETA, E. S.; RIPAMONTE, P.; FRANCO, M. M.; JUNIOR, J. B.; DODE, M. A. N. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, n. 5, p. 655-664, 2009.

CANTY-LAIRD, E.; CARRÉ, G.-A.; MANDON-PÉPIN, B.; KADLER, K. E.; FABRE, S. First Evidence of Bone Morphogenetic Protein 1 Expression and Activity in Sheep Ovarian Follicles. **Biology of Reproduction**, v. 83, n. 1, p. 138-146, 2010.

CHANG, H.-M.; CHENG, J.-C.; KLAUSEN, C.; LEUNG, P. C. K. BMP15 Suppresses Progesterone Production by Down-Regulating StAR via ALK3 in Human Granulosa Cells. **Molecular Endocrinology**, v. 27, n. 12, p. 2093-2104, 2013.

CHOUDHURY, A.; KHOLE, V. V. Immune-mediated destruction of ovarian follicles associated with the presence of HSP90 antibodies. **Molecular Reproduction and Development**, v. 82, n. 2, p. 81-89, 2015.

DIXIT, H.; RAO, L.; PADMALATHA, V.; KANAKAVALLI, M.; DEENADAYAL, M.; GUPTA, N.; CHAKRABARTY, B.; SINGH, L. Missense mutations in the *BMP15* gene are associated with ovarian failure. **Human Genetics**, v. 119, n. 4, p. 408-415, 2006.

DUFFY, D. M. Growth Differentiation Factor-9 Is Expressed by the Primate Follicle Throughout the Perioovulatory Interval. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 2, p. 725-732, 2003.

EDSON, M. A.; NALAM, R. L.; CLEMENTI, C.; FRANCO, H. L.; DEMAYO, F. J.; LYONS, K. M.; PANGAS, S. A.; MATZUK, M. M. Granulosa Cell-Expressed BMPR1A and BMPR1B Have Unique Functions in Regulating Fertility but Act Redundantly to Suppress Ovarian Tumor Development. **Mol Endocrinol**, v. 24, n. 6, p. 1251-1266, 2010.

EPPIG, J. J.; CHESNEL, F.; HIRAO, Y.; O'BRIEN, M. J.; PENDOLA, F. L.; WATANABE, S.; WIGGLESWORTH, K. Oocyte control of granulosa cell development: How and why. **Journal of the British Fertility Society**, v. 2, n. 2, p. 127-132, 1997.

ERICKSON, G.; SHIMASAKI, S. The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, n. 1, p. 9, 2003.

EVANS, A. C. O.; FORTUNE, J. E. Selection of the Dominant Follicle in Cattle Occurs in the Absence of Differences in the Expression of Messenger Ribonucleic Acid for Gonadotropin Receptors. **Endocrinology**, v. 138, n. 7, p. 2963-2971, 1997.

FATEHI, A. N.; VAN DEN HURK, R.; COLENBRANDER, B.; DAEMEN, A. J. J. M.; VAN TOL, H. T. A.; MONTEIRO, R. M.; ROELEN, B. A. J.; BEVERS, M. M. Expression of bone morphogenetic protein2 (BMP2), BMP4 and BMP receptors in the bovine ovary but absence of effects of BMP2 and BMP4 during IVM on bovine oocyte nuclear maturation and subsequent embryo development. **Theriogenology**, v. 63, n. 3, p. 872-889, 2005.

FERREIRA, R.; OLIVEIRA, J. F.; FERNANDES, R.; MORAES, J. F.; GONCALVES, P. B. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. **Reproduction**, v. 134, n. 5, p. 713-719, 2007.

FORTUNE, J. E.; WILLIS, E. L.; BRIDGES, P. J.; YANG, C. S. The periovulatory period in cattle: progesterone, prostaglandins, oxytocin and ADAMTS proteases. **Animal Reproduction**, v. 6, n. 1, p. 60-71, 2009.

GALLOWAY, S. M.; MCNATTY, K. P.; CAMBRIDGE, L. M.; LAITINEN, M. P.; JUENGEL, J. L.; JOKIRANTA, T. S.; MCLAREN, R. J.; LUIRO, K.; DODDS, K. G.; MONTGOMERY, G. W.; BEATTIE, A. E.; DAVIS, G. H.; RITVOS, O. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. **Nature Genetics**, v. 25, n. 3, p. 279-83, 2000.

