

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



Tese

**Participação das proteínas morfogenéticas ósseas no crescimento folicular  
final, ovulação e função luteal.**

**Cristina Sangoi Haas**

Pelotas, 2018

**Cristina Sangoi Haas**

**Participação das proteínas morfogenéticas ósseas no crescimento folicular final, ovulação e função luteal.**

Tese 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 Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Garziera Gasperin

Coorientador: Prof. Dr. Arnaldo Diniz Vieira

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

H111p Haas, Cristina Sangoi

Participação das proteínas morfogenéticas ósseas no crescimento folicular final, ovulação e função luteal / Cristina Sangoi Haas ; Bernardo Garziera Gasperin, orientador ; Arnaldo Diniz Vieira, coorientador. — Pelotas, 2018.

112 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Bmp15. 2. Proteína morfogenética óssea. 3. Fatores locais. 4. Cistos. 5. Foliculogênese. I. Gasperin, Bernardo Garziera, orient. II. Vieira, Arnaldo Diniz, coorient. III. Título.

CDD : 636.0898

Cristina Sangoi Haas

**Participação das proteínas morfogenéticas ósseas no crescimento folicular final, ovulação e função luteal.**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 31/08/2018

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

Prof. Dr. Cássio Cassal Brauner  
Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal de Pelotas

Dra. Eliza Rossi Komninou  
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

## **Agradecimentos**

Agradeço à Deus por estar sempre presente, pelo amparo ao longo desta jornada e por todas as bênçãos alcançadas. À minha família, em especial, aos meus pais Linda e Ivan, e meu irmão Roberto pelo amor, paciência, apoio e incentivo, nunca medindo esforços para a realização dos meus sonhos.

A todos os meus amigos, pelos momentos de alegria, parceria e apoio durante este período. Obrigada pela amizade e paciência ao longo dessa jornada.

Ao meu orientador Prof. Bernardo e coorientador Prof. Arnaldo pelos ensinamentos, confiança, paciência e amizade. Agradeço a vocês por não medirem esforços para me ajudar, explicar e solucionar questionamentos, além de inspirarem a todos pela motivação e dedicação. Obrigada por todas as oportunidades que vocês me deram e pela contribuição no meu crescimento pessoal e profissional.

À toda equipe do ReproPEL, incluindo os que já fizeram parte desse grupo, pelo companheirismo e paciência no convívio diário. Agradeço em especial aos colegas e profs. Arnaldo e Rafael, que sempre me auxiliaram nas atividades, pela disponibilidade e parceria nesses anos. Também, um especial agradecimento à “turma do café” e dos churrascos, por todos os momentos de alegria que passamos juntos e pelas conversas e reflexões.

Aos membros do BioRep/UFSM pelo auxílio, por disponibilizarem reagentes e infraestrutura para os experimentos. Em especial à Juliana e à Monique pelos conhecimentos transmitidos, parceria e paciência durante minhas idas à UFSM.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos, ao Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) (Código de Financiamento 001) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (Edital PRONEX) pelo suporte financiamento dos estudos.

Enfim, muito obrigada a todos que contribuíram para alcançar este objetivo, auxiliando no meu aprendizado e crescimento, tanto profissional como pessoal.

## Resumo

HAAS, Cristina Sangoi. **Participação das proteínas morfogenéticas ósseas no crescimento folicular final, ovulação e função luteal.** 2018. 112f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Fatores produzidos no ovário, como os membros da família dos fatores de crescimento transformantes beta (TGF $\beta$ ) e seus receptores, exercem papel essencial durante a divergência folicular e ovulação. Interações entre ligantes e seus receptores estão envolvidas em distintas funções ovarianas sob condições fisiológicas ou patológicas. Em especial os fatores produzidos pelos oócitos como a proteína morfogenética óssea 15 (BMP15) e o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF9), desempenham papéis importantes na regulação das funções ovarianas como crescimento e diferenciação folicular. Entretanto, grande parte do conhecimento sobre esses fatores tem sido obtido em modelos *in vitro* ou através da observação de mutações espontâneas em ovelhas e, apesar da grande relevância, a função destes na fisiologia ovariana ainda é pouco conhecida. Além disso, o papel do sistema TGF $\beta$  na modulação do processo de regressão do corpo lúteo ainda não foi investigado nas espécies domésticas. Neste contexto, esta tese apresenta uma série de estudos acerca da participação de membros da família TGF $\beta$ , em especial das BMPs, na regulação de eventos ovarianos envolvendo o crescimento folicular final, ovulação, formação do corpo lúteo e luteólise. O primeiro estudo trata-se de uma revisão que teve por objetivo reunir a informação disponível na literatura sobre o tema. Posteriormente, um segundo estudo objetivou investigar o nível de transcritos de membros da família TGF $\beta$  e seus receptores durante a luteólise induzida *in vivo*. Foram utilizadas amostras de corpos lúteos bovinos coletados *in vivo* nos momentos 0, 2, 12, 24 e 48 h após a administração de uma dose de PGF $2\alpha$  no dia 10 do ciclo estral. Os níveis de RNAm de *BMP4*, *BMP6* e *INHBA* foram regulados positivamente às 2 h após a administração de PGF $2\alpha$  ( $P < 0,05$ ) em comparação com 0 h. A expressão relativa de RNAm de *BMP2*, *BMP4*, *ACVR1B*, *INHBA* e *INHBB* foi regulada positivamente 12 h após a aplicação de PGF $2\alpha$  ( $P < 0,05$ ), enquanto que o *TGFBR3* teve uma regulação negativa às 48 h. Coletivamente os dados demonstram que os RNAm de membros da família TGF $\beta$  são regulados pelo tratamento com PGF $2\alpha$ , sugerindo um envolvimento no processo de luteólise funcional e morfológica em bovinos. Em um terceiro estudo, objetivou-se determinar o efeito da injeção intrafolicular da BMP15 sobre o crescimento folicular final e ovulação/luteinização. Ainda, avaliou-se o efeito do tratamento com gonadotrofinas em células da granulosa cultivadas *in vitro*, sobre o nível de transcritos dos receptores da BMP15. Foi realizada a injeções intrafoliculares de BMP15rh nas concentrações de 100 ng/mL, em folículos dominantes, e de 500 ng/mL, em folículos pré-ovulatórios. Os resultados da injeção intrafolicular de BMP15rh demonstram uma tendência ( $P = 0,09$ ) de inibição do crescimento folicular. Já os resultados em folículos pré-ovulatórios suportam a hipótese de um efeito inibitório sobre o crescimento

folicular e ovulação, sem inibir a luteinização. Folículos tratados com BMP15 não ovularam e deram origem a estruturas císticas luteinizadas, o que foi confirmado através de dosagens de progesterona sérica. No cultivo das células da granulosa *in vitro*, a expressão de RNAm de *BMPR2* e *BMPR1B* não foi alterada pelo tratamento com LH ou FSH. Conclui-se que o tratamento com BMP15 inibe o desenvolvimento folicular e a ovulação, induzindo à luteinização e formação de cistos em bovinos. Estudos moleculares futuros são necessários para elucidar os mecanismos de ação da BMP15. Um quarto estudo foi conduzido com o objetivo de validar um método de coleta *in vivo* de células da granulosa bovinas, para estudos de expressão gênica. Foram testados seis protocolos distintos de separação das células após a coleta, buscando a forma mais adequada para a extração do RNA, sem interferência de outras células eventualmente presentes nas amostras. A partir dos resultados sugere-se que o tratamento dos *pellets* celulares obtidos após aspiração folicular com tampão de lise de eritrócitos possibilita uma melhor qualidade de RNA. Com um protocolo adequado de processamento das células, pode-se dar continuidade à investigação dos efeitos dos fatores foliculares nas células da granulosa *in vivo*. Coletivamente, os estudos acima descritos, além de gerar conhecimento básico para compreensão do papel dos fatores locais na fisiologia ovariana, podem contribuir no entendimento de processos patológicos e no desenvolvimento de tecnologias que tenham por finalidade a contracepção ou aumento da taxa ovulatória.

**Palavras-chave:** BMP15; proteína morfogenética óssea; fatores locais; cistos; foliculogênese; ovulação; luteólise

## Abstract

HAAS, Cristina Sangoi. **Involvement of bone morphogenetic proteins in final follicular growth, ovulation and luteal function.** 2018. 112f. Thesis (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Factors produced in the ovary, such as transforming growth factors beta members (TGF $\beta$ ) and their receptors, play a key role during follicular deviation and ovulation. The interactions between ligands and receptors are involved in different ovarian functions under physiological or pathological conditions. In particular, factors produced by oocytes such as bone morphogenetic protein 15 (BMP15) and growth and differentiation factor 9 (GDF9) are involved in the regulation of ovarian functions such as follicular development and differentiation. However, most of the knowledge about these factors has been obtained using *in vitro* models or through spontaneous mutations in ewes and, despite the great relevance, little is known about the function of the oocyte factors in the ovarian physiology. In addition, the regulation and function of the TGF $\beta$  system in the regression process of the corpus luteum has not been evaluated in domestic species. In this regard, this thesis presents a series of studies about the involvement of TGF $\beta$  family members, specially BMPs, in the regulation of ovarian function including final follicular growth, ovulation, corpus luteum formation and luteolysis. The first study aimed to review the information available in the literature on the regulation and function of TGF $\beta$  family members in ovarian function. The objective of the second study was to investigate mRNA regulation of some TGF $\beta$  family ligands and their receptors during induced-luteolysis *in vivo*. Cows received an injection of prostaglandin F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) on day 10 of the estrous cycle and luteal samples were obtained at 0, 2, 12, 24 or 48 h after treatment. The mRNA levels of *BMP4*, *BMP6* and *INHBA* were upregulated at 2 h after administration of PGF2 $\alpha$  ( $P < 0.05$ ) in comparison to 0 h. The relative mRNA expression of *BMP2*, *BMP4*, *ACVR1B*, *INHBA* and *INHBB* was upregulated at 12 h post PGF2 $\alpha$  ( $P < 0.05$ ), whereas *TGFBR3* was downregulated at 48 h. Collectively, the findings demonstrate that mRNA encoding several TGF $\beta$  family members are regulated after PGF2 $\alpha$  administration in a time-specific manner, which suggests that this system is involved in both functional and morphological luteolysis in cattle. The objective of the third study was to evaluate the effect of BMP15 intrafollicular treatment on final follicular growth, ovulation and luteinization in cattle. Furthermore, it was evaluated the effect of gonadotrophins treatment in granulosa cells *in vitro* on the levels of transcripts encoding BMP15 receptors. Intrafollicular injections of rhBMP15 were performed at concentrations of 100 ng/mL, in dominant follicles, and 500 ng/mL, in preovulatory follicles. The intrafollicular injection of rhBMP15 tended ( $P = 0.09$ ) to inhibit follicular growth, whereas the treatment of preovulatory follicles support the hypothesis of an inhibitory effect on follicular growth and ovulation, without inhibiting luteinization. Follicles treated with BMP15 did not ovulate and became luteinized cysts, which was confirmed by serum progesterone levels. The mRNA



expression of *BMPR2* and *BMPR1B* in granulosa cells *in vitro* was not altered by the treatment with LH or FSH. In conclusion, the treatment with BMP15 inhibits follicular development and ovulation, inducing luteinization and cysts formation in cattle. Future molecular studies are needed to elucidate the mechanism of action of BMP15. The fourth study was conducted to validate a technique for *in vivo* granulosa cells collection for gene expression studies. Six different protocols for granulosa cells isolation after follicular aspiration were evaluated aiming to identify the more appropriate procedure to extract RNA without the interference of other cells potentially present in the samples. The results suggest that the treatment of granulosa cells pellets with red blood cell lysis buffer, just after follicular aspiration, allows obtaining samples with higher RNA quality. With a well-validated protocol for cells isolation, it will be possible to continue the investigation of the function of follicular factors on granulosa cells *in vivo*. Taken together, the above-described studies besides generating basic knowledge to understand the role of local factors in ovarian physiology, may contribute to the understanding of pathological processes and to the development of technologies to promote contraception or to increase ovulation rate.

**Keywords:** BMP15; bone morphogenetic protein; local factors; cysts; folliculogenesis; ovulation; luteolysis

## Lista de Figuras

### **Artigo 2 Transforming growth factor beta-family members regulation during induced luteolysis in cattle**

**Figure 1** EGR1 protein levels (A) and relative *HSD3B1* mRNA (B) abundance in bovine corpora lutea collected *in vivo* at 0 (n=5), 2 (n=4), 12 (n=4), 24 (n=4) or 48 (n=4) h after PGF administration. Panel C shows histological examination of the CL at 0 and 12 h after PGF treatment confirming CL regression. Different letters indicate significant differences among time-points (P<0.05)..... 59

**Figure 2** Relative mRNA expression of *BMP1* (A), *BMP2* (B), *BMP3* (C), *BMP4* (D), *BMP6* (E) in bovine corpora lutea collected *in vivo* at 0 (n=5), 2 (n=4), 12 (n=4), 24 (n=4) or 48 (n=4) h after PGF administration. Different letters indicate significant differences among time-points (P<0.05) ..... 60

**Figure 3** Relative mRNA expression of *BMPR1A* (A) e *BMPR1B* (B), *TGFBR3* (C), *INHA* (D), *INHBA* (E), *INHBB* (F), *ACVR2A* (G), *ACVR1B* (H) e *ACVR2B* (I) in bovine corpora lutea collected *in vivo* at 0 (n=5), 2 (n=4), 12 (n=4), 24 (n=4) or 48 (n=4) h after PGF administration. Different letters indicate significant differences among time-points (P<0.05)..... 61

### **Artigo 3 Função da proteína morfogenética óssea 15 no crescimento folicular final e ovulação em bovinos**

<b>Figura 1</b>	Concentração de estradiol sérico (pg/mL) das fêmeas bovinas sincronizadas que receberam a injeção intrafolicular de PBS (controle, n=4) ou BMP15rh na concentração final de 500 ng/mL (n=6). Os animais de ambos os grupos receberam uma injeção de 21µg de GnRH pela via subcutânea imediatamente após o tratamento intrafolicular.....	85
<b>Figura 2</b>	Concentração de progesterona sérica (ng/mL) das fêmeas bovinas sincronizadas que receberam a injeção intrafolicular de PBS (controle, n=4) ou BMP15rh na concentração final de 500 ng/mL (n=6), após o tratamento com a injeção intrafolicular (0) e nos dias subsequentes 3, 4, 5 e 12. Os animais de ambos os grupos receberam uma injeção de 21µg de GnRH pela via subcutânea imediatamente após o tratamento intrafolicular.....	86
<b>Figura 3</b>	(A) Imagem ultrassonográfica de corpo lúteo com 22,3 mm de uma fêmea do grupo controle 12 dias após a injeção intrafolicular de PBS. (B) Imagem ultrassonográfica de uma estrutura cística luteinizada com 31,6 mm de uma fêmea do grupo BMP15, 12 dias após a injeção intrafolicular com BMP15rh na concentração de 500 ng/mL.....	87
<b>Figura 4</b>	Efeito da injeção intrafolicular de BMP15rh no crescimento folicular. Uma nova onda folicular foi induzida e quando o maior folículo atingiu o diâmetro entre 8,5 e 9,5mm, foi realizada a injeção intrafolicular de PBS (n=3) ou BMP15rh na concentração final de 100 ng/mL (n=5).....	88
<b>Figura 5</b>	Expressão de RNAm dos genes <i>BMPR2</i> (A) e <i>BMPR1B</i> (B) em células da granulosa cultivadas <i>in vitro</i> em meio padrão (controle) e em meio suplementado com FSH. Expresão de RNAm dos genes <i>BMPR2</i> (C) e <i>BMPR1B</i> (D) em células da granulosa cultivadas <i>in vitro</i> em meio padrão (controle) e em meio suplementado com LH.....	89
<b>Artigo 4</b>	<b>Diferentes métodos para conservação de amostras de células da granulosa obtidas por aspiração folicular</b>	

<b>Figura 1</b>	(A) Concentração de RNA (ng/uL) e (B) pureza do RNA em amostras de células foliculares aspiradas de folículos dominantes, tratadas com diferentes tampões e submetidas à extração de RNA com Trizol.....	97
<b>Figura 2</b>	Média dos ciclos de amplificação dos genes de controle interno <i>18S rRNA</i> (A), <i>PPIB</i> (B), <i>GAPDH</i> (C) e <i>RPL19</i> (D) no cDNA de células foliculares coletadas <i>in vivo</i> por aspiração folicular guiada por ultrassonografia e submetidas a diferentes técnicas de processamento.....	98

## Lista de Tabelas

<b>Artigo 1</b>	<b>Participação de membros da superfamília TGF beta na foliculogênese, luteinização e luteólise</b>	
<b>Tabela 1</b>	Estudos investigando a regulação e função de membros da superfamília TGF beta na fisiologia ovaria.....	23
<b>Artigo 2</b>	<b>Transforming growth factor beta-family members regulation during induced luteolysis in cattle</b>	
<b>Table 1</b>	Sequences of primers used for quantitative PCR.....	57
<b>Artigo 3</b>	<b>Função da proteína morfogenética óssea 15 no crescimento folicular final e ovulação em bovinos</b>	
<b>Tabela 1</b>	Concentração de progesterona e estradiol no fluído aspirado de estruturas císticas luteinizadas dos animais do grupo BMP15.....	90

## Lista de Abreviaturas e Siglas

<i>ActR</i>	Receptor da ativina
AMH	Hormônio antimulleriano
<i>AMHR2</i>	Receptor 2 do hormônio antimulleriano
BMP	Proteínas morfogenéticas ósseas
BMP15	Proteína morfogenética óssea 15
<i>BMPR</i>	Receptor da proteína morfogenética óssea
CCOs	Complexos cumulus-oócitos
CL	Corpo lúteo
Cx43	Conexina43
CYP11A1	<i>Cholesterol side-chain cleavage</i>
CYP19A1	Aromatase
FSH	Hormônio folículo estimulante
GDF9	Fator de crescimento e diferenciação 9
GDFs	Fatores de crescimento e diferenciação
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
h	Horas
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
HSD3B1	<i>3beta-hydroxysteroid dehydrogenase</i>
i.m.	Intramuscular
IGF1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1
IGFBPs	Proteínas de ligação do fator de crescimento semelhante à insulina
IIF	Injeção intrafolicular
LH	Hormônio luteinizante
mg	Miligramas
µg	Microgramas
MHz	Megahertz

mL	Mililitro
mm	Milímetro
ng	Nanogramas
PGF2 $\alpha$	Prostaglandina F2 alfa
POI	Insuficiência ovariana primária
rh	Recombinante humano
SOP	Síndrome do ovário policístico
StAR	<i>Steroidogenic acute regulatory protein</i>
TGF $\beta$	Família dos fatores de crescimento transformantes beta

## Sumário

<b>1 Introdução.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Objetivos.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1.1.1 Objetivos Específicos.....</b>	<b>18</b>
<b>2 Artigos.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Artigo 1: Regulação e função de membros da superfamília TGF beta na fisiologia ovariana em espécies monovulares .....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 Artigo 2: Transforming growth factor beta-family members regulation during induced luteolysis in cattle .....</b>	<b>39</b>
<b>2.3 Artigo 3: Função da proteína morfogenética óssea 15 no crescimento folicular final e ovulação em bovinos .....</b>	<b>62</b>
<b>2.4 Artigo 4: Diferentes métodos para processamento de amostras de células da granulosa obtidas por aspiração folicular para a extração de RNA .....</b>	<b>91</b>
<b>4 Considerações Finais.....</b>	<b>102</b>
<b>Referências.....</b>	<b>103</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>108</b>



## 1 Introdução

O controle endócrino da foliculogênese, ovulação e luteinização já é estabelecido nas espécies domésticas, principalmente em ruminantes, o que se deve aos estudos pioneiros acerca da dinâmica de crescimento folicular, acessada através da ultrassonografia, associada às dosagens hormonais (GINTHER et al., 1989; DRIANCOURT, 1991; FORTUNE, 1993). Em espécies monovulares como a bovina, esse crescimento folicular antral ocorre em ondas, controlado pelas gonadotrofinas, sendo um evento que ocorre de forma contínua durante a vida reprodutiva da fêmea.

Os folículos antrais após iniciarem seu crescimento possuem apenas dois destinos, a ovulação ou, na maior parte das vezes, a atresia (ERICKSON & SHIMASAKI, 2001). Esse processo de início do crescimento de um grupo de folículos terciários em cada onda folicular é denominado de emergência folicular, que é regulada principalmente pelas gonadotrofinas como o hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), além de seus receptores (FSHR e LHCGR) e esteroides ovarianos. Ou seja, a emergência folicular caracteriza-se pelo crescimento de um grupo de folículos antrais pequenos que são recrutados através da elevação dos níveis de FSH (ADAMS et al., 1992; GINTHER et al., 1996), sendo dependentes de gonadotrofinas até a ovulação.

Do grupo de folículos recrutados, apenas um é selecionado para continuar o desenvolvimento, o folículo dominante, enquanto que os demais entram em processo de atresia, sendo denominados folículos subordinados (GINTHER et al., 1996). Esse processo é denominado divergência folicular e, nas fêmeas bovinas *Bos taurus taurus*, ocorre quando o folículo dominante atinge o diâmetro aproximado de 8,5 mm, momento em que as células da granulosa passam a expressar receptores de LH (LHCGR). A medida em que o folículo cresce, a expressão desses receptores se eleva gradativamente, atingindo seu ápice em folículos a partir de 9 mm (GASPERIN et al., 2015). O folículo dominante possui a capacidade de completar o seu desenvolvimento e de realizar sua maturação folicular final até a ovulação, secretando estradiol e inibina, que ocasionam a redução dos níveis de FSH (GIBBONS et al., 1997). 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, pois quando há elevada concentração plasmática de progesterona, o folículo dominante também entra em atresia (GINTHER et al., 2003).

O controle das fases finais da foliculogênese está relacionado, principalmente com o FSH e LH, além da expressão de fatores de crescimento que modulam a regulação dessas gonadotrofinas. Porém, ainda não são totalmente conhecidos os mecanismos que controlam o início do crescimento e o número de folículos que irá começar a crescer (WEBB et al., 2004). Considerando que os folículos pertencentes a mesma onda folicular sofrem influência dos mesmos hormônios, considera-se que ocorre uma interação dos mediadores endócrinos com os fatores produzidos localmente (KNIGHT & GLISTER, 2006) para a determinação da seleção, divergência e dominância folicular, além da determinação da ovulação.

Neste contexto, os fatores produzidos no ovário são considerados reguladores do ambiente folicular local, auxiliando na determinação do destino de cada folículo: regressão ou ovulação (GINTHER et al., 1996). Os fatores locais regulam funções ovarianas como crescimento e diferenciação folicular (EPPIG et al., 1997; OTSUKA et al., 2001; CHANG et al., 2013), esteroidogênese, ovulação e luteogênese (ERICKSON & SHIMASAKI, 2003b; KNIGHT & GLISTER, 2006).

Com base no acima exposto, as proteínas produzidas pelas células foliculares e os oócitos têm despertado a atenção de diversos grupos de pesquisa. Além do sistema do fator de crescimento semelhante à insulina, que já foi amplamente estudado (MONGET et al., 2002), destacam-se outros fatores locais como os membros da superfamília dos fatores de crescimento transformantes beta (TGF $\beta$ ; revisado por (KNIGHT & GLISTER, 2006) e seus receptores, por desempenharem um papel chave na fertilidade feminina. Os TGF $\beta$  desempenham funções essenciais durante a divergência folicular e ovulação, sendo cruciais nos processos de seleção e diferenciação do folículo dominante (EVANS & FORTUNE, 1997). Em especial, destacam-se os fatores produzidos pelos oócitos como a proteína morfogenética óssea 15 (BMP15) e o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF9), pois são reguladores do crescimento e da diferenciação folicular.