GASPERIN, B.; FERREIRA, R.; ROVANI, M. T.; SANTOS, J. T.; BURATINI JR., J.; PRICE, C.; GONÇALVES, P. B. FGF10 inhibits dominant follicle growth and estradiol secretion in vivo in cattle. **Reproduction**, 2012.

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.

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 bovine follicular deviation. **Theriogenology**, v. 83, n. 3, p. 353-359, 2015.

GILCHRIST, R. B.; LANE, M.; THOMPSON, J. G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. **Human Reproduction Update**, v. 14, n. 2, p. 159-177, 2008.

GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 6, p. 1187-1194, 1996.

GLISTER, C.; KEMP, C. F.; KNIGHT, P. G. Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. **Reproduction**, v. 127, n. 2, p. 239-254, 2004.

GLISTER, C.; RICHARDS, S. L.; KNIGHT, P. G. Bone Morphogenetic Proteins (BMP) -4, -6, and -7 Potently Suppress Basal and Luteinizing Hormone-Induced Androgen Production by Bovine Theca Interna Cells in Primary Culture: Could Ovarian Hyperandrogenic Dysfunction Be Caused by a Defect in Thecal BMP Signaling? **Endocrinology**, v. 146, n. 4, p. 1883-1892, 2005.

GLISTER, C.; SATCHELL, L.; KNIGHT, P. G. Changes in expression of bone morphogenetic proteins, their receptors and inhibin co-receptor betaglycan during bovine antral follicle development: inhibin can antagonise the suppressive effect of BMPs on thecal androgen production. **Reproduction**, p. REP-10-0216, 2010.

GODE, F.; GULEKLI, B.; DOGAN, E.; KORHAN, P.; DOGAN, S.; BIGE, O.; CIMRIN, D.; ATABEY, N. Influence of follicular fluid GDF9 and BMP15 on embryo quality. **Fertility and sterility**, v. 95, n. 7, p. 2274-2278, 2011.

HANRAHAN, J. P.; GREGAN, S. M.; MULSANT, P.; MULLEN, M.; DAVIS, G. H.; POWELL, R.; GALLOWAY, S. M. 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*). **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 4, p. 900-909, 2004.

JAYAWARDANA, B. C.; SHIMIZU, T.; NISHIMOTO, H.; KANEKO, E.; TETSUKA, M.; MIYAMOTO, A. Hormonal regulation of expression of growth differentiation factor-9 receptor type I and II genes in the bovine ovarian follicle. **Reproduction**, v. 131, n. 3, p. 545-553, 2006.

JUENGEL, J. L. Growth Differentiation Factor 9 and Bone Morphogenetic Protein 15 Are Essential for Ovarian Follicular Development in Sheep. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 6, p. 1777-1789, 2002.

JUENGEL, J. L.; BODENSTEINER, K. J.; HEATH, D. A.; HUDSON, N. L.; MOELLER, C. L.; SMITH, P.; GALLOWAY, S. M.; DAVIS, G. H.; SAWYER, H. R.; MCNATTY, K. P. Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 447-460, 2004a.

JUENGEL, J. L.; HUDSON, N. L.; BERG, M.; HAMEL, K.; SMITH, P.; LAWRENCE, S. B.; WHITING, L.; MCNATTY, K. P. Effects of active immunization against growth differentiation factor 9 and/or bone morphogenetic protein 15 on ovarian function in cattle. **Reproduction**, v. 138, n. 1, p. 107-114, 2009.

JUENGEL, J. L.; HUDSON, N. L.; WHITING, L.; MCNATTY, K. P. Effects of Immunization Against Bone Morphogenetic Protein 15 and Growth Differentiation Factor 9 on Ovulation Rate, Fertilization, and Pregnancy in Ewes. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 3, p. 557-561, 2004b.

KAYANI, A. R.; GLISTER, C.; KNIGHT, P. G. Evidence for an inhibitory role of bone morphogenetic protein(s) in the follicular-luteal transition in cattle. **Reproduction**, v. 137, n. 1, p. 67-78, 2009.

KNIGHT, P. G.; GLISTER, C. TGF- $\beta$  superfamily members and ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 132, n. 2, p. 191-206, 2006.

KRISTENSEN, S. G.; ANDERSEN, K.; CLEMENT, C. A.; FRANKS, S.; HARDY, K.; ANDERSEN, C. Y. Expression of TGF-beta superfamily growth factors, their receptors, the associated SMADs and antagonists in five isolated size-matched populations of pre-antral follicles from normal human ovaries. **Molecular Human Reproduction**, v. 20, n. 4, p. 293-308, 2014.

LV, L.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; SEN, A.; BETTEGOWDA, A.; MONDAL, M.; FOLGER, J. K.; LEE, K.-B.; IRELAND, J. J.; SMITH, G. W. Evidence Supporting a Role for Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript (CARTPT) in Control of Granulosa Cell Estradiol Production Associated with Dominant Follicle Selection in Cattle. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 3, p. 580-586, 2009.

MAZERBOURG, S.; KLEIN, C.; ROH, J.; KAIVO-OJA, N.; MOTTERSHEAD, D. G.; KORCHYNSKYI, O.; RITVOS, O.; HSUEH, A. J. W. Growth Differentiation Factor-9 Signaling Is Mediated by the Type I Receptor, Activin Receptor-Like Kinase 5. **Molecular Endocrinology**, v. 18, n. 3, p. 653-665, 2004.

MCNATTY, K. P.; HEATH, D. A.; HUDSON, N. L.; LUN, S.; JUENGEL, J. L.; MOORE, L. G. Gonadotrophin-responsiveness of granulosa cells from bone morphogenetic protein 15 heterozygous mutant sheep. **Reproduction**, v. 138, n. 3, p. 545-551, 2009.

MCNATTY, K. P.; HUDSON, N. L.; WHITING, L.; READER, K. L.; LUN, S.; WESTERN, A.; HEATH, D. A.; SMITH, P.; MOORE, L. G.; JUENGEL, J. L. The Effects of Immunizing Sheep with Different BMP15 or GDF9 Peptide Sequences on Ovarian Follicular Activity and Ovulation Rate. **Biology of Reproduction**, v. 76, n. 4, p. 552-560, 2007.

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. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function. **Reproduction**, v. 129, n. 4, p. 473-480, 2005.

MONGET, P.; FABRE, S.; MULSANT, P.; LECERF, F.; ELSSEN, J.-M.; MAZERBOURG, S.; PISSELET, C.; MONNIAUX, D. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, n. 1-2, p. 139-154, 2002.



MOORE, R. K.; ERICKSON, G. F.; SHIMASAKI, S. Are BMP-15 and GDF-9 primary determinants of ovulation quota in mammals? **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 15, n. 8, p. 356-361, 2004.

MOTTERSHEAD, D. G.; RITTER, L. J.; GILCHRIST, R. B. Signalling pathways mediating specific synergistic interactions between GDF9 and BMP15. **Molecular Human Reproduction**, 2011.

MULSANT, P.; LECERF, F.; FABRE, S.; SCHIBLER, L.; MONGET, P.; LANNELUC, I.; PISSELET, C.; RIQUET, J.; MONNIAUX, D.; CALLEBAUT, I.; CRIBIU, E.; THIMONIER, J.; TEYSSIER, J.; BODIN, L.; COGNIÉ, Y.; CHITOUR, N.; ELSEN, J.-M. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Mérino ewes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 9, p. 5104-5109, 2001.

NIO-KOBAYASHI, J.; TRENDLELL, J.; GIAKOUMELOU, S.; BOSWELL, L.; NICOL, L.; KUDO, M.; SAKURAGI, N.; IWANAGA, T.; DUNCAN, W. C. Bone Morphogenetic Proteins Are Mediators of Luteolysis in the Human Corpus Luteum. **Endocrinology**, v. 156, n. 4, p. 1494-1503, 2015.

OTSUKA, F.; MOORE, R. K.; SHIMASAKI, S. Biological Function and Cellular Mechanism of Bone Morphogenetic Protein-6 in the Ovary. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 35, p. 32889-32895, 2001a.

OTSUKA, F.; YAMAMOTO, S.; ERICKSON, G. F.; SHIMASAKI, S. Bone Morphogenetic Protein-15 Inhibits Follicle-stimulating Hormone (FSH) Action by Suppressing FSH Receptor Expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 14, p. 11387-11392, 2001b.

PARADIS, F.; NOVAK, S.; MURDOCH, G. K.; DYCK, M. K.; DIXON, W. T.; FOXCROFT, G. R. Temporal regulation of BMP2, BMP6, BMP15, GDF9, BMPR1A, BMPR1B, BMPR2 and TGFBR1 mRNA expression in the oocyte, granulosa and theca cells of developing preovulatory follicles in the pig. **Reproduction**, v. 138, n. 1, p. 115-129, 2009.