Estudos funcionais demonstraram o papel fisiológico dessas proteínas oocitárias em diversos aspectos das funções ovarianas, desde o desenvolvimento do folículo até a esteroidogênese, comunicação celular, maturação do oócito, ovulação e

função lútea (CHANG et al., 2016). Também são consideradas indispensáveis para o desenvolvimento ovariano, uma vez que a ausência de BMP15 ou GDF9 funcional, resulta em infertilidade (GALLOWAY et al., 2000). Sendo assim, as proteínas secretadas pelo oócito podem ser a chave para o entendimento da diferenciação folicular e regulação da ovulação, pois são determinantes do número de folículos ovulatórios (JUENGEL, 2002; HANRAHAN et al., 2004). No entanto, 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).

Estudos evidenciam o envolvimento de membros da superfamília TGF $\beta$  no controle da taxa de ovulação em mulheres, estando associados a menor fertilidade ou, paradoxalmente, aumento da taxa ovulatória. O envolvimento destes fatores na etiopatogenia de transtornos ovarianos, principalmente em humanos, justifica o interesse no melhor entendimento da regulação e função dos membros da superfamília. Estudos *in vitro*, sugerem que a redução dos níveis de BMP15 nas mutações heterozigóticas em mulheres pode ocasionar a interrupção da função ovariana normal e interferir na fertilidade (PATIÑO et al., 2017). As BMPs são expressas tanto nos ovários de mulheres saudáveis quanto nas com síndrome do ovário policístico (SOP), podendo estar relacionadas com as anormalidades encontradas nestas pacientes (KHALAF et al., 2013). Em mulheres com SOP, ocorre uma redução da expressão de BMP15 na fase folicular inicial, quando comparado com tecidos ovarianos normais (WEI et al., 2014).

Diversos estudos demonstram que a manipulação dos TGF $\beta$  pode ter aplicação direta em técnicas de contracepção ou superovulação. A manipulação das proteínas foliculares está envolvida na regulação do desenvolvimento folicular, influenciando a taxa de ovulação, em bovinos (JUENGEL et al., 2013). Em éguas, a imunização com BMP15 ocasiona uma alteração na função ovariana, impedindo a ovulação (DAVIS et al., 2018). Em contrapartida, a imunização contra BMP15 em cervos ocasionou o aumento do número de filhotes por fêmea (ECKERY et al., 2014). Entretanto, apesar das evidências indicarem um potencial da imunização contra BMP15 e GDF9 para o controle reprodutivo em diferentes espécies, os mecanismos envolvidos ainda não são completamente conhecidos.

Ressalta-se que a maior parte dos estudos acerca dos membros da superfamília TGF $\beta$  durante o processo de desenvolvimento folicular têm sido

realizados em modelos *in vitro*, ou investigando mutações espontâneas em ovinos e humanos. E apesar da grande relevância, a real função desses fatores foliculares na fisiologia ovariana ainda é desconhecida.

Além das funções dos TGFs e seus receptores nas etapas iniciais da foliculogênese (ERICKSON & SHIMASAKI, 2003a; KNIGHT & GLISTER, 2006), há evidências de um envolvimento nos processos de ovulação e luteinização (JUENGEL et al., 2004), embora esta hipótese não tenha sido investigada em espécies monovulares. Já foi demonstrado que o GDF9 e a BMP15 previnem a luteinização prematura (SPICER et al., 2008), além de regularem a diferenciação folicular (SPICER et al., 2008; MCNATTY et al., 2009). Em células da granulosa de ovinos, a BMP15 suprime a secreção de progesterona induzida por FSH em pequenos folículos antrais (FABRE et al., 2006). 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).

Há também evidências da participação de membros da família TGF $\beta$  no processo de manutenção e regressão da estrutura lútea (Knight e Glister 2006, NIO-KOBAYASHI et al. 2013; KNIGHT & GLISTER, 2006). Vários membros da família são expressos nas células luteais bovinas e o tratamento de células luteinizadas *in vitro* com alguns fatores dessa superfamília diminui a secreção de progesterona (KAYANI et al., 2009). Porém, pouco se sabe sobre a regulação e função das BMPs na luteinização e função do corpo lúteo (KAYANI et al., 2009). Ao nosso conhecimento, a expressão de ligantes e receptores da família TGF $\beta$  durante o processo de regressão do corpo lúteo em espécies domésticas ainda não foi investigada.

## **1.1 Objetivos**

### **1.1.1 Objetivo Geral**

Avançar no entendimento da regulação e função de membros da superfamília TGF $\beta$  no crescimento folicular, ovulação, formação e regressão do corpo lúteo, utilizando fêmeas bovinas como um modelo de espécie monovular.

#### **1.1.1.1 Objetivos Específicos**

1) Revisar as informações disponíveis na literatura sobre os principais membros da superfamília TGF $\beta$  relacionados à regressão luteal, especialmente BMPs, GDFs e

receptores associados, com foco principal em espécies monovulares.

2) Investigar a expressão de membros da família  $TGF\beta$  no corpo lúteo bovino após indução da luteólise com  $PGF2\alpha$ .

3) Avaliar o efeito do tratamento com BMP15rh sobre o crescimento folicular final, ovulação, luteinização e função luteal em bovinos.

4) Determinar o melhor protocolo de processamento de células da granulosa obtidas *in vivo* através de aspiração folicular para estudos de expressão gênica em fêmeas bovinas.

## **2 Artigos**

### **2.1 Artigo 1**

#### **Participação de membros da superfamília TGF beta na foliculogênese, luteinização e luteólise**

Cristina Sangoi Haas, Monique Tomazele Rovani, Paulo Bayard Dias Gonçalves,  
Bernardo Garziera Gasperin

Aceito para publicação na Revista Brasileira de Reprodução Animal

1 **Participação de membros da superfamília TGF beta na foliculogênese, luteinização e**  
2 **luteólise**

3 *Role of TGF-beta superfamily members during folliculogenesis, luteinization and luteolysis*

4 Cristina Sangoi Haas<sup>1</sup>, Monique Tomazele Rovani<sup>1,2</sup>, Paulo Bayard Dias Gonçalves<sup>2</sup>,  
5 Bernardo Garziera Gasperin<sup>1\*</sup>

6 <sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas, Núcleo de Ensino e Pesquisa em Reprodução Animal  
7 (ReproPEL), Capão do Leão, RS, Brasil.

8 <sup>2</sup>Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), PPGMV, Santa Maria, RS, Brasil.

9 \*Correspondência: Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Campus  
10 Universitário S/Nº, 96010-900, Capão do Leão, RS, Brasil. (53) 3275 7189. E-mail:  
11 bggasperin@gmail.com

12 **Resumo**  
13

14 Fatores produzidos no ovário como os membros da família dos fatores de crescimento  
15 transformantes beta (TGFβ) e seus receptores, são essenciais durante o desenvolvimento  
16 folicular. Membros desta superfamília desempenham papel chave na fertilidade e diferenças  
17 espécie-específicas na regulação desses fatores têm sido descritas, envolvendo as funções  
18 ovarianas em condições fisiológicas ou patológicas. A proteína morfogenética óssea 15  
19 (BMP15) e o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF9) destacam-se, pois desempenham  
20 papéis importantes na regulação do crescimento e da diferenciação folicular. Ainda, há  
21 evidências de que outras BMPs, ativinas, inibinas e seus receptores também possam estar  
22 envolvidos no controle da foliculogênese, ovulação/luteinização e luteólise. A maioria dos  
23 dados demonstram que os TGFs atuam regulando negativamente a síntese de progesterona, o que  
24 sugere envolvimento na inibição da luteinização e promoção da luteólise. O avanço no

25 entendimento das funções destes fatores locais poderá possibilitar o desenvolvimento tanto de  
26 novas estratégias contraceptivas, como também para controle do ciclo estral ou menstrual.

27 **Palavras-chave:** fatores oocitários, foliculogênese, luteólise.

28 **Abstract**

29 *Factors produced in the ovary, such as transforming growth factors beta members (TGF $\beta$ ) and*  
30 *their receptors, play a key role during follicular development. Members from this family have*  
31 *an important role in female fertility and species-specific differences in their regulation have*  
32 *been described, being involved in ovarian function regulation under both physiological and*  
33 *pathological conditions. Bone morphogenetic protein 15 (BMP15) and growth and*  
34 *differentiation factor 9 (GDF9) are the most studied factors due to their involvement in the*  
35 *regulation of follicular development and differentiation. Besides BMP15 and GDF9, other*  
36 *BMPs, activins, inhibins and their receptors may be involved in the control of folliculogenesis,*  
37 *ovulation/luteinization and luteolysis. Most studies demonstrate that TGF $\beta$  members negatively*  
38 *regulate progesterone synthesis, suggesting an involvement in luteolysis. The advance in the*  
39 *knowledge of the function of these local factors may allow the development of new contraceptive*  
40 *strategies as well as new approaches to control the estrous or menstrual cycle.*

41 **Keywords:** oocyte factors, folliculogenesis, luteolysis.

42 **Introdução**

43 O controle endócrino da diferenciação folicular, ovulação e luteinização é bem  
44 estabelecido, principalmente em humanos e animais de produção. Entretanto, fatores  
45 produzidos no ovário são reguladores do ambiente folicular de maneira autócrina e/ou  
46 parácrina, determinando o destino de cada folículo (Ginther et al., 1996). Da mesma forma, o  
47 corpo lúteo (CL), também tem sua função regulada por fatores locais, especialmente no controle



48 da síntese de progesterona (P4) e durante sua regressão (Nio-Kobayashi et al., 2015; Zhang et  
 49 al., 2015; Gregson et al., 2016). Os TGFs têm despertado a atenção de pesquisadores, sendo a  
 50 regulação e função destes fatores amplamente descritas no recrutamento e desenvolvimento  
 51 folicular e pouco investigadas no controle da esteroidogênese, ovulação/luteinização e luteólise  
 52 (Tab. 1). A superfamília TGF $\beta$  é composta por subfamílias, como a das proteínas  
 53 morfogenéticas ósseas (BMPs; 20 membros), ativina/inibina, fatores de crescimento e  
 54 diferenciação (GDFs; 9 membros), hormônio antimulleriano (AMH), além de outras proteínas  
 55 (revisado por Knight e Glister (2006). Estudos demonstram que a manipulação dos TGFs pode  
 56 ter aplicação em técnicas de controle do ciclo estral em diversas espécies como ovinos, bovinos,  
 57 equinos e cervídeos (Galloway et al., 2000; Souza et al., 2001; Hanrahan et al., 2004; Juengel  
 58 et al., 2009; Eckery et al., 2014; Davis et al., 2018). Além disso, o envolvimento destes fatores  
 59 na etiopatogenia de transtornos ovarianos, justifica o interesse pelo entendimento da regulação  
 60 e função dos mesmos. Portanto, essa revisão irá abordar os principais TGFs relacionados à  
 61 regulação ovariana, especialmente BMPs, GDFs e receptores associados nos processos de  
 62 luteinização e luteólise em espécies monovulares.

63 **Tabela 1.** Estudos investigando a regulação e função de membros da superfamília TGF beta na  
 64 fisiologia ovariana.

65

Autores	Espécie	Fator(es) avaliado(s)	Principais resultados
Spicer et al., 2008	Bovino	GDF9	Regulação da esteroidogênese folicular.
Zhao et al., 2010	Humano	BMP15 e GDF9	Aumento da expressão de GDF9 e BMP15 em pacientes com síndrome do ovário policístico.
Patino et al., 2017	Humano	BMP15	Mutações que afetam os níveis de BMP15 estão associadas com falência ovariana precoce.

Galloway et al., 2000; Hanrahan et al., 2004	Ovino	BMP15 e GDF9	<b>Mutações inativadoras nos genes BMP15 e GDF9 em heterozigose (redução de proteína funcional) induzem a superovulação enquanto, em homozigose, induzem à esterilidade.</b>
McNatty et al., 2009	Ovino	BMP15	Mutação no gene da BMP15 em heterozigose induz maior responsividades das CG ao LH.
Foroughinia et al., 2017	Ovino	GDF9 e BMP15	Maior expressão de BMP15 e menor expressão de GDF9 em CCOs de folículos pequenos em comparação com folículos grandes.
Juengel et al., 2004; Juengel et al., 2009	Ovino e bovino	GDF9 e BMP15	Imunizações contra as proteínas alteram a foliculogênese, aumentando a taxa ovulatória ou inibindo o desenvolvimento folicular.
Davis et al., 2018	Equinos	GDF9 e BMP15	Imunização contra GDF9 diminuiu o diâmetro do folículo pré-ovulatório e a manifestação de estro. Imunização contra BMP15 afetou negativamente a taxa ovulatória e induziu luteinização/ovulação de folículos pequenos.
Eckery et al., 2014	Cervídeos	BMP15 e GDF9	Imunização contra BMP15 aumentou o número de nascidos/fêmea. Vacinação contra GDF9 afetou negativamente a fertilidade.
Selvaraju et al., 2013	Bovino	BMP2 e BMPR2	Maior expressão de BMP2 e BMPR2 na fase de dominância folicular e em folículos pré-ovulatórios. BMP2 estimula síntese de E2 e inibe P4.
Yamashita et al., 2010	Bovino	BMP4	Suprime a síntese de P4 inibindo a expressão da enzima StAR.
Kayani et al., 2009	Bovino	BMP6	Inibe a síntese de P4 in vitro, diminuindo a expressão das enzimas CYP11A1, HSD3B1 e CYP19A1
Glister et al., 2005	Bovino	BMP-4, -6 e -7	Inibiram a síntese de andrógenos na teca, diminuindo a enzima HSD17A.
Glister et al., 2004	Bovino	BMP-4, -6 e -7	Aumentam a síntese de E2 estimulada por IGF na CG.
Akiyama et al., 2014	Humano	BMP6	Associada a supressão de inibidores de proteases e leucócitos e ao aumento na atração de neutrófilos pelas CG.
Poole et al., 2016	Bovino	AMH	CG de folículos antrais pequenos expressam mais RNAm de AMH e AMHR2. AMH inibiu a expressão de CYP19A1 na CG in vitro.
Campbell et al., 2012	Ovino	AMH	Imunização contra AMH diminuiu o número de folículos pré-antrais e antrais pequenos e aumentou folículos antrais maiores e a taxa ovulatória.
Mulsant et al., 2001; Souza et al., 2001	Ovino	BMPR1B	Mutação no receptor associada a aumento na taxa ovulatória e ao número de nascidos.

Rajesh et al., 2017	Bubalino	BMP-4 e -7	Estimulam a produção de P4 e a sobrevivência celular.
Chang et al., 2013	Humano	BMP15	Diminui a expressão de StAR e produção de P4.
Myers et al., 2008; Kayani et al., 2009; O'Connell et al., 2016	Humano, ovino e bovino	Ativina A	Reduz a síntese de P4.
Nio-kobayashi et al., 2015	Humano	BMP-2, -4 e -6 e receptores	São mais expressos em CL durante a regressão, sendo negativamente regulados pelo hCG.
Gregson et al., 2016	Bovino	BMP2	CL com produção diminuída de P4 apresentam uma elevação na expressão de BMP2

66 Abreviações: CG: células da granulosa; CCO: complexo cumulus-oócito; E2: estrógeno; P4:  
67 progesterona; CL: corpo lúteo.

#### 68 **Principais membros da superfamília TGF $\beta$ : as proteínas oocitárias BMP15 e GDF9**

69 A BMP15 e o GDF9 são conhecidos como proteínas oocitárias por terem síntese  
70 predominante ou exclusiva nos oócitos, destacando-se por desempenharem papéis importantes  
71 na regulação do crescimento e diferenciação folicular desde a foliculogênese pré-antral até a  
72 ovulação. À estas proteínas foram atribuídas funções no desenvolvimento folicular, na  
73 maturação oocitária, na produção de esteroides, na expressão de receptores de gonadotrofinas  
74 e na determinação da taxa ovulatória (Chang et al., 2013), existindo também evidências do  
75 envolvimento destas nos processos de ovulação/luteinização (Juengel et al., 2004).

76 O GDF9 parece atuar na regulação da esteroidogênese em bovinos (Spicer et al., 2008),  
77 e na ovulação/luteinização em ovinos (Juengel, 2002), sendo observadas funções distintas nas  
78 diferentes espécies e modelos utilizados (Mcnatty et al., 2005; Spicer et al., 2006). Em  
79 mulheres, após a indução da ovulação, há um aumento da expressão de *GDF9* e *BMP15* nas  
80 pacientes com síndrome do ovário policístico (SOP) em comparação ao grupo controle (Zhao  
81 et al., 2010). Ainda, recentemente, identificou-se que mutações que afetam os níveis de BMP15  
82 estão associadas com falência ovariana precoce (Patino et al., 2017).

83 Em ovelhas foi observado que mutações espontâneas inativadoras nos genes *BMP15* e

84 *GDF9* em heterozigose geram redução nos níveis de proteína funcional e induzem a  
85 superovulação, enquanto que em homozigose, induzem à esterilidade (Galloway et al., 2000;  
86 Hanrahan et al., 2004). Os diferentes genótipos sugerem que estas proteínas são indispensáveis  
87 no desenvolvimento folicular inicial mas, posteriormente, atuam como inibidores da  
88 diferenciação folicular (Juengel et al., 2009).

89 Em relação a BMP15, foi observado que quando há diminuição nos níveis funcionais,  
90 há também a diferenciação precoce, resultando em maior responsividade ao LH nas células da  
91 granulosa (CG) ovina (Mcnatty et al., 2009). Concordando com a hipótese de um efeito  
92 inibitório da BMP15 sobre a diferenciação, complexos cumulus-oócitos (CCOs) de folículos  
93 pequenos apresentam maior expressão de RNAm de *BMP15* em comparação aos de grandes  
94 folículos antrais (Foroughinia et al., 2017).

95 De forma similar ao observado nas mutações em heterozigose, a imunização contra  
96 BMP15 e GDF9 por curto período promoveu aumento na taxa ovulatória em ovinos e bovinos  
97 (Juengel et al., 2004; Juengel et al., 2009), sem efeitos negativos na fecundação,  
98 desenvolvimento embrionário e gestação em ovinos (Juengel et al., 2004). Por outro lado, a  
99 imunização passiva, com anticorpos bloqueadores da atividade de GDF9 ou BMP15, afetou  
100 negativamente a ovulação, função luteal e síntese de P4 (Juengel, 2002) e a imunização por  
101 períodos prolongados bloqueou o desenvolvimento folicular em ovinos (Mcnatty et al., 2005).

102 Em éguas foi observado que a imunização contra GDF9 não afetou a taxa de ovulação,  
103 porém diminuiu o diâmetro do folículo pré-ovulatório e a manifestação de estro, enquanto a  
104 imunização contra BMP15 afetou negativamente a taxa ovulatória e resultou em  
105 luteinização/ovulação de folículos pequenos (Davis et al., 2018). Em cervídeos, a imunização  
106 contra BMP15 aumentou o número de nascidos/fêmea enquanto que a vacinação contra GDF9  
107 afetou negativamente a fertilidade (Eckery et al., 2014).

108 Apesar das evidências indicando um potencial uso da imunização contra BMP15 e

109 GDF9 no controle reprodutivo em diferentes espécies, os mecanismos envolvidos ainda não são  
110 completamente conhecidos. É possível que os diferentes efeitos observados sejam decorrentes  
111 de diferenças específicas e da variabilidade na resposta humoral pelos diferentes peptídeos ou  
112 adjuvantes utilizados. Desta maneira, o melhor entendimento da expressão e função do sistema  
113 BMP/GDF no ovário são fundamentais para o desenvolvimento de novas tecnologias para o  
114 controle da função ovariana, tanto no sentido de promover efeitos contraceptivos como  
115 melhorias nas taxas de fertilização.

### 116 **Expressão e função de TGFs e seus receptores na foliculogênese antral**

117 Uma vez que os TGF $\beta$  sintetizados no folículo atuam em sinergia, ou muitas vezes como  
118 antagonistas, é necessário investigar não apenas as proteínas oocitárias, mas também as  
119 produzidas por outros tipos celulares. Enquanto o GDF9 e a BMP15 parecem regular  
120 principalmente a diferenciação (Spicer et al., 2008; McNatty et al., 2009), regulando a  
121 sensibilidade das células foliculares às gonadotrofinas, as BMPs 4, 6 e 7, parecem regular a  
122 esteroidogênese (Glister et al., 2004). Recentemente, nosso grupo investigou a regulação das  
123 *BMPs 1, 2, 4 e 6* (dados não publicados), do GDF9 (Haas et al., 2016) e dos receptores de GDF9  
124 e BMP15 (Gasperin et al., 2014), durante a divergência folicular em bovinos. O padrão de  
125 expressão da *BMP4* sugere uma função na proliferação celular e/ou esteroidogênese, enquanto  
126 a expressão de *BMP2* está positivamente associada aos níveis de estradiol (E2) entre o pico de  
127 LH e a ovulação.

128 A maior expressão de *BMP2* e *BMPR2* foi observada na fase de dominância folicular e  
129 em folículos pré-ovulatórios, sendo que a adição de BMP2 ao cultivo de CG bovina aumenta a  
130 síntese de E2 e diminui a de P4 (Selvaraju et al., 2013). Estudos funcionais demonstram que a  
131 BMP4 suprime a síntese de progesterona inibindo a expressão do gene da enzima StAR  
132 (Yamashita et al., 2010), responsável pela internalização de colesterol na mitocôndria. À BMP6  
133 também foi atribuída uma função inibitória na luteinização, uma vez que inibe a síntese de P4

134 *in vitro*, diminuindo a expressão das enzimas esteroidogênicas CYP11A1, HSD3B1 e  
135 CYP19A1 (Kayani et al., 2009).

136 Em cultivo de células da teca bovina, as BMPs 4, 6 e 7 inibiram a síntese de andrógenos,  
137 diminuindo a enzima HSD17A (Glister et al., 2005). Em cultivo de CG, as BMPs 4, 6 e 7,  
138 aumentam a síntese de E2 estimulada por IGF (Glister et al., 2004) e suprimem a secreção de  
139 P4. Acredita-se que a BMP6 possa estar envolvida no processo ovulatório, já que esta fora  
140 relacionada com a supressão de inibidores de proteases e leucócitos e com aumento na atração  
141 de neutrófilos pelas CG humanas *in vitro* (Akiyama et al., 2014).

142 Outro importante membro da família TGF $\beta$ , o AMH, marcador da reserva ovariana  
143 expresso exclusivamente nas CG, reduz a responsividade de folículos antrais pequenos ao FSH  
144 (Knight e Glister, 2006). As CG bovina provenientes de folículos antrais pequenos expressam  
145 maiores níveis de RNAm de *AMH* e *AMHR2* (Poole et al., 2016), sendo que nosso grupo  
146 detectou maiores níveis de RNAm dos dois genes na CG de folículos dominantes saudáveis,  
147 em comparação aos subordinados (Ilha et al., 2016). Em CG bovina o tratamento *in vitro* com  
148 BMP-2, -6 ou -15 aumenta a expressão de *AMH* e *AMHR2* (Poole et al., 2016), enquanto que o  
149 tratamento com AMH inibiu a expressão de RNAm da enzima *CYP19A1* nas células da  
150 granulosa.

151 Conforme relatado para BMP15 e GDF9, a imunização contra AMH alterou o  
152 desenvolvimento folicular em ovelhas, sendo observada diminuição de folículos pré-antrais e  
153 antrais pequenos, aumento de folículos antrais maiores e da taxa ovulatória (Campbell et al.,  
154 2012). Os estudos sugerem que BMP15, GDF9 e AMH são essenciais para o desenvolvimento  
155 folicular inicial, mas atuam como inibidores da diferenciação no crescimento folicular final,  
156 enquanto as demais BMPs parecem estar mais envolvidas na regulação da esteroidogênese  
157 ovariana.

158 A sinalização das proteínas BMP15 e GDF9 é iniciada através da ligação ao receptor

159 BMPR2. Após a ligação das proteínas a este receptor, a sinalização da BMP15 é continuada  
160 através do receptor BMPR1B (ALK6), enquanto o GDF9 ativa o receptor TGFBR1 (ALK5).  
161 Após, a sinalização ocorre a partir da ativação das R-SMADs, que regulam a expressão gênica  
162 (revisado por Knight and Glister (2006).

163        Importantes funções no controle da foliculogênese foram atribuídas ao BMPR1B,  
164 envolvido na sinalização da BMP15, e das BMPs 2 e 4. Uma mutação neste receptor está  
165 associada a aumento na taxa ovulatória em ovinos (Mulsant et al., 2001; Souza et al., 2001),  
166 sendo que a introdução desta mutação em rebanhos aumenta o número de cordeiros nascidos  
167 por fêmea. Além disto, ambos BMPR-1A e -1B parecem atuar no controle do crescimento e  
168 regressão folicular, evitando a formação de tumores (Edson et al., 2010). A expressão dos  
169 receptores (*BMPR1A*, *BMPR1B*, *BMPR2* e *TGFBR1*) está negativamente correlacionada aos  
170 níveis de P4, o que sugere uma inibição da luteinização (dados não publicados).

171        A expressão de RNAm dos receptores do GDF9 (*BMPR2* e *TGFRB1*) não é  
172 diferentemente regulada nas CG de folículos dominantes e subordinados (Gasperin et al., 2014).  
173 No mesmo estudo, demonstrou-se que o *BMPR1B* é mais expresso em folículos subordinados  
174 atrésicos e após o tratamento intrafolicular com inibidores do desenvolvimento folicular.  
175 Portanto, pode-se inferir que o receptor BMPR1B, além de regular a responsividade ao LH,  
176 também pode influenciar a atresia.

### 177                    **Fatores da superfamília TGF $\beta$ na luteinização e luteólise**

178        A luteinização folicular é caracterizada pela diminuição na expressão de aromatase  
179 (*CYP19A1*) nas CG e aumento na expressão de *HSD3B1*, o que repercute em diminuição da  
180 síntese de E2 e aumento da síntese de P4, respectivamente. Este processo é crucial para a  
181 formação do CL e, conseqüentemente, estabelecimento e manutenção de gestação. Estudos *in*  
182 *vitro* demonstraram que as BMPs podem possuir efeitos opostos à gonadotrofina coriônica  
183 humana (hCG), suprimindo a produção de progesterona nas CG humana luteinizadas (Chang et

184 al., 2013; Nio-Kobayashi et al., 2015; Zhang et al., 2015). Além disso, em CG bovina a BMP2  
185 aumenta a síntese de E2 e diminui a de P4 (Selvaraju et al., 2013) e, em humanos, eleva a  
186 expressão de aromatase (Yamashita et al., 2010). O tratamento com GDF8 em CG humana  
187 regula negativamente a expressão da enzima *StAR*, diminuindo a produção de P4 (Fang et al.,  
188 2015).

189 De forma similar ao observado para a BMP2, *in vitro*, as BMPs 4 e 7 suprimem a  
190 secreção de progesterona pelas CG bovina (Glister et al., 2004), inibindo a expressão da *StAR*  
191 (Yamashita et al., 2010; Zhang et al., 2015). O efeito inibidor da luteinização parece ser  
192 mediado pelo BMPR1A (Zhang et al., 2015). Contrariando os dados acima descritos, em cultivo  
193 de células luteais de búfalas, as BMPs 4 e 7 estimulam a produção de progesterona e a  
194 sobrevivência celular, sugerindo que estas BMPs regulam positivamente a função luteal através  
195 das enzimas *CYP11A1*, *StAR* e *3BHS*D (Rajesh et al., 2017).

196 Aparentemente, fatores produzidos pelos oócitos também previnem a luteinização  
197 prematura. Em CG de mulheres submetidas à aspiração folicular, demonstrou-se que a BMP15  
198 diminui os níveis e expressão de *StAR* e produção de progesterona (Chang et al., 2013). Em  
199 bovinos, Chang et al. (2013) demonstraram que o efeito supressor da BMP15 sobre a síntese de  
200 P4 é inibido após bloqueio do BMPR1A.

201 Assim como algumas BMPs, as ativinas (A, B e AB) regulam a esteroidogênese  
202 ovariana, aumentando os níveis da aromatase e diminuindo a expressão de *StAR* e síntese de  
203 P4 em cultivo de CG humana luteinizadas (Chang et al., 2014). A ativina A reduz a luteinização  
204 de CG *in vitro* em humanos e bovinos (Myers et al., 2008; Kayani et al., 2009; O'Connell et al.,  
205 2016), diminuindo a produção de P4 (Yamashita et al., 2010). A elevação da ativina pode  
206 contribuir para a persistência folicular prolongada, baixos níveis de apoptose e alterações  
207 endócrinas em bovinos com cistos ovarianos (Stangaferro et al., 2014). Observa-se maiores  
208 níveis sistêmicos de ativina em ovelhas com baixa sobrevivência embrionária e CG luteinizadas



209 tratadas com ativina A possuem reduzida secreção de P4 (O'Connell et al., 2016).

210 As inibinas também são reguladas ao longo do ciclo menstrual em mulheres, sendo que  
211 a inibina B parece ser formada no folículo pré-ovulatório tendo valores significativamente mais  
212 baixos na fase luteal, enquanto que a inibina A está mais elevada no meio da fase luteal (Groome  
213 et al., 1996). O tratamento com BMPs em CG bovina cultivadas *in vitro* aumenta a secreção de  
214 inibina e ativina (Glister et al., 2004), enquanto que as BMPs 4 e 6 estimulam a expressão da  
215 inibina (inhBB) em células luteais humanas (Nio-Kobayashi et al., 2015), demonstrando a  
216 interação entre os fatores.

217 Há também evidências da participação de membros da superfamília TGF beta na  
218 luteólise, ou seja, na regressão do CL quando não há o estabelecimento da gestação,  
219 oportunizando nova chance de concepção. O tratamento *in vivo* e *in vitro* com prostaglandina  
220 F2 alfa (PGF), principal agente luteolítico nas espécies domésticas, induz a expressão do  
221 TGF $\beta$ 1 no CL bovino (Hou et al., 2008). Este fator antagoniza as ações de fatores de  
222 sobrevivência, aumentando a sensibilidade do CL aos estímulos apoptóticos, induzindo a  
223 luteólise. Do mesmo modo, as *BMPs 2, 4 e 6* e seus receptores são mais expressos em CL de  
224 mulheres durante a regressão, sendo negativamente reguladas pelo hCG (Nio-Kobayashi et al.,  
225 2015), sugerindo envolvimento na luteólise. Recentemente, observou-se que os genes das  
226 *BMPs 1, 2, 3, 4 e 6* e receptores associados são regulados na luteólise funcional e morfológica  
227 em bovinos (autor, instituição, ano dados não publicados).

228 Corpos lúteos bovinos com produção diminuída de P4 (oriundos da indução da ovulação  
229 de folículos da primeira onda folicular), apresentam uma elevação na expressão de transcritos  
230 associados à luteólise como o BMP2 (Gregson et al., 2016). Esta expressão aumentada de  
231 *BMP2* também foi relacionada à regressão da estrutura luteal em humanos (Nio-Kobayashi et  
232 al., 2015). O aumento da expressão da *BMP2* no CL em regressão pode ser inibido pela hCG,  
233 um potente fator luteotrófico, tanto em sistemas *in vivo* como *in vitro* (Nio-Kobayashi et al.,

234 2015). A BMP2 diminui a comunicação intercelular (junções GAP) em CG humana  
235 luteinizadas, diminuindo a expressão de Cx43, facilitando a luteólise (Wu et al., 2017).

236 De um modo geral, pode-se supor que as BMPs têm função de prevenir a luteinização  
237 durante a fase folicular do ciclo estral e promover a luteólise (Chang et al., 2014; Wu et al.,  
238 2017). No entanto, as funções dos TGF $\beta$  variam conforme o fator utilizado, a espécie de origem  
239 e o tipo de célula avaliada. Ainda, dados obtidos em modelos *in vivo* e *in vitro* são, às vezes,  
240 conflitantes. Por isso, estudos funcionais *in vivo* são necessários para identificar as funções  
241 precisas de cada componente no ovário.

### 242 **Considerações finais**

243 A regulação e função dos TGFs estão mais estabelecidas ao longo do desenvolvimento  
244 folicular, sendo que a maior parte do conhecimento em espécies monovulatórias foi obtido nas  
245 espécies bovina, humana e, principalmente, ovina. Uma vez que marcadas diferenças foram  
246 descritas, o estudo em outras espécies, se faz necessário. Há também evidências suficientes para  
247 suportar a participação dos TGF na regulação da esteroidogênese, em eventos como  
248 luteinização e luteólise, especialmente em humanos e bovinos. A maioria dos dados  
249 demonstram que os TGF e seus receptores atuam regulando negativamente a síntese de  
250 progesterona, embora experimentos funcionais *in vivo* sejam necessários para melhor  
251 estabelecer a função fisiológica na ovulação/formação do CL e luteólise. A elucidação do papel  
252 dos fatores locais na fisiologia ovariana pode contribuir com o entendimento de processos  
253 patológicos bem como no desenvolvimento de tecnologias que tenham por objetivo a  
254 contracepção ou aumento da taxa ovulatória.

### 255 **Agradecimentos**

256 Este estudo foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e  
257 Tecnológico (CNPq; 309138/2017-5), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível  
258 Superior- Brasil - Código de Financiamento 001 (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa

259 do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS – Edital PRONEX 12/2014 -FAPERGS/CNPq,  
260 16/2551-0000494-3).

261 **Referências**

262 **Akiyama I, Yoshino O, Osuga Y, Shi J, Takamura M, Harada M, Koga K, Hirota Y,**  
263 **Hirata T, Fujii T, Saito S, Kozuma S.** The Role of Bone Morphogenetic Protein 6 in  
264 Accumulation and Regulation of Neutrophils in the Human Ovary. *Reprod Sci*, v.21, n.6, p.772-  
265 777, 2014.

266 **Campbell BK, Clinton M, Webb R.** The role of anti-Mullerian hormone (AMH) during  
267 follicle development in a monovulatory species (sheep). *Endocrinology*, v.153, n.9, p.4533-43,  
268 2012.

269 **Chang H-M, Cheng J-C, Klausen C, Leung PCK.** BMP15 Suppresses Progesterone  
270 Production by Down-Regulating StAR via ALK3 in Human Granulosa Cells. *Mol Endocrinol*,  
271 v.27, n.12, p.2093-2104, 2013.

272 **Chang H-M, Cheng J-C, Klausen C, Taylor EL, Leung PC.** Effects of recombinant activins  
273 on steroidogenesis in human granulosa-lutein cells. *J Clin Endocrinol Metab*, v.99, n.10,  
274 p.E1922-E1932, 2014.

275 **Davis KA, Klohonatz KM, Mora DSO, Twenter HM, Graham PE, Pinedo P, Eckery DC,**  
276 **Bruemmer JE.** Effects of immunization against bone morphogenetic protein-15 and growth  
277 differentiation factor-9 on ovarian function in mares. *Anim Reprod Sci*, v.192, p.69-77, 2018.

278 **Eckery DC, Miller LA, Killian GJ, Denicola AJ.** Effects of Vaccination against GDF9 and  
279 BMP15 on Fertility and Ovarian Function in the White-tailed Deer. *Proceedings 26th Vertebr.*  
280 *Pest Conf.* R.M. Timm and J.M. O'Brien, Eds. Published at University of California, Davis,  
281 2014, pp.391-395.

282 **Edson MA, Nalam RL, Clementi C, Franco HL, Demayo FJ, Lyons KM, Pangas SA,**  
283 **Matzuk MM.** Granulosa Cell-Expressed BMPR1A and BMPR1B Have Unique Functions in

- 284 Regulating Fertility but Act Redundantly to Suppress Ovarian Tumor Development. *Mol*  
285 *Endocrinol*, v.24, n.6, p.1251-1266, 2010.
- 286 **Fang L, Chang H-M, Cheng J-C, Yu Y, Leung PCK, Sun Y-P.** Growth Differentiation  
287 Factor-8 Decreases StAR Expression Through ALK5-Mediated Smad3 and ERK1/2 Signaling  
288 Pathways in Luteinized Human Granulosa Cells. *Endocrinology*, v.156, n.12, p.4684-4694,  
289 2015.
- 290 **Foroughinia G, Fazileh A, Eghbalsaied S.** Expression of genes involved in BMP and estrogen  
291 signaling and AMPK production can be important factors affecting total number of antral  
292 follicles in ewes. *Theriogenology*, v.91, p.36-43, 2017.
- 293 **Galloway SM, Mcnatty KP, Cambridge LM, Laitinen MP, Juengel JL, Jokiranta TS,**  
294 **Mclaren RJ, LUIRO K, Dodds KG, Montgomery GW, Beattie AE, Davis GH, Ritvos O.**  
295 Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and  
296 infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet*, v.25, n.3, p.279-83, 2000.
- 297 **Gasperin BG, Ferreira R, Rovani MT, Bordignon V, Duggavathi R, Buratini J, Oliveira**  
298 **JFC, Gonçalves PBD.** Expression of receptors for BMP15 is differentially regulated in  
299 dominant and subordinate follicles during follicle deviation in cattle. *Anim Reprod Sci*, v.144,  
300 n.3-4, p.72-78, 2014.
- 301 **Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K.** Selection of the dominant  
302 follicle in cattle. *Biol Reprod*, v.55, n.6, p.1187-1194, 1996.
- 303 **Glister C, Kemp CF, Knight PG.** Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors  
304 in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential  
305 modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. *Reproduction*, v.127, n.2, p.239-254,  
306 2004.
- 307 **Glister C, Richards SL, Knight PG.** Bone Morphogenetic Proteins (BMP) -4, -6, and -7  
308 Potently Suppress Basal and Luteinizing Hormone-Induced Androgen Production by Bovine

- 309 Theca Interna Cells in Primary Culture: Could Ovarian Hyperandrogenic Dysfunction Be  
310 Caused by a Defect in Thecal BMP Signaling? *Endocrinology*, v.146, n.4, p.1883-1892, 2005.
- 311 **Gregson E, Webb R, Sheldrick EL, Campbell BK, Mann GE, Liddell S, Sinclair KD.**  
312 Molecular determinants of a competent bovine corpus luteum: first-vs final-wave dominant  
313 follicles. *Reproduction*, v.151, n.6, p.563-575, 2016.
- 314 **Groome NP, Illingworth PJ, O'brien M, Pai R, Rodger FE, Mather JP, Mcneilly AS.**  
315 Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol*  
316 *Metab*, v.81, n.4, p.1401-1405, 1996.
- 317 **Haas C, Rovani M, Oliveira F, Vieira A, Bordignon V, Gonçalves P, Ferreira R, Gasperin**  
318 **B.** Expression of growth and differentiation Factor 9 and cognate receptors during final  
319 follicular growth in cattle. *Anim Reprod*, v.13, n.4, p.756-761, 2016.
- 320 **Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R, Galloway SM.**  
321 Mutations in the Genes for Oocyte-Derived Growth Factors GDF9 and BMP15 Are Associated  
322 with Both Increased Ovulation Rate and Sterility in Cambridge and Belclare Sheep (*Ovis aries*).  
323 *Biol Reprod*, v.70, n.4, p.900-909, 2004.
- 324 **Hou X, Arvisais EW, Jiang C, Chen D-B, Roy SK, Pate JL, Hansen TR, Rueda BR, Davis**  
325 **JS.** Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  Stimulates the Expression and Secretion of Transforming Growth Factor  
326 B1 Via Induction of the Early Growth Response 1 Gene (EGR1) in the Bovine Corpus Luteum.  
327 *Mol Endocrinol*, v.22, n.2, p.403-414, 2008.
- 328 **Ilha GF, Rovani MT, Gasperin BG, Ferreira R, de Macedo MP, Neto OA, Duggavathi R,**  
329 **Bordignon V, Goncalves PB.** Regulation of Anti-Mullerian Hormone and Its Receptor  
330 Expression around Follicle Deviation in Cattle. *Reprod Domest Anim*, v.51, n.2, p.188-94,  
331 2016.
- 332 **Juengel JL.** Growth Differentiation Factor 9 and Bone Morphogenetic Protein 15 Are Essential  
333 for Ovarian Follicular Development in Sheep. *Biol Reprod*, v.67, n.6, p.1777-1789, 2002.

- 334 **Juengel JL, Bodensteiner KJ, Heath DA, Hudson NL, Moeller CL, Smith P, Galloway**  
335 **SM, Davis GH, Sawyer HR, McNatty KP.** Physiology of GDF9 and BMP15 signalling  
336 molecules. *Anim Reprod Sci*, v.82-83, p.447-460, 2004.
- 337 **Juengel JL, Hudson NL, Berg M, Hamel K, Smith P, Lawrence SB, Whiting L, McNatty**  
338 **KP.** Effects of active immunization against growth differentiation factor 9 and/or bone  
339 morphogenetic protein 15 on ovarian function in cattle. *Reproduction*, v.138, n.1, p.107-114,  
340 2009.
- 341 **Kayani AR, Glister C, Knight PG.** Evidence for an inhibitory role of bone morphogenetic  
342 protein(s) in the follicular-luteal transition in cattle. *Reproduction*, v.137, n.1, p.67-78, 2009.
- 343 **Knight PG, Glister C.** TGF- $\beta$  superfamily members and ovarian follicle development.  
344 *Reproduction*, v.132, n.2, p.191-206, 2006.
- 345 **McNatty KP, Heath DA, Hudson NL, Lun S, Juengel JL, Moore LG.** Gonadotrophin-  
346 responsiveness of granulosa cells from bone morphogenetic protein 15 heterozygous mutant  
347 sheep. *Reproduction*, v.138, n.3, p.545-551, 2009.
- 348 **McNatty KP, Juengel JL, Reader KL, Lun S, Myllymaa S, Lawrence SB, Western A,**  
349 **Meerasahib MF, Mottershead DG, Groome NP, Ritvos O, Laitinen MPE.** Bone  
350 morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa  
351 cell function. *Reproduction*, v.129, n.4, p.473-480, 2005.
- 352 **Mulsant P, Lecerf F, Fabre S, Schibler L, Monget P, Lanneluc I, Pisselet C, Riquet J,**  
353 **Monniaux D, Callebaut I, Crihiu E, Thimonier J, Teyssier J, Bodin L, Cognié Y, Chitour**  
354 **N, Elsen J-M.** Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased  
355 ovulation rate in Booroola Mérino ewes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of*  
356 *the United States of America*, v.98, n.9, p.5104-5109, 2001.
- 357 **Myers M, Van Den Driesche S, Mcneilly AS, Duncan WC.** Activin A reduces luteinisation  
358 of human luteinised granulosa cells and has opposing effects to human chorionic gonadotropin

- 359 in vitro. *J Endocrinol*, v.199, n.2, p.201-212, 2008.
- 360 **Nio-Kobayashi J, Trendell J, Giakoumelou S, Boswell L, NICOL L, Kudo M, Sakuragi**  
361 **N, Iwanaga T, Duncan WC.** Bone Morphogenetic Proteins Are Mediators of Luteolysis in the  
362 Human Corpus Luteum. *Endocrinology*, v.156, n.4, p.1494-1503, 2015.
- 363 **O'Connell AR, Mcnatty KP, Hurst PR, Spencer TE, Bazer FW, Reader KL, Johnstone**  
364 **PD, Davis GH, Juengel JL.** Activin A and follistatin during the oestrous cycle and early  
365 pregnancy in ewes. *J Endocrinology*, v.228, n.3, p.193-203, 2016.
- 366 **Patino LC, Walton KL, Mueller TD, Johnson KE, Stocker W, Richani D, Agapiou D,**  
367 **Gilchrist RB, Laissue P, Harrison CA.** BMP15 Mutations Associated With Primary Ovarian  
368 Insufficiency Reduce Expression, Activity, or Synergy With GDF9. *J Clin Endocrinol Metab*,  
369 v.102, n.3, p.1009-1019, 2017.
- 370 **Poole DH, Ocón-Grove OM, Johnson AL.** Anti-Müllerian hormone (AMH) receptor type II  
371 expression and AMH activity in bovine granulosa cells. *Theriogenology*, v.86, n.5, p.1353-  
372 1360, 2016.
- 373 **Rajesh G, PAUL A, Mishra S, Bharati J, Thakur N, Mondal T, Soren S, Harikumar S,**  
374 **Narayanan K, Chouhan V.** Expression and functional role of Bone Morphogenetic Proteins  
375 (BMPs) in cyclical corpus luteum in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Gen Comp Endocrinol*, v.240,  
376 p.198-213, 2017.
- 377 **Selvaraju S, Folger JK, Gupta PSP, Ireland JJ, Smith GW.** Stage-specific expression and  
378 effect of bone morphogenetic protein 2 on bovine granulosa cell estradiol production: regulation  
379 by cocaine and amphetamine regulated transcript. *Domest Anim Endocrinol*, v.44, n.3, p.115-  
380 120, 2013.
- 381 **Souza C, Macdougall C, Campbell B, Mcneilly A, Baird D.** The Booroola (FecB) phenotype  
382 is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPR1B) gene. *J*  
383 *Endocrinol*, v.169, n.2, p.R1-6, 2001.

- 384 **Spicer LJ, Aad PY, Allen D, Mazerbourg S, Hsueh AJ.** Growth differentiation factor-9 has  
385 divergent effects on proliferation and steroidogenesis of bovine granulosa cells. *J Endocrinol*,  
386 v.189, n.2, p.329-39, 2006.
- 387 **Spicer LJ, Aad PY, Allen DT, Mazerbourg S, Payne AH, Hsueh AJ.** Growth Differentiation  
388 Factor 9 (GDF9) Stimulates Proliferation and Inhibits Steroidogenesis by Bovine Theca Cells:  
389 Influence of Follicle Size on Responses to GDF9. *Biol Reprod*, v.78, n.2, p.243-253, 2008.
- 390 **Stangaferro ML, Matiller V, Díaz PU, Ortega HH, Rey F, Rodríguez FM, Silva MA,**  
391 **Salvetti NR.** Role of activin, inhibin, and follistatin in the pathogenesis of bovine cystic ovarian  
392 disease. *Anim Reprod Sci*, v.148, n.3, p.97-108, 2014.
- 393 **Wu Y-T, Chang H-M, Huang H-F, Sheng J-Z, Leung PC.** Bone morphogenetic protein 2  
394 regulates cell–cell communication by down-regulating connexin43 expression in luteinized  
395 human granulosa cells. *Mol Hum Reprod*, v.23, p.155-165, 2017.
- 396 **Yamashita H, Murayama C, Takasugi R, Miyamoto A, Shimizu T.** BMP-4 suppresses  
397 progesterone production by inhibiting histone H3 acetylation of StAR in bovine granulosa cells  
398 in vitro. *Mol Cell Biochem*, v.348, p.1-8, 2010.
- 399 **Zhang H, Klausen C, Zhu H, Chang H-M, LEUNG PCK.** BMP4 and BMP7 suppress StAR  
400 and progesterone production via ALK3 and SMAD1/5/8-SMAD4 in human granulosa-lutein  
401 cells. *Endocrinology*, v.156, n.4269-4280, 2015.
- 402 **Zhao S-Y, Qiao J, Chen Y-J, Liu P, Li J, Yan J.** Expression of growth differentiation factor-  
403 9 and bone morphogenetic protein-15 in oocytes and cumulus granulosa cells of patients with  
404 polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, v.94, n.1, p.261-267, 2010.
- 405
- 406



## 2.2 Artigo 2

### **Transforming growth factor beta-family members regulation during induced luteolysis in cattle**

Cristina Sangoi Haas, Monique Tomazele Rovani, Gustavo Freitas Ilha, Kalyne Bertolin, Juliana Germano Ferst, Alessandra Bridi, Vilceu Bordignon, Raj Duggavathi, Alfredo Quites Antoniazzi, Paulo Bayard Dias Gonçalves, Bernardo Garziera Gasperin

Aceito para publicação na revista Animal Reproduction

**Transforming growth factor-beta family members are regulated during induced  
luteolysis in cattle**

**Running title: TGF members regulation during luteolysis in cattle**

Cristina Sangoi Haas<sup>1</sup>, Monique Tomazele Rovani<sup>1</sup>, Gustavo Freitas Ilha<sup>2</sup>, Kalyne Bertolin<sup>2</sup>,  
Juliana Germano Ferst<sup>2</sup>, Alessandra Bridi<sup>2</sup>, Vilceu Bordignon<sup>3</sup>, Raj Duggavathi<sup>3</sup>, Alfredo  
Quites Antoniazzi<sup>2</sup>, Paulo Bayard Dias Gonçalves<sup>2</sup>, Bernardo Garziera Gasperin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Pathology, Federal University of Pelotas, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratory of Biotechnology and Animal Reproduction - BioRep, Federal University of Santa Maria, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Animal Science, McGill University, Canada.

\*Corresponding author: Bernardo Garziera Gasperin, Federal University of Pelotas, Department of Animal Pathology, Postal code 96010–900, Capão do Leão, RS, Brazil. Email: bbgasperin@gmail.com

**Abstract**

The transforming growth factors beta (TGF $\beta$ ) are local factors produced by ovarian cells which, after binding to their receptors, regulate follicular deviation and ovulation. However, their regulation and function during corpus luteum (CL) regression has been poorly investigated. The present study evaluated the mRNA regulation of some TGF $\beta$  family ligands and their receptors in the bovine CL during induced luteolysis *in vivo*. On day 10 of the estrous cycle, cows received an injection of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  (PGF) and luteal samples were obtained from separate groups of cows (n= 4-5 cows per time-point) at 0, 2, 12, 24 or 48 h after treatment. Since TGF beta family comprises more than 30 ligands, we focused in some candidates genes such as activin receptors (*ACVR-1A*, *-1B*, *-2A*, *-2B*) *AMH*, *AMHR2*, *BMPs* (*BMP-1*, *-2*, *-3*, *-4*, -

6 and -7), BMP receptors (*BMPR-1A*, *-1B* and *-2*), inhibin subunits (*INH-A*, *-BA*, *-BB*) and betaglycan (*TGFBR3*). The mRNA levels of *BMP4*, *BMP6* and *INHBA* were higher at 2 h after PGF administration ( $P < 0.05$ ) in comparison to 0 h. The relative mRNA abundance of *BMP1*, *BMP2*, *BMP3*, *BMP4*, *BMP6*, *ACVR1B*, *INHBA* and *INHBB* was upregulated up to 12 h post PGF ( $P < 0.05$ ). On the other hand, *TGFBR3* mRNA that codes for a reservoir of ligands that bind to TGF-beta receptors, was lower at 48 h. In conclusion, findings from this study demonstrated that genes encoding several TGF $\beta$  family members are expressed in a time-specific manner after PGF administration.

**Keywords:** cattle, luteolysis, corpus luteum.

## 1. Introduction

The corpus luteum (CL) is a transient endocrine gland resulting from the dynamic remodeling of the follicular structure after ovulation. Its main function is to produce and secrete progesterone (P4), which is ceased in the absence of the maternal recognition of pregnancy. In this case, luteolysis initiates, resulting in the functional and structural regression of the CL (Skarzynski and Okuda, 2010). In cattle, PGF is responsible for mediating luteolysis by triggering a complex process of vascular regression, cell death and tissue remodeling (Miyamoto et al., 2009; Skarzynski and Okuda, 2010; Shirasuna et al., 2012). Despite its essential role in reproduction, the cellular and molecular mechanisms mediating CL regression are not fully understood. It is well established that CLs are not fully responsive to PGF until day 5-6 after ovulation, whereas after days 15-17, in the absence of gestation, spontaneous luteolysis occurs. Thus, performing PGF treatment on day 10 after ovulation represents an adequate model to study CL regression, because all the CLs are fully responsive to PGF and still functional.

Previous studies in different species have shown that both ligands and receptors of the superfamily of transforming growth factors beta (TGF $\beta$ ) are produced by follicular cells and

are important for follicular development, cell proliferation, steroidogenesis and ovulation (Knight and Glister, 2006). In addition, there is evidence suggesting their participation in the maintenance and regression of the luteal structure (Knight and Glister, 2006; Nio-Kobayashi et al., 2013). For instance, bovine luteal cells secrete large amounts of TGF $\beta$ 1 and its expression is induced by PGF treatment, both *in vivo* and *in vitro*, via early growth response 1 (EGR1) and MEK1/ERK (Gangrade et al., 1993; Hou et al., 2008). Moreover, upregulation of TGF $\beta$ 1 reduces P4 secretion and antagonizes the actions of cell survival factors, thereby increasing the susceptibility of bovine luteal cells to apoptotic stimuli (Hou et al., 2008).

It has also been demonstrated that some bone morphogenetic proteins (BMPs) and their receptors are more expressed in the CL of women during spontaneous regression, and are negatively regulated by the luteotropic hormone hCG (human chorionic gonadotropin) (Nio-Kobayashi et al., 2015). In contrast to the well-established involvement in folliculogenesis, few studies (Erickson and Shimasaki, 2003; Nio-Kobayashi et al., 2015; Rajesh et al., 2017) have investigated the regulation and function of BMPs during luteinization and luteolysis.

In cattle, several members of the TGF family are expressed in the luteal cells and the *in vitro* treatment of luteinized cells with BMP6 and Activin A decreased the progesterone synthesis stimulated by forskolin (Kayani et al., 2009). However, the regulation of ligands and receptors of the TGF $\beta$  family during luteolysis was not yet investigated. This study aimed to test the hypothesis that the abundance of TGF $\beta$  family members mRNA is regulated in the CL of cattle during PGF-induced luteolysis.

## **2. Materials and methods**

### *2.1 Estrus synchronization and CL samples collection*

All experimental procedures involving animals were approved by the Institutional Committee for Ethics in Animal Research at Federal University of Santa Maria (112/2014). To investigate the regulation of the TGF $\beta$  family members during luteal regression, CL samples

were obtained in different time-points after hormonally induced luteolysis as previously reported (Rovani et al., 2017). Briefly, twenty-five cyclic crossbred *Bos taurus taurus* cows (predominantly Angus), non-pregnant and non-lactating with average body condition score  $\geq 3$  (on a scale of 1 to 5), were submitted to a hormonal protocol to induce follicular regression and the onset of a new follicular wave. On D0, progesterone-releasing intravaginal devices (IVD; 1g P4) were inserted and 2 mg of estradiol benzoate were administered (i.m.). On D7, IVDs were removed and a PGF analogue (500 $\mu$ g cloprostenol) was administered (i.m.). The animals were observed for signs of estrus during five days after PGF treatment and IVD withdrawal. Following ovulation, the presence of a CL was confirmed through transrectal ultrasonography. Ten days after ovulation, 21 cows received (i.m.) 25 mg of the PGF analogue dinoprost tromethamine. The cows were randomly allocated into five groups and ovariectomized immediately before (0 h; n=5), or at 2, 12, 24 or 48 h after PGF treatment (n=4 per time-point). Ovariectomies were performed unilaterally (ovary containing the CL) by colpotomy under caudal epidural anesthesia (Drost et al., 1992). Luteal tissue samples were snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further gene expression analysis. Tissue samples were also fixed in 4% paraformaldehyde (PAF) for histological analysis.

## 2.2 Immunoblot analyses

Luteal tissue samples were fixed in 4% PAF, embedded in paraffin and sectioned (5  $\mu$ m) using a microtome as previously described (Rovani et al. 2017). The slides were stained with haematoxylin-and-eosin and images were acquired using a Leica DM200 microscope equipped with a Leica EC3 camera. Luteal tissue samples were lysed using RIPA buffer (Sigma Aldrich) with phosphatase and protease inhibitors and boiled in Laemmli buffer (BioRad Laboratories) containing DTT (Omnipur) at 95°C for five minutes. Protein samples were resolved in 10% polyacrylamide gel and transferred onto nitrocellulose membranes (BioRad Laboratories). After blocking for 2 h (5% non-fat dried milk in TBS-T), the membranes were

incubated overnight (4°C) with primary antibodies, under agitation. Then, membranes were washed three times (10 min each) with TBS-T and incubated (2 h) with secondary antibodies at RT with agitation. After repeating the washing procedure, proteins were detected with the Immun-Star WesternC Chemiluminescence Kit (BioRad Laboratories) and visualized using a Chemidoc System (BioRad Laboratories). Rabbit anti-EGR1 (sc-110, 1:1000) and goat anti-rabbit-IgG-HRP (sc-2004, 1:10000) antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), and rabbit anti-beta Actin (ab8227, 1:5000) was purchased from Abcam, Inc. (Toronto, ON, Canada). EGR1 protein was quantified to validate the luteolysis model, because it was previously shown that this transcriptional factor is upregulated by PGF (Hou et al., 2008).

### *2.3 RNA extraction, reverse transcription, real time PCR*

Total RNA from luteal samples was extracted using acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction method using Trizol reagent (Invitrogen). Quantification and estimation of RNA purity was performed using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific – Waltham USA; Absorbance 260/280 nm ratio). RNA was treated with 0.1U of DNase Amplification Grade (Invitrogen) for 15 min at 27°C to digest any contaminating DNA, followed by DNase inactivation (65°C for 10 min). Double-stranded complementary DNA (cDNA) was synthesized from total RNA using iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad Laboratories) according to the manufacturer's instructions. Real time semi-quantitative polymerase chain reactions (qPCR) were conducted in a CFX384 thermocycler (BioRad Laboratories) using SYBR Green Supermix iQ (BioRad Laboratories) and specific bovine primers (Table 1).

Serial dilutions of cDNA templates were used to generate a standard curve to optimize the qPCR assays, which was constructed by plotting the log of the starting quantity of the template against the C<sub>q</sub> values obtained. Reactions with a coefficient of determination ( $R^2$ )

>0.98 and efficiency between 95 to 105% were considered optimized. The relative standard curve method was used to determine the abundance of a particular transcript in each sample (Cikos et al., 2007). Samples were run in duplicate and the results expressed relative to the levels of *PPIB*, *GAPDH*, *RPLP0* and/or *RPLP19* as reference genes. The levels of *HSD3B1* mRNA were evaluated to further validate the model, as the enzyme coded by this gene regulates progesterone synthesis, which is acutely downregulated after PGF treatment (Rovani et al. 2017). Dissociation curve analysis, agarose gel electrophoresis and/or PCR product sequencing (ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer; Applied Biosystems) were performed to validate the primers.

#### 2.4 Statistical analysis

Variations in transcript levels between experimental groups were analyzed by one-way ANOVA, with multiple comparisons between groups performed using Tukey test. All continuous variables were tested for normality and normalized when necessary. All statistical analyses were performed using JMP (Version 8.0 SAS Institute Inc.) statistical software. Data are presented as mean  $\pm$  SEM and the significance level at  $P < 0.05$ .

### 3. Results

The levels of EGR1 protein increased (Figure 1A) 2 h after PGF treatment, simultaneously to *HSD3B1* downregulation (Figure 1B), validating the luteolysis model. Histologically, the reduction of cytoplasmic volume observed at 12 h further confirmed CL regression (Figure 1C). *BMP1* mRNA was slightly upregulated in luteal tissue at 12 h when compared to 2 and 48 h (Figure 2A;  $P < 0.05$ ). *BMP2* mRNA levels increased at 12 h (Figure 2B;  $P < 0.05$ ), whereas *BMP3* mRNA was significantly upregulated at 12, 24 and 48 h (Figure 2C;  $P < 0.05$ ) when compared to 2 h. Also, *BMP4* mRNA was upregulated from 2 to 48 h (Figure 2D;  $P < 0.05$ ), whereas an upregulation of *BMP6* mRNA levels was observed at 2 h (Figure 2E;  $P < 0.05$ ). *BMP7* mRNA was not expressed in luteal tissue (data not shown). Regarding BMPs

receptors, no significant changes in expression regulation was observed for *BMPR2* mRNA, whereas *BMPRIA* (Figure 3A) mRNA abundance decreased during CL regression and *BMPR1B* mRNA was slightly downregulated at 48 h compared to 12 h (Figure 3B). The co-receptor *TGFBR3* mRNA abundance was suppressed at 48 h compared to 0 h (Figure 3C).

*INHA* mRNA decreased at 48 h (Figure 3D;  $P < 0.05$ ), but *INHBA* mRNA was upregulated at 2 h and presented a peak at 12 h (Figure 3E;  $P < 0.05$ ). *INHBB* mRNA was also upregulated at 12 h (Figure 3F;  $P < 0.05$ ). *ACVR2A* mRNA was detected during luteal regression and was upregulated at 2 h compared to 24 and 48 h (Figure 3G;  $P < 0.05$ ). *ACVR1A* mRNA was not detected at any stage of luteal regression (data not shown). It was observed increased levels of *ACVR1B* mRNA at 12 h and *ACVR2B* mRNA at 24 h, in comparison to time 0 h and 2 h, respectively (Figure 3H and I;  $P < 0.05$ ). The relative mRNA abundance of *AMH* was higher at 2 h ( $P < 0.05$ ) compared to 24 and 48 h, whereas *AMHR2* was expressed but not regulated during luteolysis (data not shown).

#### 4. Discussion

Although many studies have investigated TGF $\beta$ -family members in the ovary (Knight and Glister, 2006), most of them have focused on their roles in follicle development and not on luteal function. In the present study, the hypothesis that TGF $\beta$ -family members are expressed and regulated in the CL during luteolysis was confirmed. Our main findings were: 1) the mRNA levels of *BMP4*, *BMP6* and *INHBA* were higher at 2 h after PGF administration in comparison to 0 h, indicating that these factors are acutely regulated during luteolysis; 2) The relative mRNA abundance of *BMP1*, *BMP2*, *BMP3*, *BMP4*, *BMP6*, *ACVR1B*, *INHBA* and *INHBB* was upregulated up to 12 h post PGF, indicating an involvement in functional luteolysis. It is important to highlight that, although it has been shown that some TGF ligands and receptors are expressed in bovine luteal cells and regulate progesterone synthesis *in vitro* (Kayani et al., 2009), this is the first study to evaluate their mRNA expression and regulation after PGF-



induced luteolysis using a well-controlled and validated *in vivo* model (Neuvians et al., 2004; Shirasuna et al., 2010; Shirasuna et al., 2012; Berisha et al., 2013; Rovani et al., 2017).

The increase in EGR1 protein induced by PGF (Hou et al., 2008) and the *HSD3B1* downregulation, contemporaneous to the decrease in systemic progesterone levels, as previously reported in our study that validated the model (Rovani et al. 2017), confirmed the occurrence of functional luteolysis.

One of the pioneer studies on TGF $\beta$  members role in luteal cells revealed that TGF $\beta$ 1 facilitates luteal regression by disrupting the angiogenic potential of bovine microvascular endothelial cells (Maroni and Davis, 2011). TGF $\beta$ 1 seems to promote vascular instability, apoptosis and matrix remodeling during luteolysis in cattle (Farberov and Meidan, 2015). In this context, we speculated that BMP1, which does not belong to TGF beta family but is a known regulator of TGF $\beta$ 1, BMP2 and BMP4 signaling (Ge and Greenspan, 2006; Jasuja et al., 2007), may act during luteal remodeling. BMP1 also has metalloproteinase activity and is involved in extracellular matrix remodeling during follicular growth in sheep (Canty-Laird et al., 2010). However, *BMP1* was slightly upregulated in luteal samples at 12 h, indicating a minor involvement in CL regression.

Previous studies have suggested that BMP2 plays an inhibitory role on progesterone synthesis and our data have shown an upregulation of *BMP2* at 12 h after induced luteolysis. Increased *BMP2* levels has been associated with luteal regression in rats (Erickson and Shimasaki, 2003) and in humans, whereas the luteotropic factor hCG inhibits *BMP2* increase in the regressing CL in humans (Nio-Kobayashi et al., 2015). Therefore, BMP2 inhibits the effect of hCG in human luteal cells, inhibiting luteinization by suppressing the expression of LH receptor (Shi et al., 2011). Furthermore, it was previously demonstrated that *BMP2* abundance was increased in bovine corpora lutea with impaired P4 production (Gregson et al., 2016).

The upregulation of *BMP6* mRNA levels observed at 2 h after PGF in the present study is in line with previous observations during CL regression in humans (Nio-Kobayashi et al., 2015). In bovine theca-lutein cells, *BMP6* downregulates *STAR* reducing forskolin-stimulated progesterone secretion *in vitro* (Kayani et al., 2009). Collectively, the expression of both *BMP2* and *BMP6* support the role of these TGF $\beta$  members as luteolytic mediators.

The significant upregulation of *BMP3* at 12, 24 and 48 h post PGF suggests its involvement in later processes of luteal regression. Although the role of *BMP3* in ovarian physiology is yet unknown, its expression is negatively regulated in human luteinized granulosa cells after hCG treatment *in vitro* (Jaatinen et al., 1996), suggesting its involvement in progesterone secretion regulation.

Unlike *BMP1* and *BMP3*, other TGF $\beta$ -family members, such as *BMP4* and *BMP7*, have been more extensively investigated in the CL. The upregulation in the *BMP4* mRNA from 2 to 48 h after PGF treatment observed in our study strengthens the hypothesis that *BMP4* is a negative regulator of progesterone synthesis in cattle. As shown in bovine granulosa cells *in vitro*, *BMP4* and *BMP7* suppress progesterone secretion (Glister et al., 2004) through inhibition of *STAR* (Yamashita et al., 2010). The same ligands act as inhibitors of human granulosa cells luteinization before and after ovulation via the *ALK3* receptor pathway, activating *SMAD1/5/8-SMAD4* (Zhang et al., 2015). However, mRNA for *BMP7*, which inhibits ovulation and progesterone synthesis in rats (Lee et al., 2001), was undetectable in our study. It is unlikely that *BMP7* is involved in luteolysis because, to our knowledge, there is only one report of greater *BMP7* expression in the early stages of CL in buffalo (Rajesh et al., 2017) and the same authors demonstrated a positive effect of *BMP7* on P4 secretion and mRNA expression of steroidogenic enzymes and pro-survival factors.

As previously demonstrated in bovine luteal cells (Kayani et al., 2009), all the BMPRs evaluated in the present study were expressed in the bovine CL during luteolysis. No significant

regulation was observed for *BMPR2*. However, *BMPRIA* and *TGFBR3* were downregulated during CL regression, whereas *BMPR1B* was only slightly downregulated. The higher levels of *BMPR1B* observed during CL regression in rats suggests its implication in luteal degradation (Erickson and Shimasaki, 2003). In disagreement with this hypothesis, *BMPRIA*, *BMPR1B* and *BMPR2* mRNAs were positively regulated during the intermediate luteal phase in buffaloes (between days 5 and 10), compared to other luteal stages (Rajesh et al., 2017). Unlike BMPRs, *TGFBR3* (betaglycan) does not participate in BMPs signaling directly, being considered a reservoir of ligands. The level of *TGFBR3* is upregulated by luteotrophic factors such as LH and prostaglandin E2 (PGE2), being associated to increased progesterone production in human granulosa-luteal cells (Liu et al., 2003). The pattern of expression observed in the present study also revealed that *TGFBR3* is more expressed in the functional CL.

Inhibins are regulated by endocrine and local factors, such as the activation of BMP, activins and TGF signaling pathways (Jaatinen et al., 2002). *INHBA* was upregulated at 2 h, and further increased at 12 h, when *INHBB* was also upregulated. In agreement with our findings, bovine luteal cells with low progesterone-synthesizing capacity express higher levels of *INHBB* and *INHBA* compared to those producing high P4 levels (Gregson et al., 2016). Nonetheless, *INHA* presented a distinct expression pattern, decreasing at 48 h. Inhibin subunits are also differentially regulated in human follicular fluid throughout the menstrual cycle (Groome et al., 1996). In luteinized human cells, activin A, BMP4, BMP6 and BMP2 treatment stimulated the expression of inhibin  $\beta$ B subunit (*INHBB*) (Nio-Kobayashi et al., 2015), which stimulates the production of inhibin B, suggesting it has a potential role as a BMP mediator during luteal regression (Jaatinen et al., 2002).

Based on our results it seems that, during luteolysis, the synthesis of activins is more likely than inhibins, since activins are composed by two inhibin beta subunits, which were upregulated after PGF treatment. In fact, it was previously suggested that activin A is involved

in the luteolytic process by regulating tissue remodeling by matrix metalloproteinase-2 (MMP2), and its activity is inhibited in human CL during maternal recognition of pregnancy (Myers et al., 2007). Furthermore, activin A inhibits progesterone synthesis (Kayani et al., 2009) by impairing *STAR* mRNA levels, as shown in human luteinized cells *in vitro* (Shi et al., 2010). In sheep, activin A reduced the luteinization of granulosa cells *in vitro* and increased plasma levels were associated with low embryo survival rate (O'Connell et al., 2016).

Regarding activin receptors, *ACVR2A*, but not *ACVR1A*, was expressed during luteal regression. *ACVR2A* was upregulated at 2 h post PGF treatment when progesterone levels acutely decrease (Rovani et al., 2017) due to downregulation of steroidogenic enzymes such as *HSD3B1* and *STAR*. *ACVR1B* and *ACVR2B* were also upregulated at 12 h and 24 h, respectively, compared to earlier time-points in the luteolytic process. Although the expression of ACVRs was previously shown in cattle (Kayani et al., 2009) and caprine (Silva et al., 2004) CL, none of the previous studies had investigated activin receptors expression throughout luteolysis.

The anti-müllerian hormone (AMH), a marker of the ovarian reserve, plays a negative role in follicle progression by reducing follicular ability to respond to FSH (Knight and Glister, 2006). The regulation of *AMH* and its receptor in bovine luteal tissue had not yet been investigated and the expression of both *AMH* and *AMHR2* in the CL tissue was unexpected. To the best of our knowledge there is only a recent report of *AMH* mRNA and protein expression in swine CL (Almeida et al., 2018), whereas *AMHR2* was not evaluated in that study. Although in our study the upregulation of *AMH* at 2 h compared to 12, 24 and 48 h post PGF suggests an involvement in functional luteolysis, further studies are necessary to understand the function of *AMH* during CL regression. In bovine granulosa cells, *BMP4* and *BMP6* stimulate *AMH* secretion (Rico et al., 2011), and the pattern of their expression in the present study also suggests an association among these factors.

## 5. Conclusions

Members of the TGF $\beta$  superfamily are expressed in the corpus luteum in a time-specific manner after PGF administration in cattle. Collectively, the increase in the mRNA abundance of *BMP1*, *BMP2*, *BMP3*, *BMP4*, *BMP6*, *ACVR1B*, *INHBA* and *INHBB* seen early in the luteolytic process (from 0 to 12h) suggests their involvement in functional luteolysis. Further studies elucidating the role of these local factors in ovarian physiology will contribute to the understanding of pathological reproductive processes in different species, and to improve assisted reproductive technologies.

## 6. Acknowledgments

This study was funded by the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Research Support Foundation of Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Coordination for the Improvement of the Higher Education Personnel (CAPES - Finance Code 001). C. S. Haas was the recipient of a scholarship CAPES. B.G. Gasperin received a Productivity Fellowship from the CNPq (309138/2017-5).

## 7. Conflict of Interest Statement

None of the authors have any conflict of interest to declare.

## 8. References

- Almeida F, Costermans NGJ, Soede NM, Bunschoten A, Keijer J, Kemp B, Teerds KJ.** 2018. Presence of anti-Mullerian hormone (AMH) during follicular development in the porcine ovary. *PloS one*, 13:e0197894.
- Berisha B, Schilffarth S, Kenngott R, Sinowatz F, Meyer HH, Schams D.** 2013. Expression of lymphangiogenic vascular endothelial growth factor family members in bovine corpus luteum. *Anatomia, histologia, embryologia*, 42:292-303.
- Canty-Laird E, Carré G-A, Mandon-Pépin B, Kadler KE, Fabre S.** 2010. First Evidence

of Bone Morphogenetic Protein 1 Expression and Activity in Sheep Ovarian Follicles.

*Biology of Reproduction*, 83:138-146.

**Cikos S, Bukovska A, Koppel J.** 2007. Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *Bmc Mol Biol*, 8:113.

**Drost M, Savio JD, Barros CM, Badinga L, Thatcher WW.** 1992. Ovariectomy by colpotomy in cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 200:337-339.

**Erickson GF, Shimasaki S.** 2003. The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. *Reproductive biology and endocrinology*, 1:9-9.

**Farberov S, Meidan R.** 2015. Thrombospondin-1 affects bovine luteal function via transforming growth factor-beta1-dependent and independent actions. *Biology of reproduction*, 94:1-9.

**Gangrade BK, Gotcher ED, Davis JS, May JV.** 1993. The secretion of transforming growth factor-beta by bovine luteal cells in vitro. *Molecular and cellular endocrinology*, 93:117-123.

**Gasperin BG, Ferreira R, Rovani MT, Bordignon V, Duggavathi R, Buratini J, Oliveira JF, Goncalves PB.** 2014. Expression of receptors for BMP15 is differentially regulated in dominant and subordinate follicles during follicle deviation in cattle. *Animal reproduction science*, 144:72-78.

**Ge G, Greenspan DS.** 2006. BMP1 controls TGFbeta1 activation via cleavage of latent TGFbeta-binding protein. *The Journal of cell biology*, 175:111-120.

**Glister C, Kemp CF, Knight PG.** 2004. 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*, 127:239-254.

**Gregson E, Webb R, Sheldrick EL, Campbell BK, Mann GE, Liddell S, Sinclair KD.** 2016. Molecular determinants of a competent bovine corpus luteum: first-vs final-wave

dominant follicles. *Reproduction*, 151:563-575.

**Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Pai R, Rodger FE, Mather JP, McNeilly AS.**

1996. Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 81:1401-1405.

**Hayashi K-G, Ushizawa K, Hosoe M, Takahashi T.** 2010. Differential genome-wide gene

expression profiling of bovine largest and second-largest follicles: identification of genes

associated with growth of dominant follicles. *Reproductive biology and endocrinology :*

*RB&E*, 8:11-11.

**Hou X, Arvisais EW, Jiang C, Chen D-b, Roy SK, Pate JL, Hansen TR, Rueda BR,**

**Davis JS.** 2008. Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  Stimulates the Expression and Secretion of Transforming

Growth Factor B1 Via Induction of the Early Growth Response 1 Gene (EGR1) in the Bovine

Corpus Luteum. *Molecular Endocrinology*, 22:403-414.

**Ilha GF, Rovani MT, Gasperin BG, Ferreira R, de Macedo MP, Neto OA, Duggavathi**

**R, Bordignon V, Goncalves PB.** 2016. Regulation of Anti-Mullerian Hormone and Its

Receptor Expression around Follicle Deviation in Cattle. *Reproduction in domestic animals =*

*Zuchthygiene*, 51:188-194.

**Jaatinen R, Bondestam J, Raivio T, Hildén K, Dunkel L, Groome N, Ritvos O.** 2002.

Activation of the Bone Morphogenetic Protein Signaling Pathway Induces Inhibin  $\beta$ B-Subunit

mRNA and Secreted Inhibin B Levels in Cultured Human Granulosa-Luteal Cells. *The*

*Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87:1254-1261.

**Jaatinen R, Rosen V, Tuuri T, Ritvos O.** 1996. Identification of ovarian granulosa cells as a

novel site of expression for bone morphogenetic protein-3 (BMP-3/osteogenin) and regulation

of BMP-3 messenger ribonucleic acids by chorionic gonadotropin in cultured human

granulosa-luteal cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 81:3877-3882.

**Jasuja R, Ge G, Voss NG, Lyman-Gingerich J, Branam AM, Pegleri FJ, Greenspan DS.**

2007. Bone morphogenetic protein 1 prodomain specifically binds and regulates signaling by bone morphogenetic proteins 2 and 4. *The Journal of biological chemistry*, 282:9053-9062.
- Kayani AR, Glister C, Knight PG.** 2009. Evidence for an inhibitory role of bone morphogenetic protein(s) in the follicular-luteal transition in cattle. *Reproduction*, 137:67-78.
- Knight PG, Glister C.** 2006. TGF- $\beta$  superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*, 132:191-206.
- Lee W-S, Otsuka F, Moore RK, Shimasaki S.** 2001. Effect of Bone Morphogenetic Protein-7 on Folliculogenesis and Ovulation in the Rat. *Biology of Reproduction*, 65:994-999.
- Liu J, Kuulasmaa T, Kosma VM, Butzow R, Vanttinen T, Hyden-Granskog C, Voutilainen R.** 2003. Expression of betaglycan, an inhibin coreceptor, in normal human ovaries and ovarian sex cord-stromal tumors and its regulation in cultured human granulosa-luteal cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 88:5002-5008.
- Maroni D, Davis JS.** 2011. TGFB1 disrupts the angiogenic potential of microvascular endothelial cells of the corpus luteum. *Journal of Cell Science*, 124:2501-2510.
- Miyamoto A, Shirasuna K, Sasahara K.** 2009. Local regulation of corpus luteum development and regression in the cow: Impact of angiogenic and vasoactive factors. *Domestic animal endocrinology*, 37:159-169.
- Myers M, Gay E, McNeilly AS, Fraser HM, Duncan WC.** 2007. In vitro evidence suggests activin-A may promote tissue remodeling associated with human luteolysis. *Endocrinology*, 148:3730-3739.
- Neuvians TP, Schams D, Berisha B, Pfaffl MW.** 2004. Involvement of pro-inflammatory cytokines, mediators of inflammation, and basic fibroblast growth factor in prostaglandin F2 $\alpha$ -induced luteolysis in bovine corpus luteum. *Biol Reprod*, 70:473-480.
- Nio-Kobayashi J, Narayanan R, Giakoumelou S, Boswell L, Hogg K, Duncan WC.** 2013. Expression and localization of inhibitor of differentiation (ID) proteins during tissue and



vascular remodelling in the human corpus luteum. *Molecular Human Reproduction*, 19:82-92.

**Nio-Kobayashi J, Trendell J, Giakoumelou S, Boswell L, Nicol L, Kudo M, Sakuragi N, Iwanaga T, Duncan WC.** 2015. Bone Morphogenetic Proteins Are Mediators of Luteolysis in the Human Corpus Luteum. *Endocrinology*, 156:1494-1503.

**O'Connell AR, McNatty KP, Hurst PR, Spencer TE, Bazer FW, Reader KL, Johnstone PD, Davis GH, Juengel JL.** 2016. Activin A and follistatin during the oestrous cycle and early pregnancy in ewes. *Journal of Endocrinology*, 228:193-203.

**Orisaka M, Tajima K, Mizutani T, Miyamoto K, Tsang BK, Fukuda S, Yoshida Y, Kotsuji F.** 2006. Granulosa Cells Promote Differentiation of Cortical Stromal Cells into Theca Cells in the Bovine Ovary<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, 75:734-740.

**Rajesh G, Paul A, Mishra S, Bharati J, Thakur N, Mondal T, Soren S, Harikumar S, Narayanan K, Chouhan V.** 2017. Expression and functional role of Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) in cyclical corpus luteum in buffalo (*Bubalus bubalis*). *General and Comparative Endocrinology*, 240:198-213.

**Rico C, Médigue C, Fabre S, Jarrier P, Bontoux M, Clément F, Monniaux D.** 2011. Regulation of Anti-Müllerian Hormone Production in the Cow: A Multiscale Study at Endocrine, Ovarian, Follicular, and Granulosa Cell Levels. *Biology of Reproduction*, 84:560-571.

**Rovani MT, Ilha GF, Gasperin BG, Nobrega JE, Jr., Siddappa D, Glanzner WG, Antoniazzi AQ, Bordignon V, Duggavathi R, Goncalves PBD.** 2017. Prostaglandin F<sub>2</sub>α-induced luteolysis involves activation of Signal transducer and activator of transcription 3 and inhibition of AKT signaling in cattle. *Molecular reproduction and development*, 84:486-494.

**Shi F-T, Cheung AP, Klausen C, Huang H-F, Leung PC.** 2010. Growth differentiation factor 9 reverses activin A suppression of steroidogenic acute regulatory protein expression

and progesterone production in human granulosa-lutein cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 95:E172-E180.

**Shi J, Yoshino O, Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Nose E, Nishii O, Yano T, Taketani Y.**

2011. Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) Increases Gene Expression of FSH Receptor and Aromatase and Decreases Gene Expression of LH Receptor and StAR in Human Granulosa Cells. *American Journal of Reproductive Immunology*, 65:421-427.

**Shirasuna K, Nitta A, Sineenard J, Shimizu T, Bollwein H, Miyamoto A.** 2012. Vascular and immune regulation of corpus luteum development, maintenance, and regression in the cow. *Domestic animal endocrinology*, 43:198-211.

**Shirasuna K, Sasahara K, Matsui M, Shimizu T, Miyamoto A.** 2010. Prostaglandin F2alpha differentially affects mRNA expression relating to angiogenesis, vasoactivation and prostaglandins in the early and mid corpus luteum in the cow. *The Journal of reproduction and development*, 56:428-436.

**Silva JRV, van den Hurk R, van Tol HTA, Roelen BAJ, Figueiredo JR.** 2004. Gene expression and protein localisation for activin-A, follistatin and activin receptors in goat ovaries. *Journal of Endocrinology*, 183:405-415.

**Skarzynski DJ, Okuda K.** 2010. Inter- and intra-cellular mechanisms of prostaglandin F2alpha action during corpus luteum regression in cattle. *Society of Reproduction and Fertility supplement*, 67:305-324.

**Yamashita H, Murayama C, Takasugi R, Miyamoto A, Shimizu T.** 2010. BMP-4 suppresses progesterone production by inhibiting histone H3 acetylation of StAR in bovine granulosa cells in vitro. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 348:1-8.

**Zhang H, Klausen C, Zhu H, Chang H-M, Leung PCK.** 2015. BMP4 and BMP7 suppress StAR and progesterone production via ALK3 and SMAD1/5/8-SMAD4 in human granulosa-lutein cells. *Endocrinology*, 156:4269-4280.

**Table 1:** Sequences of primers used for quantitative PCR.

Gene	Forward sequence	Reverse sequence	Reference
<i>ACVR1A</i>	CATGGCCCCGAAAGTTCTTG ATGA	GCCACCTCCCACAAGACAAGT CCAAA	(Kayani et al., 2009)
<i>ACVR1B</i>	CATCAGCGTGTCTATCACAAC CGCC	CACTGTGCGCTGGACAAAAAG GG	(Kayani et al., 2009)
<i>ACVR2A</i>	GCCACAAACCCGCCATATCTC ACA	TGCCAGCCTCAAACCTTTAACGC CAA	(Kayani et al., 2009)
<i>ACVR2B</i>	ACAAGCCATCTATTGCCACA GGGA	CTCAAACCGAACAGCCAGGCC AAA	(Kayani et al., 2009)
<i>AMH</i>	ACACCGGCAAGCTCCTCAT	CACCATGTTTGGGACGTGG	(Hayashi et al., 2010)
<i>AMHR2</i>	AGGGCTCCCTGTGCCACTA	GATCTCGGTGGGCGATACCT	(Ilha et al., 2016)
<i>BMP1</i>	GGCACGCAAGCTCTACAAGT G	GTGGGCAGAGTAGCCATTGG	XM_002689771. 1
<i>BMP2</i>	CCAAGAGGCATGTGCGGATT AGCA	TCCTTTCCCATCGTGGCCAAA AGT	(Kayani et al., 2009)
<i>BMP3</i>	TCTCTGCGTGGATCCTCAAAT	AGCCAGGACACAAAGTCTCG AT	NM_001192268. 1
<i>BMP4</i>	TTTATGAGGTTATGAAGCCCC CGGC	AGTTTCCCACCGCGTCACATT GTG	(Kayani et al., 2009)
<i>BMP6</i>	GGCCCCGTTAACTCGACTGTG ACAAA	TTGAGGACGCCGAACAAAAC AGGA	(Kayani et al., 2009)
<i>BMP7</i>	TGCAAGATAGCCACTTCCTCA CCGA	GGGATCTTGGAGAGATCAAAC CGGA	(Kayani et al., 2009)
<i>BMPR1A</i>	TGGATTGCCCTTACTGGTTCA GCGA	CCACGCCATTTACCCATCCACA	(Kayani et al., 2009)
<i>BMPR1B</i>	AAAGTGGCGTGGCGAAAAGG TAGCT	CCCGTCCCTTTGATATCTGCAG CAA	(Kayani et al., 2009)
<i>BMPR2</i>	CCACTGGCCTCACTCCAAGT	CCCGACTGGCTGTGAAACAT	(Gasperin et al., 2014)
<i>GAPDH</i>	GATTGTCAGCAATGCCTCCT	GGTCATAAGTCCCTCCACGA	(Gasperin et al., 2014)
<i>HSD3B1</i>	GCCCAACTCCTACAGGGAGA T	TTCAGAGCCCACCCATTAGCT	(Orisaka et al., 2006)
<i>INHA</i>	CTCCCAGGCCATCCTTTTTC	TGGCTGGAACACATACGTGAA	NM_174094.4
<i>INHBA</i>	CCAGGAAGACGCTGCACTTT	TTGGCCTTGGGAACCTTCAG	NM_174363.2
<i>INHBB</i>	GGGAGGACCAACCTGTGTTG	CCCTCGCAGTAGTTCATAGT	NM_176852.2
<i>RPLP0</i>	GGCGACCTGGAAGTCCAAC	CCATCAGCACCACAGCCTTC	(Rovani et al., 2017)
<i>RPLP19</i>	GCCAACTCCCGTCAGCAGA	TGGCTGTACCCTTCCGCTT	(Rovani et al., 2017)
<i>PPIB</i>	GGTCATCGGTCTCTTTGGAA	TCCTTGATCACACGATGGAA	(Rovani et al., 2017)
<i>TGFBR3</i>	GCTCACGCTGTGTACAAAA AG	CCAGATCATTGAGGCATCCA	XM_001253071. 2

## Figure legends

**Figure 1:** EGR1 protein levels (A) and relative *HSD3B1* mRNA (B) abundance in bovine corpora lutea collected *in vivo* at 0 (n=5), 2 (n=4), 12 (n=4), 24 (n=4) or 48 (n=4) h after PGF administration. Panel C shows histological examination of the CL at 0 and 12 h after PGF treatment confirming CL regression. Different letters indicate significant differences among time-points ( $P<0.05$ ).

**Figure 2:** Relative mRNA expression of *BMP1* (A), *BMP2* (B), *BMP3* (C), *BMP4* (D), *BMP6* (E) in bovine corpora lutea collected *in vivo* at 0 (n=5), 2 (n=4), 12 (n=4), 24 (n=4) or 48 (n=4) h after PGF administration. Different letters indicate significant differences among time-points ( $P<0.05$ ).

**Figure 3:** Relative mRNA expression of *BMPRIA* (A) e *BMPR1B* (B), *TGFBR3* (C), *INHA* (D), *INHBA* (E), *INHBB* (F), *ACVR2A* (G), *ACVR1B* (H) e *ACVR2B* (I) in bovine corpora lutea collected *in vivo* at 0 (n=5), 2 (n=4), 12 (n=4), 24 (n=4) or 48 (n=4) h after PGF administration. Different letters indicate significant differences among time-points ( $P<0.05$ ).

Figure 1

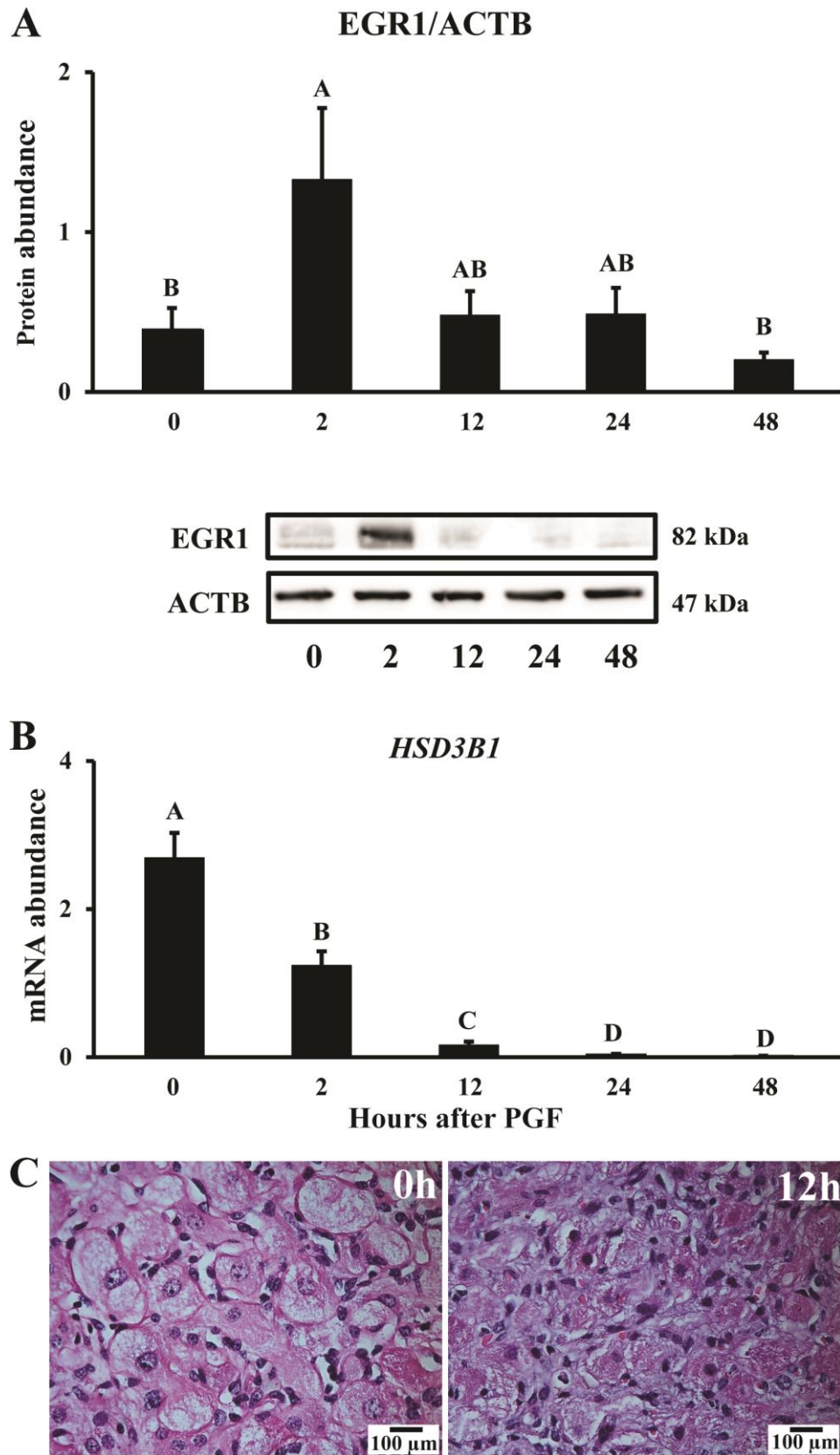


Figure 2

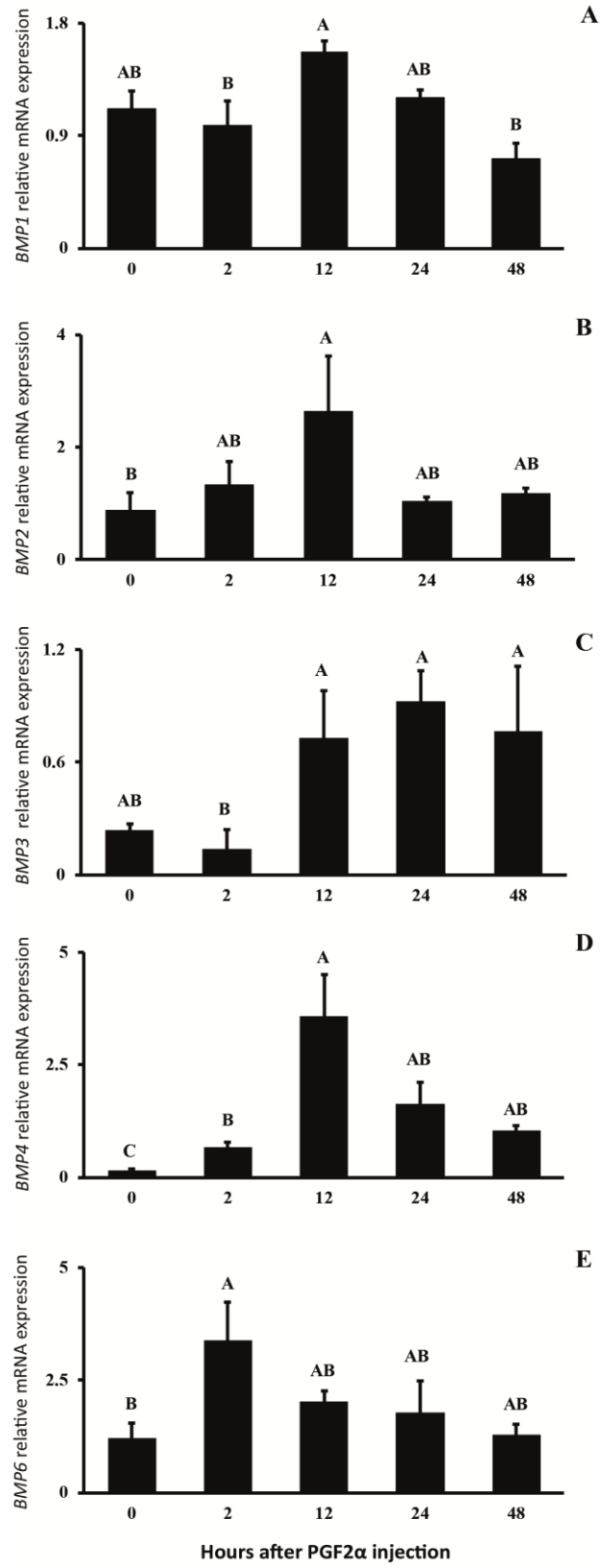
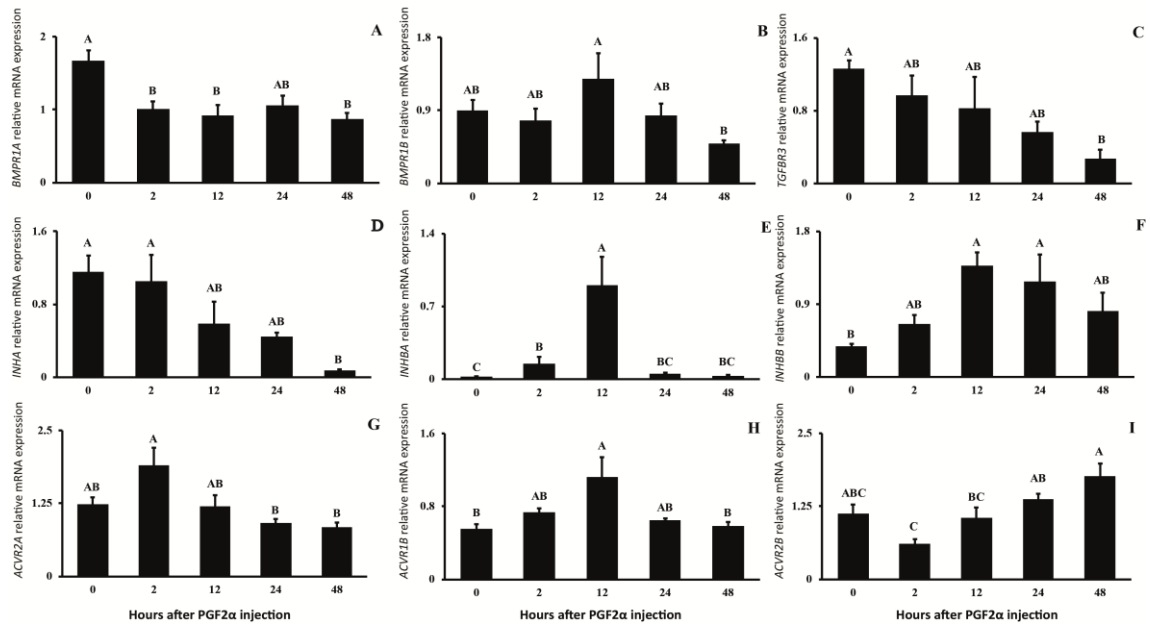


Figure 3



## 2.3 Artigo 3

### **Função da proteína morfogenética óssea 15 no crescimento folicular final e ovulação em bovinos**

Cristina S. Haas, Fernando C. Oliveira, Monique T. Rovani, Arnaldo D. Vieira, Paulo B. D. Gonçalves, Raj Duggavathi, Vilceu Bordignon, Gustavo O. Zamberlam, Rogério Ferreira, Bernardo G. Gasperin

Submetido à revista Theriogenology



## **Função da proteína morfogenética óssea 15 no crescimento folicular final e ovulação em bovinos**

Cristina S. Haas<sup>a</sup>, Fernando C. Oliveira<sup>a</sup>, Monique T. Rovani<sup>b</sup>, Arnaldo D. Vieira<sup>a</sup>, Paulo B. D. Gonçalves<sup>c</sup>, Raj Duggavathi<sup>d</sup>, Vilceu Bordignon<sup>d</sup>, Gustavo O. Zamberlam<sup>e</sup>, Rogério Ferreira<sup>f</sup>, Bernardo G. Gasperin<sup>a</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

<sup>b</sup>Instituto Federal Farroupilha, Campus Frederico Westphalen, RS, Brasil.

<sup>c</sup>BioRep, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>d</sup>Department of Animal Science, McGill University, Sainte Anne de Bellevue QC, Canada.

<sup>e</sup>Département de biomédecine, Université de Montréal, QC, Canada.

<sup>f</sup>Departamento de Ciências Animais, Universidade do Estado de Santa Catarina, Chapecó, SC, Brasil

### **RESUMO**

A proteína morfogenética óssea 15 (BMP15) oocitária é uma das principais reguladoras locais da fisiologia ovariana, embora suas funções ainda não estejam completamente estabelecidas. O objetivo deste estudo foi determinar o efeito do tratamento com BMP15 intrafolicular sobre o crescimento folicular final e ovulação e luteinização. No experimento 1, para avaliar a função na ovulação e luteinização, foi realizada a injeção intrafolicular (IIF) em folículos pré-ovulatórios (12 a 14 mm) com PBS (controle; n=4) ou 500 ng/mL de BMP15 recombinante humana (BMP15rh; n=6), e aplicação i.m. de análogo de GnRH (acetato de buserelina; 21 µg) em ambos os grupos, imediatamente após a IIF, para induzir a ovulação. No experimento 2, para investigar o efeito sobre o crescimento folicular, foi realizada a IIF em folículos dominantes (7,5 a 9,5 mm) com PBS (controle; n=3) ou BMP15rh (n=5; 100 ng/mL). Em um

cultivo de células da granulosa bovina, foi avaliado o efeito do tratamento com as gonadotrofinas FSH ou LH sobre os níveis de RNAm dos receptores de BMP15, *BMPR2* e *BMPR1B*. No experimento 1, folículos do grupo controle tiveram a ovulação confirmada por ultrassonografia. Entretanto, folículos tratados com BMP15 não ovularam e deram origem a estruturas císticas que atingiram diâmetro médio de 32 mm (D12), com paredes espessas, caracterizando cistos luteinizados. Dosagens de P4 sérica confirmaram que, apesar da BMP15 bloquear a ovulação, não inibiu a luteinização, sendo observados valores de P4 de  $7,1 \pm 1,7$  e  $4,1 \pm 1,2$  ng/mL nos grupos controle e BMP15, respectivamente. No experimento 2, observou-se uma tendência ( $P=0,09$ ) de efeito de redução sobre o crescimento folicular, sendo observado diâmetro de  $8,9 \pm 0,9$  (D0; momento da IIF) e  $14 \pm 2$  mm (D2; dois dias após a IIF), no grupo controle, e  $8,4 \pm 0,3$  (D0) e  $9,1 \pm 1,4$  mm (D2) nas vacas do grupo BMP15. Os folículos tratados com BMP15 apresentaram paredes espessas ao exame ultrassonográfico (D2). A expressão de RNAm de *BMPR2* e *BMPR1B* não foi alterada no cultivo *in vitro* de células da granulosa pelo tratamento com LH ou FSH. Conclui-se que o tratamento com BMP15 inibe o desenvolvimento folicular e ovulação, induzindo à luteinização e formação de cistos em bovinos.

**Palavras-chave:** cistos; foliculogênese; luteinização.

## 1 | INTRODUÇÃO

Nos mamíferos, o controle endócrino da foliculogênese, diferenciação folicular, ovulação e luteinização é bem estabelecido. Entretanto, considerando que todos os folículos de uma onda estão sob influência dos mesmos hormônios endócrinos, a seleção folicular e consequente taxa de ovulação são determinadas em grande parte pela interação dos com fatores autócrinos e parácrinos produzidos localmente [1]. Neste contexto, os fatores produzidos pelos oócitos e demais células foliculares desempenham papéis importantes na regulação das funções ovarianas participando dos processos de crescimento, diferenciação folicular [2-4],

esteroidogênese, ovulação e luteogênese [1, 5], sendo cruciais também no processo de seleção folicular [6].

Entre os fatores produzidos pelos oócitos destacam-se a proteína morfogenética óssea 15 (BMP15) e o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF9), membros da superfamília dos fatores de crescimento transformantes beta (TGF $\beta$ ) [1]. Estudos funcionais demonstraram o papel fisiológico dessas proteínas oocitárias em diversos aspectos das funções ovarianas, desde o desenvolvimento do folículo até a esteroidogênese, comunicação celular, maturação do oócito, ovulação e função lútea [7]. A BMP15 e o GDF9, além de serem determinantes do número de folículos ovulatórios [8, 9], também são consideradas indispensáveis para o desenvolvimento ovariano, uma vez que a ausência de proteína funcional, resulta em infertilidade [10].

Mutações no gene da BMP15 foram associadas com diferentes fenótipos ovarianos. Dependendo da espécie, as mutações estão associadas a importantes alterações como esterilidade ou, paradoxalmente, aumento da prolificidade em ovinos [8, 9] e subfertilidade em camundongas [11]. Em mulheres, mutações espontâneas já foram associadas à infertilidade por insuficiência ovariana primária (POI) precoce, síndrome do ovário policístico (SOP) [7] e, por outro lado, maior probabilidade de gêmeos dizigóticos [12]. Portanto, entender como as proteínas BMP15 e GDF9 influenciam a reprodução feminina tem despertado grande interesse científico, sendo que espécies monovulatórias e poliovulatórias podem diferir significativamente quanto à função destas proteínas.

De modo similar ao observado nos casos de mutações em heterozigose, a diminuição da disponibilidade das proteínas através de imunização em ovelhas alterou a taxa ovulatória sem efeitos negativos sobre a reprodução [13], enquanto que a imunização passiva contra GDF9 ou BMP15 afetou negativamente a ovulação, função luteal e síntese de progesterona [9]. Da mesma forma, a imunização com BMP15 em éguas ocasiona uma alteração na função ovariana,

prejudicando a ovulação [14]. Em camundongas a imunização contra BMP15 e GDF9 também produziu ninhadas menores, devido à redução na taxa de ovulação e função luteal [15]. Especificamente em vacas, a imunização contra essas proteínas causou superovulação ou aciclia [16]. Sendo assim, sugere-se a possibilidade de utilizar essa ferramenta para aumentar a taxa ovulatória ou impedir a ovulação através do bloqueio da atividade da BMP15.

Quanto às funções, o GDF9 e a BMP15 parecem regular principalmente a diferenciação folicular, estimulando a proliferação celular e inibindo a esteroidogênese [17, 18]. Em células da granulosa humana, a BMP15 diminui os níveis e expressão de *StAR* e a produção de progesterona, sugerindo um papel na inibição da luteinização prematura [2, 17]. A desregulação ou mutações no sistema BMP e seus receptores podem levar a várias patologias e infertilidade, por afetar a sinalização intracelular e influenciar a ovulação e função lútea [7]. Também há evidências do envolvimento de membros da superfamília TGF $\beta$  no remodelamento da matriz extracelular e regulação da esteroidogênese ovariana. A redução da expressão de *Gdf9* e *Bmp15* antes da ovulação em camundongas sugere que o oócito interfere na remodelação e organização da matriz extracelular para facilitar o processo ovulatório [19].

As informações obtidas sobre as funções das proteínas oocitárias na foliculogênese antral em ruminantes foram obtidas em modelos *in vitro*, através de mutações espontâneas em ovinos, ou imunização contra BMP15 e/ou GDF9. Nos estudos *in vitro* diversas funções foram descritas, muitas vezes contraditórias, sobre a proliferação, diferenciação e esteroidogênese das células da granulosa. Já a maioria dos estudos *in vivo* não investigou os mecanismos associados com os efeitos observados sobre a fertilidade. Com base no exposto, o presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito do tratamento com BMP15 recombinante humana sobre o crescimento folicular final, ovulação, luteinização e função luteal em bovinos. Testou-se a hipótese que o aumento de BMP15, através da injeção intrafolicular inibe a diferenciação, afetando negativamente o crescimento folicular final e a ovulação em bovinos.

## 2 | METODOLOGIA

### 2.1 | Experimento 1: Efeito da BMP15 na ovulação e luteinização

Os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA-UFPeI). Em um primeiro momento, foi avaliado o efeito da proteína BMP15 no processo ovulatório e consequente função luteal. Foram utilizadas 10 vacas *Bos taurus taurus*, não lactantes e não gestantes, das raças Holandês e Jersey, com condição corporal  $\geq 3$  (escala de 1-5). Os animais foram submetidos a um protocolo hormonal de sincronização de estro (Zoetis, São Paulo, Brasil) que consiste na administração de 2 mg de benzoato de estradiol e inserção de um implante intravaginal contendo 1 g de progesterona, para induzir a regressão folicular e uma nova onda de crescimento. Ainda, foi feita a administração de prostaglandina F2 $\alpha$  (150 $\mu$ g de cloprosteno sódico, i.m.) para indução da luteólise e realizada a aspiração folicular de estruturas com mais de 8 mm, no dia 0. O implante intravaginal permaneceu por nove dias, até que os folículos em crescimento atingissem diâmetro entre 12 e 14 mm, para garantir que os mesmos fossem responsivos ao tratamento com GnRH. Foram realizadas, diariamente, avaliações de diâmetro folicular através de ultrassonografia transretal utilizando transdutor linear de 6 MHz (SonoScape A5V), antes da administração do tratamento, para garantir que os folículos dominantes estavam em crescimento. Todas as estruturas maiores que 5 mm foram identificadas e desenhadas em três cortes esquemáticos dos ovários.

As fêmeas bovinas foram submetidas a tratamento intrafolicular com PBS (grupo controle; n=4) ou BMP15rh (Sigma Aldrich; grupo BMP15; n=6) na concentração final de 500 ng/mL. O volume total administrado foi adequado com base no volume de fluido folicular total, que foi estimado pela equação de regressão linear  $V = -685,1 + 120,7D$  ( $V =$  volume ( $\mu$ l);  $D =$  diâmetro (mm) do folículo a ser injetado) [20]. A concentração inicial de BMP15rh foi 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. A dose de BMP15rh foi determinada multiplicando-se por dez a dose efetiva observada *in vitro* [21].

Previamente à injeção intrafolicular, os animais foram submetidos à limpeza perineal e anestesia epidural, utilizando 3 a 4 mL de lidocaína a 2%. Os procedimentos de injeção intrafolicular foram realizados com auxílio de um equipamento de ultrassom acoplado à uma sonda vaginal de 5 MHz (Pie Medical AquilaVet, Maastrich, The Netherlands). Foi utilizado um sistema interno com um inovulador de embriões onde a bainha era acoplada a uma agulha 25G x 3 ½” (BD Spinal). O volume injetado somado ao volume da agulha foi aspirado para o interior de uma palheta de 0,25 mL. Este sistema foi inserido no sistema externo, composto por uma guia de biópsia, convencionalmente utilizada para aspiração folicular em bovinos, acoplado a uma agulha externa 21G (40x0,8). 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.

Imediatamente após a injeção intrafolicular, foi realizada a aplicação de uma dose i.m. de 21µg (5mL) do análogo de GnRH acetato de buserelina (Gonaxal®, Biogénese, Bagó), para induzir a ovulação. Posteriormente foi realizado monitoramento ultrassonográfico a cada 24 h em todos os animais por uma semana para observação da ovulação e luteinização. A ovulação foi caracterizada quando se observou o desaparecimento do folículo tratado entre duas avaliações e, posteriormente, a formação do corpo lúteo.

Amostras de sangue, do momento após a IIF (D0) até o D12, foram coletadas na veia coccígea caudal utilizando tubos com vácuo, os quais foram mantidos em temperatura ambiente para formação do coágulo e, posteriormente, centrifugados para separação do soro, que foi armazenado em nitrogênio líquido até as análises de progesterona e estradiol.

## **2.2 | Experimento 2: Dinâmica folicular após injeção intrafolicular de BMP15 pós a divergência folicular**

Para avaliar o efeito da proteína BMP15rh sobre o crescimento folicular final, foram utilizadas oito vacas *Bos taurus taurus*, da raça Jersey, cíclicas, não lactantes e não gestantes, com condição corporal  $\geq 3$  (escala de 1-5). Esses animais foram submetidos a um protocolo hormonal de sincronização de estro conforme descrito no experimento 1. No entanto, o implante intravaginal permaneceu por sete dias, até que os folículos em crescimento atingissem diâmetro entre 8,5 e 9,5 mm. Quando os folículos atingiram diâmetros de folículos dominantes, as fêmeas bovinas foram submetidas a tratamento intrafolicular com PBS (grupo controle; n=3) ou BMP15rh (Sigma Aldrich; grupo BMP15; n=5) na concentração final de 100 ng/mL, conforme metodologia descrita no experimento 1. Após a aplicação dos tratamentos, foi realizado monitoramento ultrassonográfico às 24 e 36h, conforme descrito no experimento anterior.

## **2.3 | Experimento 3: Expressão gênica dos receptores da BMP15 em cultivo de células da granulosa**

Para avaliar a regulação da expressão dos receptores de BMP15 pelas gonadotrofinas, foram utilizadas amostras provenientes de dois modelos de cultivo celular. Para mimetizar as células de folículos dominantes em crescimento [22], células da granulosa (CG) foram tratadas por 4 dias (D2-D6) com FSH (1 ng/mL) ou com veículo (controle), em seis replicações. Em todas as amostras foi testada a expressão de *CYP19A1*, sendo observado um aumento de expressão (mínimo de 2 a 3x) após o tratamento com FSH, validando o modelo (dados não demonstrados).

Para mimetizar o ambiente de folículos pré-ovulatórios, CG foram tratadas com LH (100 ng/mL) ou com veículo (controle) por 6 h, em seis replicações, conforme modelo descrito por

Zamberlam, Sahmi [23]. Em todas as amostras foi testada a expressão de *EREG* e *ADAM17*, sendo observada um aumento na abundância de RNAm após o tratamento com LH, validando o modelo.

## 2.4 | PCR em tempo real

Para quantificação da expressão gênica, o RNA total das células da granulosa foi extraído utilizando RNeasy Mini Kit (Qiagen, Canada), de acordo com as recomendações do fabricante. Para quantificar o RNA extraído, a densidade ótica foi determinada através de espectrofotômetro (NanoDrop, Thermo Scientific, USA). 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 DNA complementar foi sintetizado a partir de 100 ng de RNA, que foi primeiramente tratado com 0,1 U de DNase (Amplification Grade, Life Technologies) 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 (Wisent Bioproducts, CA) e primers específicos. As sequências dos iniciadores dos genes investigados foram: *BMPR2*: F- CCACTGGCCTCACTCCAAGT e R- CCCGACTGGCTGTGAAACAT e *BMPR1B*: F- AAAGTGGCGTGGCGAAAAGGTAGCT e R- CCCGTCCCTTTGATATCTGCAGCAA. As amostras foram analisadas em duplicata e os resultados foram expressos em relação aos valores médios de Ct para *GAPDH*: F-ACCCAGAAGACTGTGGATGG e R- CAACAGACACGTTGGGAGTG e *18S rRNA*: F- ATGAGCTTCTTGGAGGCGTA e R- TCAAGCCATCTGTGACCAAA, como controles internos.



## 2.5 | Dosagens hormonais

As dosagens de progesterona e estradiol (D12) no fluido dos cistos e de estradiol (D0 e D1) e progesterona (D0, D3, D4, D5 e D12) no soro foram realizadas através da técnica de eletroquimioluminescência em laboratório comercial. Foram considerados ensaios com, no máximo, 10% de coeficiente de variação intra- e inter-ensaio.

## 2.6 | Análise estatística

O efeito dos tratamentos sobre a dinâmica folicular e sobre os níveis de hormônios séricos 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*. As variações nos níveis de transcrição nas células foliculares foram analisadas por ANOVA. 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).

## 3 | RESULTADOS

Para avaliar o efeito da BMP15 em folículos pré-ovulatórios, no experimento 1, foram injetados folículos com diâmetro médio de  $12,5 \pm 0,5$  e  $12,75 \pm 0,75$  mm, para os grupos controle e BMP15rh, respectivamente. Imediatamente após o tratamento foi realizada a indução da ovulação com GnRH em ambos os grupos. Todos os folículos do grupo controle (4/4) tiveram a ovulação confirmada por ultrassonografia até 48 h após o tratamento com PBS. No entanto, os folículos que receberam a injeção de BMP15rh na concentração de 500 ng/mL não ovularam (0/6) e permaneceram com aspecto de estrutura em processo de luteinização.

A dosagem de estradiol sérico no momento e 24 h após injeção intrafolicular não diferiram entre os tratamentos. Porém, diminuíram do dia 0 para o dia 1 (Figura 1). Não houve efeito do tratamento nem da interação entre momento x tratamento sobre os níveis de progesterona sérica (Figura 2). Porém, em ambos os grupos houve luteinização, pois os níveis de progesterona aumentaram gradativamente, obtendo-se a maior concentração de progesterona no dia 12 do ciclo. Todos os animais do grupo controle apresentaram corpo lúteo característico para a fase do ciclo (Figura 3A). Por outro lado, todas as fêmeas bovinas tratadas com BMP15rh apresentaram estruturas císticas com parede luteinizada ao exame ultrassonográfico, caracterizando cistos luteínicos (Figura 3B). Portanto, optou-se por realizar a aspiração das estruturas císticas para investigação da composição do fluido folicular através de dosagem de progesterona e estradiol, 12 dias após a IIF.

Em cinco das seis vacas observaram-se níveis de progesterona acima de 500ng/mL no fluido folicular. A concentração de estradiol apresentou grande variação, sendo que uma vaca apresentou 94610 pg/mL, sendo que o mesmo animal apresentou a menor concentração de progesterona (34 ng/mL), sugerindo uma luteinização parcial (Tabela 1).

Para investigar o efeito da BMP15rh em folículos em crescimento, no experimento 2, a injeção intrafolicular foi realizada em folículos com diâmetro médio de  $9,3 \pm 0,7$  e  $8,8 \pm 0,5$  mm, para os grupos controle e BMP15rh, respectivamente. Uma vez que a maioria dos folículos injetados com a proteína oocitária tiveram o crescimento interrompido, sendo observados diâmetros de  $11,6 \pm 1,3$  e  $9,7 \pm 0,6$  mm, às 24 h e  $13,2 \pm 1,7$  e  $9,7 \pm 1,3$ , às 36 h, para controle e BMP15, respectivamente (Figura 4), optou-se por realizar a aspiração dos mesmos, 36 a 40 h após o tratamento. Entretanto, o material obtido através de aspiração não apresentou qualidade adequada para a realização de dosagens moleculares e hormonais, devido à presença de hemácias.

Uma vez que se sabe que os receptores da BMP15 são expressos durante a divergência folicular, objetivou-se avaliar sua regulação pelas gonadotrofinas. Nas células da granulosa cultivadas *in vitro*, não se observou efeito significativo da suplementação com FSH sobre a expressão de RNAm dos receptores *BMPR2* e *BMPR1B* ( $P>0.05$ ) (Figura 5A e B, respectivamente). Após o tratamento com LH, não foi observada regulação na expressão de *BMPR1B*, enquanto se observou uma tendência a elevação na expressão de *BMPR2* ( $P=0.1$ ) (Figura 5C e D, respectivamente).

#### 4 | DISCUSSÃO

É bem estabelecido que membros da superfamília TGF $\beta$ , em especial a BMP15, desempenham uma série de funções de regulação localmente no ovário [24]. O tratamento com hCG aumenta os níveis da proteína BMP15 em camundongas antes da ovulação, embora a expressão de RNAm seja diminuída nos oócitos [25]. Em vacas, os níveis de BMP15 e GDF9 aumentam após o tratamento com LH suíno [26]. Portanto, optou-se por investigar o efeito da BMP15rh em folículos pré-ovulatórios, no experimento 1. A injeção intrafolicular foi realizada em folículos com diâmetro entre 12 e 14 mm porque, em vacas taurinas, o folículo dominante apresentando maior responsividade ao LH a partir de 12 mm (SARTORI et al., 2001). Portanto, avaliou-se diretamente se a BMP15rh iria ter efeito no folículo já diferenciado, próximo da ovulação. A liberação do pico de LH foi induzida artificialmente através da administração de análogo sintético de GnRH, o que repercute em um pico de LH cerca de 2 h após aplicação [27]. A ovulação foi monitorada por ultrassonografia transretal e todos os folículos do grupo controle ovularam até 48 horas após a IIF, corroborando com a literatura que relata ovulação entre 24 e 32 h após a administração de GnRH [28], enquanto que nenhum folículo tratado com BMP15rh ovulou. Até o presente momento, o efeito da proteína BMP15 no período pré-ovulatório era desconhecido.

Dados de literatura demonstram um efeito negativo da BMP15 sobre a síntese de progesterona, através da diminuição nos níveis de expressão de *StAR* [2], em células da granulosa de mulheres submetidas à aspiração folicular. Ainda, em ovelhas imunizadas, a diminuição da atividade da BMP15 parece induzir a luteinização prematura [29]. Portanto, era esperada uma inibição da ovulação e da luteinização nos folículos tratados com BMP15rh, mesmo após o tratamento com um potente análogo de GnRH. No entanto os resultados do presente estudo demonstram que a BMP15rh inibe a ovulação, mas não afeta a síntese de estradiol nas primeiras 24 h e o processo de luteinização após o pico de LH (luteinização subsequente). Apesar das concentrações de estradiol sérico não diferirem entre os tratamentos, ocorreu um decréscimo do dia 0 para o dia 1, o que era esperado para folículos em processo de luteinização após administração de GnRH, validando o modelo utilizado [27, 30].

Fatores produzidos pelo oócito e células foliculares exercem importantes funções autócrinas e parácrinas para o processo de regulação da luteinização e produção de progesterona [31]. As BMPs, nos ovários, são expressas tanto em mulheres saudáveis quanto nas diagnosticadas com SOP, podendo estar relacionadas com as anormalidades encontradas nestas pacientes [32]. Em mulheres com SOP, ocorre uma redução e um “atraso” na expressão de BMP15 na fase folicular inicial, quando comparado com tecidos ovarianos normais [33]. Concordando com os dados de literatura, no presente estudo, a desregulação dos níveis de BMP15 levou a formação de estruturas císticas, comprovando que este fator oocitário tem um papel essencial na regulação do crescimento folicular. Esta alteração foi confirmada pelas concentrações de estradiol e progesterona dos cistos 12 dias após o tratamento com BMP15rh, com níveis de progesterona, que foram superiores às encontrados no líquido de cistos induzidos e de folículos antrais grandes relatados no estudo de Diaz et al. [26].

Devido aos resultados encontrados com a IIF em folículos pré-ovulatórios na concentração de 500 ng/mL optou-se por realizar o tratamento com folículos logo após a

divergência folicular em uma concentração menor, a 100 ng/mL. Deste modo, os resultados encontrados nesse segundo experimento sugerem que a injeção intrafolicular de BMP15rh inibe o crescimento folicular final e a ovulação em bovinos, possivelmente através da inibição da diferenciação folicular e/ou esteroidogênese. Essa inibição era esperada, uma vez que mutações inativadoras em heterozigose no gene da BMP15 em ovinos [8, 10] e a imunização contra BMP15 por curtos períodos em ovinos [34] e bovinos [35] aumentam a taxa ovulatória, sugerindo que a BMP15 possui um efeito inibidor do desenvolvimento folicular. Entretanto, os mecanismos celulares e moleculares associados aos efeitos observados não foram avaliados na maioria dos estudos publicados. No presente estudo, os folículos tratados com BMP15rh apresentaram paredes espessas no momento da aspiração, sugerindo luteinização. Porém, as amostras obtidas após a aspiração dos folículos tratados não apresentaram viabilidade adequada para avaliação da expressão gênica e dosagens hormonais.

A redução da apoptose e da taxa de proliferação estão relacionadas com o atraso na regressão folicular e persistência de folículos císticos [36]. Os fatores locais interferem na sensibilidade das células foliculares às gonadotrofinas [37, 38] e sugere-se que o desequilíbrio do sistema BMP está envolvido na patogenia de cistos ovarianos em bovinos [39]. No entanto, são necessários novos estudos para entender como a injeção intrafolicular de BMP15rh altera o ambiente de folículos pré-ovulatórios.

Estudos com imunizações contra BMP15 e GDF9 em ovinos [9], bovinos [35], equinos [14] e cervos [40] apresentaram resultados variados mas, independentemente da espécie, induzem a esterilidade ou o aumento da fertilidade. Mais de 10 mutações no gene da BMP15 já foram associadas com insuficiência ovariana primária em mulheres e, conforme proposto por Patiño et al. [41], qualquer alteração na proteína BMP15 quanto à secreção, atividade ou sinergismo com GDF9 é capaz de afetar a fertilidade feminina. Conforme relatado na maioria das espécies domésticas, mutações no gene da BMP15 também foram associadas com uma

melhor resposta à estimulação ovariana em mulheres [42]. Infelizmente, a grande maioria dos estudos citados não investigou os mecanismos envolvidos nos diferentes fenótipos observados.

Diferentemente das mutações observadas nos genes das proteínas GDF9 e BMP15, a mutação no receptor tipo 1 da BMP15 (*BMPR1B*), é aditiva, resultando no aumento da taxa de ovulações e nascimentos múltiplos, tanto em heterozigose como em homozigose [43, 44]. A expressão dos receptores de BMP15 foi descrita nas células de teca e granulosa bovina, sendo que os níveis de RNAm de ambos, *BMPR1B* e *BMPR2*, foram positivamente associadas aos diâmetro folicular [37]. A expressão do *BMPR2* em tecidos ovarianos de ovinos está fortemente correlacionada com a maior expressão de BMP15 nos grandes folículos [45]. Em um estudo anterior, observamos que os receptores *BMPR1B* e *BMPR2* são mais expressos no segundo maior folículo antes e durante a divergência folicular, indicando um papel inibitório na diferenciação folicular e esteroidogênese. Ainda, é possível que o *BMPR1B* também esteja envolvido na regressão folicular [46]. Portanto, investigou-se a regulação da expressão de *BMPR1B* e *BMPR2* pelas gonadotrofinas FSH e LH, mimetizando o ambiente de folículos dominantes e pré-ovulatórios, respectivamente.

No presente estudo, os receptores de BMP15 não foram significativamente regulados pelo tratamento com gonadotrofinas. O RNAm de ambos receptores aumenta nas células da granulosa de folículos pré-ovulatórios bovinos 12 h após tratamento com GnRH, o que corresponde a aproximadamente 10 h após o pico de LH (dados não publicados). Portanto, é possível que 6 h de tratamento com LH *in vitro* não tenham sido suficientes para observar o aumento na expressão, apenas uma tendência à elevação de *BMPR2*.

A BMP15 afeta de forma distinta as células da granulosa em diferentes espécies. Além disso, não se pode descartar que os efeitos gerados pela proteína oocitária sejam diferentes quando se utilizar o fator específico para a espécie estudada. Ressalta-se que, no presente estudo, foi utilizada a proteína BMP15 humana pois, ao nosso conhecimento, a BMP15 bovina

não está disponível comercialmente. Outra limitação nas pesquisas dos fatores foliculares é o fato de que não se encontram na literatura os níveis absolutos de GDF9 e BMP15 no fluido folicular normal. Dessa forma, é preciso cautela para se extrapolar os resultados encontrados de uma espécie para outra. Por outro lado, evidencia-se que o modelo bovino *in vivo* é adequado para estudo dos fatores oocitários no controle do desenvolvimento folicular pois, além de tratar-se de uma espécie monovular, permite o monitoramento diário da dinâmica ovariana e coleta de amostras de maneira minimamente invasiva.

Coletivamente, os resultados do presente estudo demonstram que a BMP15rh influencia a regulação ovariana local, inibindo o desenvolvimento folicular final. Ainda, o tratamento com BMP15rh bloqueia a ovulação, sem inibir a luteinização induzida por GnRH. Além da geração de conhecimento para pesquisa básica, a compreensão do papel dos fatores locais na fisiologia ovariana pode contribuir no entendimento de processos patológicos e no desenvolvimento de tecnologias que tenham por finalidade a contracepção ou o aumento da taxa ovulatória.

## **AGRADECIMENTOS**

Este estudo foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; código de financiamento 001) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS; Edital PRONEX).

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

[1] Knight PG, Glister C. TGF- $\beta$  superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*. 2006;132:191-206.

- [2] Chang H-M, Cheng J-C, Klausen C, Leung PCK. BMP15 Suppresses Progesterone Production by Down-Regulating StAR via ALK3 in Human Granulosa Cells. *Molecular Endocrinology*. 2013;27:2093-104.
- [3] Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola F, Hirao Y. Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. *Biology of reproduction*. 1997;56:976-84.
- [4] Otsuka F, Moore RK, Shimasaki S. Biological Function and Cellular Mechanism of Bone Morphogenetic Protein-6 in the Ovary. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276:32889-95.
- [5] Erickson GF, 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 : RB&E*. 2003;1:9-.
- [6] Evans A, Fortune J. Selection of the Dominant Follicle in Cattle Occurs in the Absence of Differences in the Expression of Messenger Ribonucleic Acid for Gonadotropin Receptors 1. *Endocrinology*. 1997;138:2963-71.
- [7] Chang H-M, Qiao J, Leung PC. Oocyte–somatic cell interactions in the human ovary—novel role of bone morphogenetic proteins and growth differentiation factors. *Human Reproduction Update*. 2016.
- [8] Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R, et al. 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*. 2004;70:900-9.
- [9] Juengel JL. Growth Differentiation Factor 9 and Bone Morphogenetic Protein 15 Are Essential for Ovarian Follicular Development in Sheep. *Biology of Reproduction*. 2002;67:1777-89.



- [10] Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MP, Juengel JL, Jokiranta TS, et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet.* 2000;25:279-83.
- [11] Yan C, Wang P, DeMayo J, DeMayo FJ, Elvin JA, Carino C, et al. Synergistic Roles of Bone Morphogenetic Protein 15 and Growth Differentiation Factor 9 in Ovarian Function. *Molecular Endocrinology.* 2001;15:854-66.
- [12] Belli M, Shimasaki S. Chapter Twelve - Molecular Aspects and Clinical Relevance of GDF9 and BMP15 in Ovarian Function. In: Litwack G, editor. *Vitamins and Hormones: Academic Press;* 2018. p. 317-48.
- [13] Juengel JL, Bodensteiner KJ, Heath DA, Hudson NL, Moeller CL, Smith P, et al. Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. *Animal Reproduction Science.* 2004;82–83:447-60.
- [14] Davis KA, Klohonatz KM, Mora DSO, Twenter HM, Graham PE, Pinedo P, et al. Effects of immunization against bone morphogenetic protein-15 and growth differentiation factor-9 on ovarian function in mares. *Animal Reproduction Science.* 2018;192:69-77.
- [15] McIntosh CJ, Lawrence S, Smith P, Juengel JL, McNatty KP. Active immunization against the proregions of GDF9 or BMP15 alters ovulation rate and litter size in mice. *Reproduction.* 2012;143:195-201.
- [16] Juengel JL, Davis GH, McNatty KP. Using sheep lines with mutations in single genes to better understand ovarian function. *Reproduction.* 2013;146:R111-R23.
- [17] Spicer LJ, Aad PY, Allen DT, Mazerbourg S, Payne AH, Hsueh AJ. 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.* 2008;78:243-53.

- [18] McNatty KP, Heath DA, Hudson NL, Lun S, Juengel JL, Moore LG. Gonadotrophin-responsiveness of granulosa cells from bone morphogenetic protein 15 heterozygous mutant sheep. *Reproduction*. 2009;138:545-51.
- [19] Cakmak H, Franciosi F, Zamah AM, Cedars MI, Conti M. Dynamic secretion during meiotic reentry integrates the function of the oocyte and cumulus cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113:2424-9.
- [20] Ferreira R, Oliveira JF, Fernandes R, Moraes JF, Gonçalves PB. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. *Reproduction*. 2007;134:713-9.
- [21] Mottershead DG, Ritter LJ, Gilchrist RB. Signalling pathways mediating specific synergistic interactions between GDF9 and BMP15. *Molecular Human Reproduction*. 2012;18:121-8.
- [22] Zamberlam G, Portela V, de Oliveira JF, Goncalves PB, Price CA. Regulation of inducible nitric oxide synthase expression in bovine ovarian granulosa cells. *Molecular and cellular endocrinology*. 2011;335:189-94.
- [23] Zamberlam G, Sahmi F, Price CA. Nitric oxide synthase activity is critical for the preovulatory epidermal growth factor-like cascade induced by luteinizing hormone in bovine granulosa cells. *Free radical biology & medicine*. 2014;74:237-44.
- [24] Abir R, Fisch B, Johnson MH. BMP15, fertility and the ovary. *Reproductive BioMedicine Online*. 2014;29:525-6.
- [25] Mester B, Ritter LJ, Pitman JL, Bibby AH, Gilchrist RB, McNatty KP, et al. Oocyte expression, secretion and somatic cell interaction of mouse bone morphogenetic protein 15 during the peri-ovulatory period. *Reproduction, Fertility and Development*. 2015;27:801-11.
- [26] Behrouzi A, Colazo MG, Ambrose DJ. Alterations in bone morphogenetic protein 15, growth differentiation factor 9, and gene expression in granulosa cells in preovulatory follicles of dairy cows given porcine LH. *Theriogenology*. 2016;85:1249-57.

- [27] Komar C, Berndtson A, Evans A, Fortune J. Decline in Circulating Estradiol During the Perioovulatory Period Is Correlated with Decreases in Estradiol and Androgen, and in Messenger RNA for P450 Aromatase and P450 17 $\alpha$ -Hydroxylase, in Bovine Preovulatory Follicles 1. *Biology of reproduction*. 2001;64:1797-805.
- [28] Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2alpha and GnRH. *Theriogenology*. 1995;44:915-23.
- [29] Juengel JL, Quirke LD, Lun S, Heath DA, Johnstone PD, McNatty KP. Effects of immunizing ewes against bone morphogenetic protein 15 on their responses to exogenous gonadotrophins to induce multiple ovulations. *Reproduction*. 2011;142:565-72.
- [30] Santos JT, Ferreira R, Gasperin BG, Siqueira LC, de Oliveira JF, Santos RA, et al. 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*. 2011.
- [31] Zhang H, Klausen C, Zhu H, Chang H-M, Leung PCK. BMP4 and BMP7 suppress StAR and progesterone production via ALK3 and SMAD1/5/8-SMAD4 in human granulosa-lutein cells. *Endocrinology*. 2015;0:en.2015-1494.
- [32] Khalaf M, Morera J, Bourret A, Reznik Y, Denoual C, Herlicoviez M, et al. BMP system expression in GCs from polycystic ovary syndrome women and the in vitro effects of BMP4, BMP6, and BMP7 on GC steroidogenesis. *European Journal of Endocrinology*. 2013;168:437-44.
- [33] 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. *J Assist Reprod Genet*. 2014;31:1483-90.

- [34] Juengel JL, Hudson NL, Whiting L, McNatty KP. Effects of immunization against bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 on ovulation rate, fertilization, and pregnancy in ewes. *Biol Reprod.* 2004;70:557-61.
- [35] Juengel JL, Hudson NL, Berg M, Hamel K, Smith P, Lawrence SB, et al. Effects of active immunization against growth differentiation factor 9 and/or bone morphogenetic protein 15 on ovarian function in cattle. *Reproduction.* 2009;138:107-14.
- [36] Ortega HH, Marelli BE, Rey F, Amweg AN, Díaz PU, Stangaferro ML, et al. Molecular aspects of bovine cystic ovarian disease pathogenesis. *Reproduction.* 2015;149:R251-R64.
- [37] Glister C, Satchell L, Knight PG. Changes in expression of bone morphogenetic proteins (BMPs), their receptors and inhibin co-receptor betaglycan during bovine antral follicle development: inhibin can antagonize the suppressive effect of BMPs on thecal androgen production. *Reproduction.* 2010;140:699-712.
- [38] Persani L, Rossetti R, Di Pasquale E, Cacciatore C, Fabre S. The fundamental role of bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and its involvement in female fertility disorders. *Human Reproduction Update.* 2014;20:869-83.
- [39] Díaz PU, Hein GJ, Belotti EM, Rodríguez FM, Rey F, Amweg AN, et al. BMP2, 4 and 6 and BMPRII are altered from early stages of bovine cystic ovarian disease development. *Reproduction.* 2016;152:333-50.
- [40] Eckery DC, Miller LA, Killian GJ, DeNicola AJ. Effects of Vaccination against GDF9 and BMP15 on Fertility and Ovarian Function in the White-tailed Deer. 2014.
- [41] Patiño LC, Walton KL, Mueller TD, Johnson KE, Stocker W, Richani D, et al. BMP15 Mutations Associated With Primary Ovarian Insufficiency Reduce Expression, Activity, or Synergy With GDF9. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2017;102:1009-19.

- [42] Hanevik HI, Hilmarsen HT, Skjelbred CF, Tanbo T, Kahn JA. A single nucleotide polymorphism in BMP15 is associated with high response to ovarian stimulation. *Reproductive biomedicine online*. 2011;23:97-104.
- [43] Mulsant P, Lecerf F, Fabre S, Schibler L, Monget P, Lanneluc I, et al. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Mérimo ewes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98:5104-9.
- [44] 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 (BMPRII) gene. *Journal of Endocrinology*. 2001;169:R1-6.
- [45] Foroughinia G, Fazileh A, Eghbalsaied S. Expression of genes involved in BMP and estrogen signaling and AMPK production can be important factors affecting total number of antral follicles in ewes. *Theriogenology*. 2017;91:36-43.
- [46] Gasperin BG, Ferreira R, Rovani MT, Bordignon V, Duggavathi R, Buratini J, et al. Expression of receptors for BMP15 is differentially regulated in dominant and subordinate follicles during follicle deviation in cattle. *Anim Reprod Sci*. 2014;144:72-8.

Legendas das figuras:

**Figura 1:** Concentração de estradiol sérico (pg/mL) das fêmeas bovinas sincronizadas que receberam a injeção intrafolicular de PBS (controle, n=4) ou BMP15rh na concentração final de 500 ng/mL (n=6). Os animais de ambos os grupos receberam uma injeção de 21µg de GnRH pela via subcutânea imediatamente após o tratamento intrafolicular.

**Figura 2:** Concentração de progesterona sérica (ng/mL) das fêmeas bovinas sincronizadas que receberam a injeção intrafolicular de PBS (controle, n=4) ou BMP15rh na concentração final de 500 ng/mL (n=6), após o tratamento com a injeção intrafolicular (0) e nos dias subsequentes 3, 4, 5 e 12. Os animais de ambos os grupos receberam uma injeção de 21µg de GnRH pela via subcutânea imediatamente após o tratamento intrafolicular.

**Figura 3:** (A) Imagem ultrassonográfica de corpo lúteo com 22,3 mm de uma fêmea do grupo controle 12 dias após a injeção intrafolicular de PBS. (B) Imagem ultrassonográfica de uma estrutura cística luteinizada com 31,6 mm de uma fêmea do grupo BMP15, 12 dias após a injeção intrafolicular com BMP15rh na concentração de 500 ng/mL.

**Figura 4:** Efeito da injeção intrafolicular de BMP15rh no crescimento folicular. Uma nova onda folicular foi induzida e quando o maior folículo atingiu o diâmetro entre 8,5 e 9,5mm, foi realizada a injeção intrafolicular de PBS (n=3) ou BMP15rh na concentração final de 100 ng/mL (n=5).

**Figura 5:** Expressão de RNAm dos genes *BMPR2* (A) e *BMPR1B* (B) em células da granulosa cultivadas *in vitro* em meio padrão (controle) e em meio suplementado com FSH. Expressão de RNAm dos genes *BMPR2* (C) e *BMPR1B* (D) em células da granulosa cultivadas *in vitro* em meio padrão (controle) e em meio suplementado com LH.

Figura 1

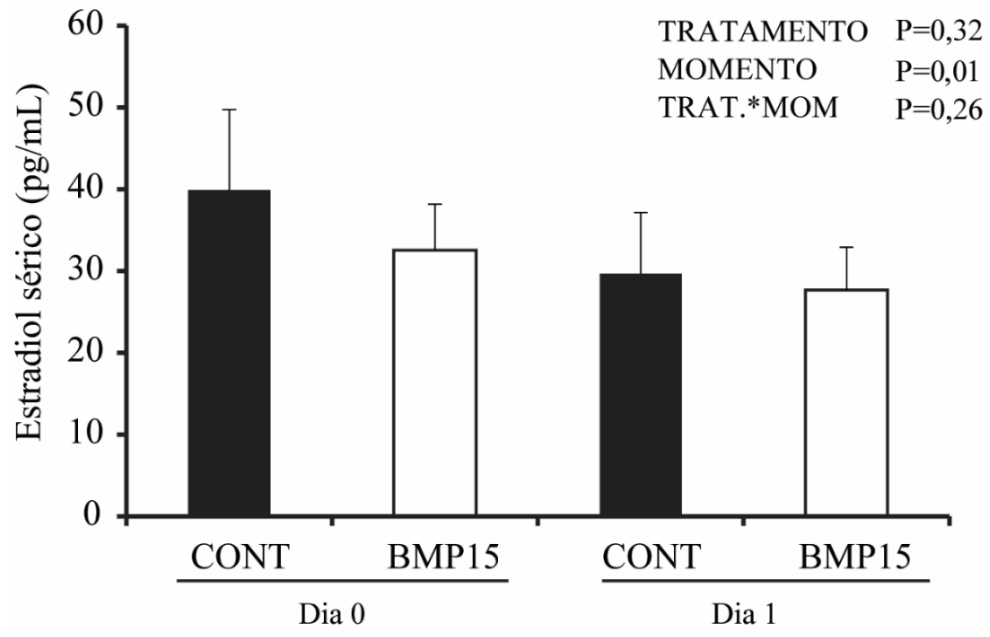


Figura 2

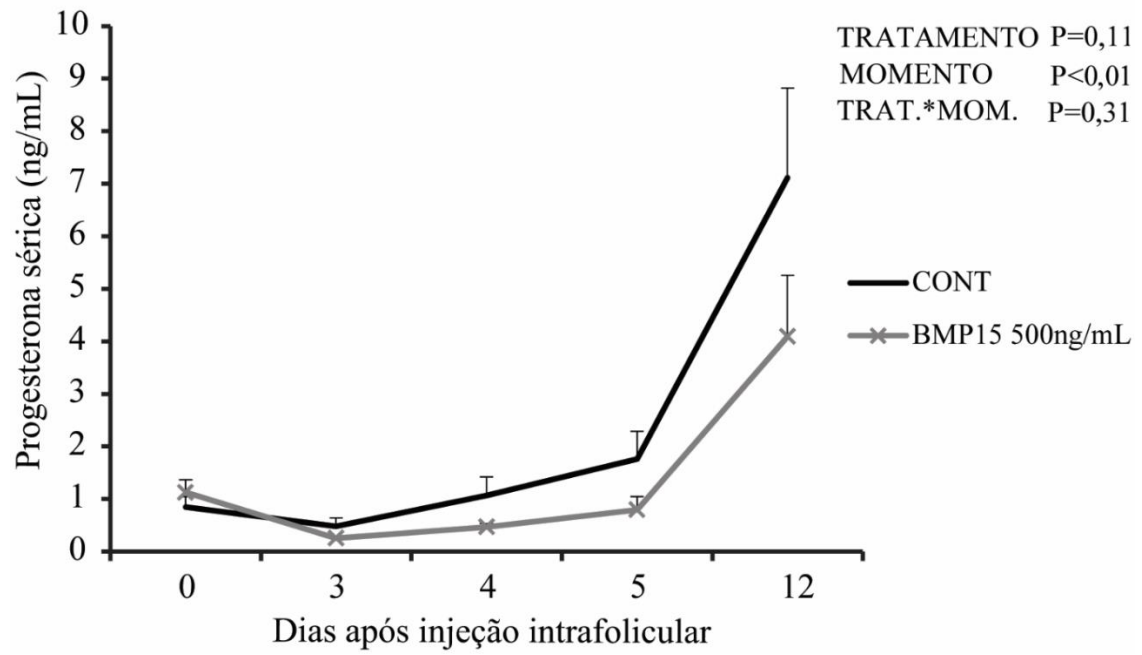




Figura 3

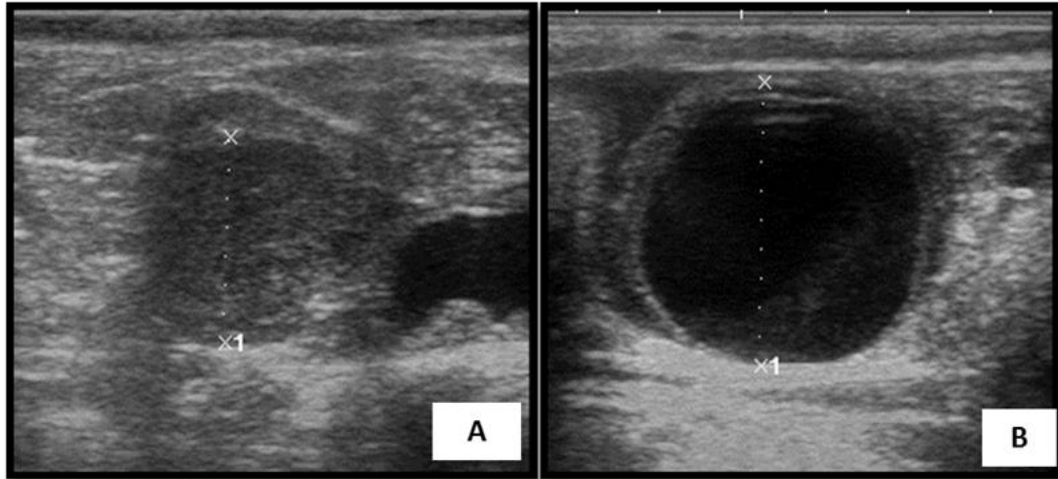


Figura 4

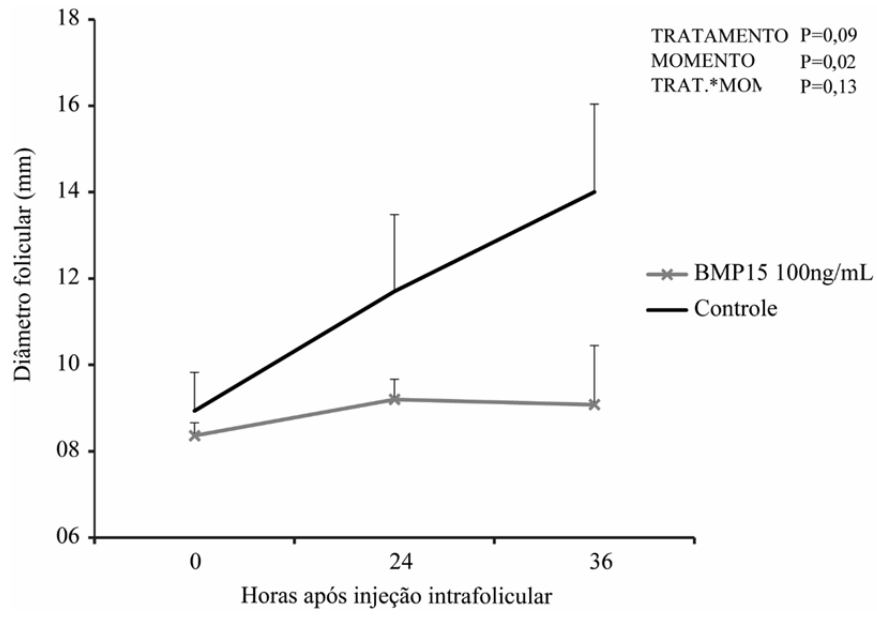


Figura 5

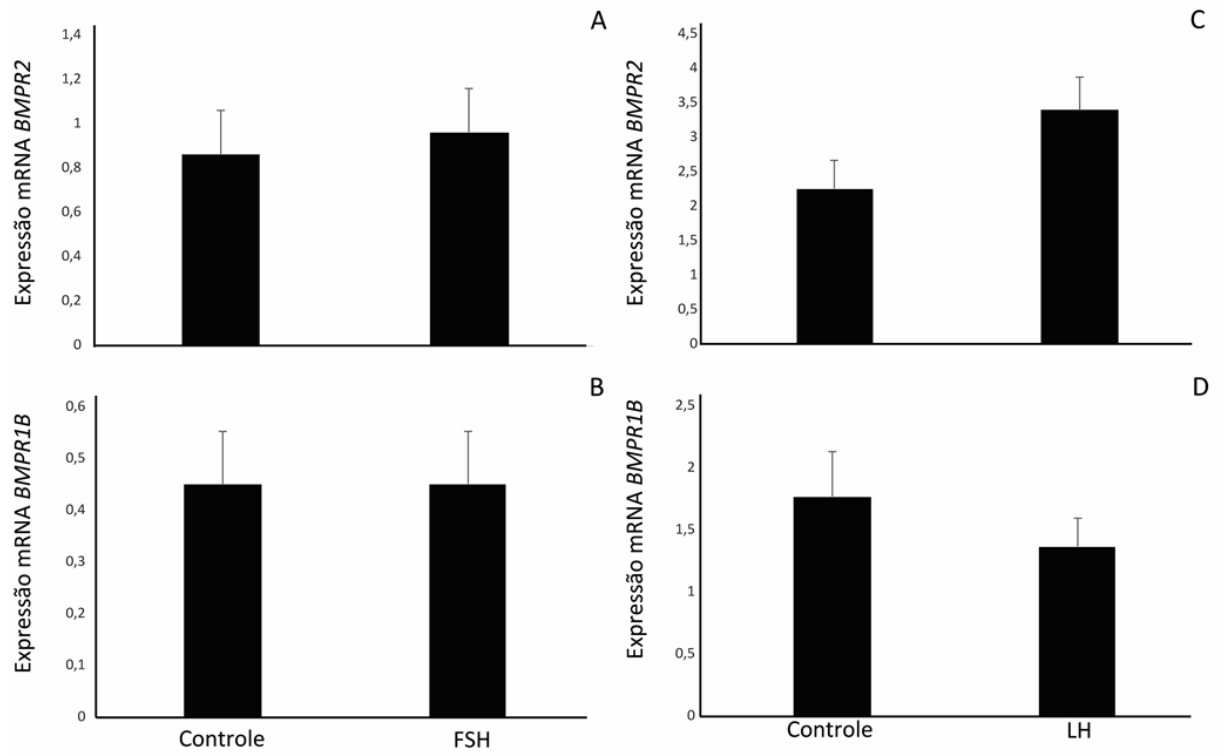


Tabela 1 – Concentração de progesterona e estradiol no fluído aspirado de estruturas císticas luteinizadas dos animais do grupo BMP15.

<b>Animal</b>	<b>Progesterona (ng/mL)</b>	<b>Estradiol (pg/ml)</b>
108	2812	23
126	3320	28,8
135	34	94610
137	1044	1570
138	1647	67,3
140	505	34,9

## **2.4 Artigo 4**

### **Diferentes métodos para processamento de amostras de células da granulosa obtidas por aspiração folicular para extração de RNA.**

Cristina Sangoi Haas, Juliana Germano Ferst, Camila Amaral D'Avila, Fabiane Pereira Moraes, Fernando Caetano Oliveira, Sergio Farias Vargas Jr, Paulo Bayard Dias Gonçalves, Bernardo Garziera Gasperin

Aceito para publicação na revista Science and Animal Health

## DIFERENTES MÉTODOS PARA PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS DE CÉLULAS DA GRANULOSA OBTIDAS POR ASPIRAÇÃO FOLICULAR PARA A EXTRAÇÃO DE RNA

HAAS, Cristina Sangoi <sup>1</sup>;  
FERST, Juliana Germano <sup>2</sup>;  
D'ÁVILA, Camila Amaral <sup>1</sup>;  
MORAES, Fabiane Pereira de <sup>1</sup>;  
OLIVEIRA, Fernando Caetano de <sup>1</sup>;  
VARGAS JÚNIOR, Sergio Farias <sup>1</sup>;  
GONÇALVES, Paulo Bayard Dias <sup>2</sup>;  
GASPERIN, Bernardo Garziera <sup>3,4</sup>.

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas;

<sup>2</sup>Laboratório de Reprodução Animal, Universidade Federal de Santa Maria;

<sup>3</sup> Departamento de Patologia Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

### RESUMO

O estudo da expressão gênica das células foliculares pode ser a chave para o entendimento dos processos de crescimento folicular, ovulação e luteinização. As células foliculares de animais podem ser recuperadas *in vivo* através da aspiração folicular (AF) guiada por ultrassonografia, uma alternativa para não submeter as fêmeas ao procedimento cirúrgico de ovariectomia. Entretanto, a AF comumente possibilita a recuperação de uma pequena quantidade de células em fluido folicular, geralmente contaminado por células sanguíneas, o que prejudica a extração de RNA e interfere na qualidade da amostra. No presente estudo foram comparadas a coleta e o armazenamento de células foliculares com solução salina, Trizol<sup>®</sup>, dois tampões de lise de eritrócitos ou RNA later<sup>®</sup>. Quantidades adequadas de RNA e amostras de melhor qualidade com base na expressão dos genes de referência *18S rRNA*, *GAPDH*, *RPL19* e *PPIB* foram obtidas nas células foliculares tratadas com tampão de lise celular imediatamente após a coleta.

**Palavras-chave:** Expressão gênica. Extração de RNA. Lise celular. RNA later. Trizol.

Nos mamíferos, o controle endócrino da foliculogênese, diferenciação folicular, ovulação e luteinização é bem estabelecido. Entretanto, os mediadores endócrinos interagem com

fatores produzidos localmente no ovário. Neste contexto, os fatores produzidos pelos oócitos e demais células foliculares desempenham papéis importantes na regulação das funções ovarianas (FORTUNE et al., 2004). Estudar os fatores produzidos pelas células foliculares pode ser a chave para o entendimento da diferenciação folicular e regulação da ovulação. Uma das formas de estudar a função precisa desses fatores nos processos ovarianos é através de análises moleculares, tais como as de expressão gênica.

A recuperação das células foliculares e do líquido folicular pode ser realizada através de ovariectomia por colpotomia (DROST et al., 1992), que possibilita um melhor isolamento das células foliculares, mas apresenta a desvantagem de ser um procedimento invasivo. Uma alternativa para não submeter as fêmeas a um procedimento cirúrgico é a utilização da aspiração folicular (AF) guiada por ultrassonografia para coleta das células da granulosa e *cumulus oophorus* (ARASHIRO et al., 2013; WHITE et al., 2008). A AF é menos invasiva, mas o procedimento de coleta das células foliculares necessita ser aprimorado, uma vez que são recuperadas poucas células foliculares e grande quantidade de células sanguíneas. Para contornar essa limitação, é necessário reduzir a coagulação das células sanguíneas, o que impossibilita a obtenção de RNA de qualidade. Dentre as alternativas podemos citar: utilização de tampão de lise de células sanguíneas (SANCHEZ et al., 2014); coleta em reagente específico para extração de RNA ou armazenamento em tampão de preservação de RNA, como o RNA later. Com este objetivo, realizou-se um estudo para determinar um protocolo de coleta de células da granulosa adequado para avaliação de regulação gênica de amostras bovinas. Uma metodologia apropriada para esse tipo de experimento pode fornecer subsídios para melhorar a compreensão da função ovariana.

Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel. Foram utilizadas 20 vacas *Bos taurus taurus* adultas cíclicas, não lactantes e não gestantes, com condição corporal  $\geq 3$  (escala de 1-5; 1 - muito magra e 5 - obesa). Estes animais foram submetidos a um protocolo convencional de sincronização de estro envolvendo estradiol e progesterona, para induzir a regressão folicular e uma nova onda de crescimento, e prostaglandina, para promover a luteólise. O implante intravaginal permaneceu por oito dias, até que os folículos em crescimento atingissem um diâmetro entre 11 e 13 mm. Quatro dias após a inserção do dispositivo, iniciou-se o monitoramento diário para identificar um folículo dominante saudável em crescimento, utilizando ultrassonografia transretal com transdutor linear de 6 MHz (SonoScape A5V). Todas as estruturas maiores que 4 mm foram

identificadas e desenhadas em três cortes esquemáticos dos ovários. Deste modo, os animais que atingiram diâmetro folicular desejado tiveram o folículo de maior diâmetro aspirado sob anestesia epidural utilizando um sistema adaptado que continha uma agulha 40x8 (21G) na extremidade. O sistema foi acoplado a uma guia de biópsia guiada por ultrassom utilizando transdutor microconvexo de 5 MHz. Após a aspiração e centrifugação, foram separados o líquido folicular e o *pellet* de células foliculares. Com o objetivo de testar metodologias de coleta de células da granulosa para serem utilizadas em estudos de expressão gênica, os folículos das fêmeas bovinas (n=20) aspiradas foram distribuídos aleatoriamente em cinco protocolos distintos. No grupo controle - *pellet* celular puro no nitrogênio líquido (NL2) -, as amostras (n=4) foram centrifugadas (10 min a 845 G/rcf), o sobrenadante descartado, e os tubos armazenados imediatamente em NL2. No grupo Trizol, as amostras (n=3) foram centrifugadas (10 min a 845 G/rcf), o sobrenadante descartado, e o *pellet* de células foi ressuspensão em 250 µL de Trizol® seguido de sucessivas pipetagens e homogeneização em vórtex. As amostras desse grupo foram armazenadas em NL2 até o momento da extração de RNA. No grupo tampão comercial de lise de eritrócito R7757 (Sigma®), as amostras (n=5) foram centrifugadas (7 min a 845 G/rcf), o sobrenadante descartado, e foi adicionado 200 µL de tampão (R7757 Sigma® Aldrich) ao *pellet* de células e homogeneizado com pipetador durante um minuto. Após esse período, adicionou-se 1000 µL de solução salina (NaCl 0,9%) sobre o *pellet* com o buffer e foi realizada a centrifugação por 5 min a 500 G/rcf. Posteriormente, retirou-se o sobrenadante e o *pellet* celular formado foi ressuspensão em 200 µL de Trizol®, sendo homogeneizado com pipetagens e vórtex (40 seg). As amostras foram armazenadas em NL2. No grupo tampão de lise de eritrócitos CSH (155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 12 mM NaHCO<sub>3</sub> e 0,1 mM EDTA), as amostras (n=3) foram centrifugadas (7 min a 845 G/rcf) e o sobrenadante foi descartado. Após, o *pellet* formado foi ressuspensão em 1,5 mL de tampão de lise celular de eritrócitos confeccionado segundo o protocolo de Cold Spring Harbor Protocols (2006). Em seguida, foi realizada a incubação por 5 min à temperatura ambiente (25°C) e realizada uma nova centrifugação a 3000 rpm (845 G/rcf) também por 5 min. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* ressuspensão em 200 µL de Trizol®, sendo homogeneizado com pipetagens e vórtex. Essas amostras foram armazenadas em NL2. No grupo RNA *later*, as amostras (n=5) foram centrifugadas (10 min a 587 G/rcf) e o sobrenadante descartado. Após, foi ressuspensão o *pellet* celular em 200 µL de solução de NaCl 0,9% e novamente centrifugado (587 G/rcf) por 3 min. O sobrenadante foi removido e o *pellet* ressuspensão em 200 µL de RNA



later (R090 Sigma® Aldrich). As amostras foram armazenadas a -20°C até a extração de RNA. Para quantificação da expressão gênica, o RNA total das células coletadas foi extraído utilizando o protocolo Trizol (Life Technologies), de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação do RNA extraído foi realizada através de espectrofotômetro, considerando a taxa de absorção da relação OD260/OD280, de forma que não foram utilizadas amostras que continham valores inferiores a 1,6. O RNA total foi tratado com DNase (Amplification Grade, Life Technologies). Após a inativação da DNase (65°C – 10 min), a reação de transcrição reversa foi realizada com o kit iScript cDNA Synthesis (BioRad Hercules, CA), conforme instruções do fabricante.

A Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR) foi conduzida na máquina CFX384™ (Real Time System, BioRad), usando o fluoróforo BRYT Green® e a Taq DNA Polimerase presentes na GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), e iniciadores específicos para bovinos. Primeiramente, foi feita uma diluição seriada do cDNA a fim de gerar uma curva padrão utilizada para calcular a eficiência da reação. Todas as amostras foram analisadas em duplicata. Foi avaliada a expressão dos genes constitutivos: *PPIB* (F- GGTCATCGGTCTCTTTGGAA e R- TCCTTGATCACACGATGGAA), *GAPDH* (F- GATTGTCAGCAATGCCTCCT e R- GGTCATAAGTCCCTCCACGA), *RPL19* (F- GCCAACTCCCGTCAGCAGA e R- TGGCTGTACCCTTCCGCTT) e *18S rRNA* (F- CCTTCCGCGAGGATCCATTG e R- CGCTCCCAAGATCCAACACTAC). As variações nos níveis de expressão foram analisadas por ANOVA, com múltiplas comparações com o teste t de Student. As variáveis contínuas apresentaram distribuição normal. O nível de significância utilizado foi de 5% e os dados são representados como média ± erro padrão da média (EPM).

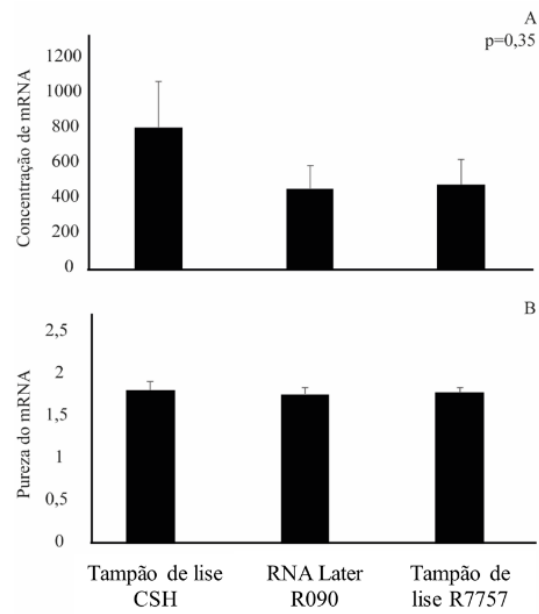
Conforme mencionado anteriormente, estudos *in vivo* e *in vitro* em diferentes espécies demonstram que o controle autócrino e parácrino da foliculogênese desempenha um papel essencial no desenvolvimento folicular. O modelo bovino possibilita estudos *in vivo* com avaliação da dinâmica folicular e obtenção de amostras através de aspiração folicular guiada por ultrassonografia (ROVANI et al., 2017). No entanto, a coleta por AF muitas vezes resulta em um baixo número de células e contaminação com células sanguíneas, o que prejudica a qualidade da amostra.

No presente estudo, as células foliculares do grupo controle, coletadas e armazenadas imediatamente em NL2, foram extraídas com protocolo idêntico aos demais grupos, mas não apresentaram quantidade de RNA satisfatório (inferiores a 30 ng/μL) para a análises de

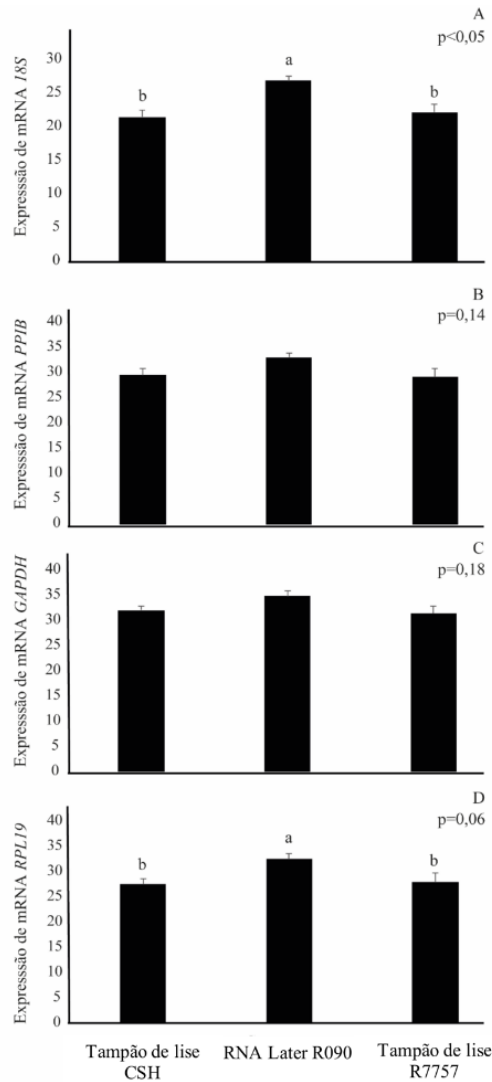
expressão gênica. Provavelmente este resultado se deve à grande quantidade de hemácias presentes no material aspirado. Como alternativa, foi avaliada a coleta com ressuspensão do *pellet* em reagente específico para a extração de RNA, como o Trizol<sup>®</sup>. Entretanto, uma das três amostras coletadas não apresentou níveis detectáveis de expressão de três genes de referência e, portanto, as amostras do grupo Trizol não foram analisadas.

Com base no exposto acima, foram avaliados os dados apenas das amostras tratadas com tampão de lise de eritrócitos e RNA later. Para impedir a coagulação das células sanguíneas e melhorar a qualidade do RNA extraído, foram utilizados os tampões de lise de eritrócitos R7757 e CSH (cloreto de amônio, bicarbonato de sódio e EDTA). Foi possível observar que o tratamento dos *pellets* celulares com os tampões de lise impediu a coagulação das células sanguíneas e possibilitou a extração de RNA de forma adequada, obtendo-se concentração (Figura 1A) e pureza (Figura 1A) de RNA adequados para as análises moleculares. Também foi possível observar que os transcritos dos genes de referência *18S rRNA* e *RPL19* foram amplificados mais precocemente quando foram utilizados os tampões de lise em comparação com a utilização de RNA later (Figura 2).

Além da relevância para estudos envolvendo modelos animais, métodos de obtenção de células da granulosa em contato com eritrócitos têm sido avaliados em amostras de fluido folicular humano obtido após aspiração folicular (AGHADAVOD et al., 2015; CHILVER et al., 2012; QUINN et al., 2006). Aghadavod et al. (2015) compararam protocolos de purificação de células da granulosa em amostras de fluido folicular humano utilizando Ficoll<sup>®</sup>, Percoll<sup>®</sup> e tampão de lise de eritrócitos e, concordando com os achados do presente estudo, concluíram que o uso de tampão de lise é o método mais conveniente para obtenção de ácidos nucléicos provenientes de células da granulosa contaminadas com eritrócitos.



**Figura 1:** (A) Concentração de RNA (ng/uL) e (B) pureza do RNA em amostras de células foliculares aspiradas de folículos dominantes, tratadas com diferentes tampões e submetidas à extração de RNA com Trizol.



**Figura 2:** Média dos ciclos de amplificação dos genes de controle interno *18S rRNA* (A), *PPIB* (B), *GAPDH* (C) e *RPL19* (D) no cDNA de células foliculares coletadas *in vivo* por aspiração folicular guiada por ultrassonografia e submetidas a diferentes técnicas de processamento.

No presente estudo, a utilização do tampão RNA later (R090; Sigma) possibilitou a obtenção de RNA para o estudo de expressão gênica. Porém, aparentemente este não é o protocolo mais indicado, pois apresentou amplificação mais tardia dos genes de referência. Além disso, esse produto é indicado para preservar a qualidade do RNA, o que não resolve o problema da contaminação da amostra com as células sanguíneas.

Os resultados encontrados no presente estudo sugerem que o tratamento dos *pellets* celulares obtidos após aspiração folicular com tampão de lise de eritrócitos possibilita uma melhor qualidade do RNA extraído. Portanto, a utilização desta metodologia possibilitará a coleta de material biológico de maneira minimamente invasiva, fornecendo amostras com melhor qualidade para estudar a regulação da expressão gênica durante a foliculogênese em bovinos.

## DIFFERENT METHODS FOR PRESERVATION OF GRANULOSA CELLS OBTAINED THROUGH FOLLICULAR ASPIRATION

### ABSTRACT

Studies investigating gene expression in follicular cells may represent the key to elucidate the mechanisms involved in follicular growth, ovulation and luteinization processes. Follicular cells can be obtained *in vivo* through ovariectomy or ultrasound-guided follicular aspiration (FA), which represents an alternative to surgical procedures. However, FA usually provides a low number of follicular cells contaminated with blood cells, which negatively affect RNA extraction and quality. In the present study, different methods to collect and preserve follicular cells using saline, Trizol<sup>®</sup>, two different red blood cells lysis buffers or RNA later<sup>®</sup> were compared. Adequate amounts of RNA and samples with higher quality were obtained when follicular cells were treated with red blood cells lysis buffers immediately after follicular aspiration, as assessed by expression of reference genes *18S rRNA*, *GAPDH*, *RPL19* and *PP1B*.

**Keywords:** Gene expression. RNA extraction. Cell lysis. RNA later. Trizol.

## DIFERENTES MÉTODOS PARA CONSERVACIÓN DE MUESTRAS