SANTOS, J. T. D.; FERREIRA, R.; GASPERIN, B. G.; SIQUEIRA, L. C.; DE OLIVEIRA, J. F.; SANTOS, R. A.; REIS, A. M.; GONÇALVES, P. B. 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**, v. 13, n. 1, p. 91-98, 2012.

SELVARAJU, S.; FOLGER, J. K.; GUPTA, P. S. P.; IRELAND, J. J.; SMITH, G. W. Stage-specific expression and effect of bone morphogenetic protein 2 on bovine granulosa cell estradiol production: regulation by cocaine and amphetamine regulated transcript. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 44, n. 3, p. 115-120, 2013.

SOUZA, C.; MACDOUGALL, C.; CAMPBELL, B.; MCNEILLY, A.; BAIRD, D. The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPR1B) gene. **Journal of Endocrinology**, v. 169, n. 2, p. R1-6, 2001.

SPICER, L. J.; AAD, P. Y.; ALLEN, D.; MAZERBOURG, S.; HSUEH, A. J. Growth differentiation factor-9 has divergent effects on proliferation and steroidogenesis of bovine granulosa cells. **J Endocrinol**, v. 189, n. 2, p. 329-39, 2006.

SPICER, L. J.; AAD, P. Y.; ALLEN, D. T.; MAZERBOURG, S.; PAYNE, A. H.; HSUEH, A. J. Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) Stimulates Proliferation and Inhibits Steroidogenesis by Bovine Theca Cells: Influence of Follicle Size on Responses to GDF9. **Biology of Reproduction**, v. 78, n. 2, p. 243-253, 2008.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717-1751, 2005.

VITT, U. A.; HAYASHI, M.; KLEIN, C.; HSUEH, A. J. W. Growth Differentiation Factor-9 Stimulates Proliferation but Suppresses the Follicle-Stimulating Hormone-Induced Differentiation of Cultured Granulosa Cells from Small Antral and Preovulatory Rat Follicles. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 2, p. 370-377, 2000.

WANG, T.-T.; KE, Z.-H.; SONG, Y.; CHEN, L.-T.; CHEN, X.-J.; FENG, C.; ZHANG, D.; ZHANG, R.-J.; WU, Y.-T.; ZHANG, Y.; SHENG, J.-Z.; HUANG, H.-F. Identification of a mutation in GDF9 as a novel cause of diminished ovarian reserve in young women. **Human Reproduction**, v. 28, n. 9, p. 2473-2481, 2013.

WEI, L.-N.; HUANG, R.; LI, L.-L.; FANG, C.; LI, Y.; LIANG, X.-Y. Reduced and delayed expression of GDF9 and BMP15 in ovarian tissues from women with polycystic ovary syndrome. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 31, n. 11, p. 1483-1490, 2014.

YAMASHITA, H.; MURAYAMA, C.; TAKASUGI, R.; MIYAMOTO, A.; SHIMIZU, T. BMP-4 suppresses progesterone production by inhibiting histone H3 acetylation of StAR in bovine granulosa cells in vitro. **Molecular and Cellular Biochemistry**, p. 1-8, 2010.

ZHANG, H.; KLAUSEN, C.; ZHU, H.; CHANG, H.-M.; LEUNG, P. C. K. BMP4 and BMP7 suppress StAR and progesterone production via ALK3 and SMAD1/5/8-SMAD4 in human granulosa-lutein cells. **Endocrinology**, v. 0, n. 0, p. en.2015-1494, 2015.

## **Anexos**



Pelotas, 29 de maio de 2013

**De:** Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

*Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA)*

**Para:** Professor Bernardo Garziera Gasperin

*Faculdade de Veterinária*

Senhor Professor:

A *CEEAA* analisou o projeto intitulado: “**Função dos fatores oocitários no ambiente folicular e ovulação em espécie monovular**”, processo nº23110.003551/2013-35, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à *CEEAA*.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa e Iniciação Científica para posterior registro no *COCEPE* (código para cadastro nº **CEEAA 3531**).

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

**Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva**

*Presidente da CEEAA*

Ciente em: 29 / 05 / 2013

Assinatura do Professor Responsável: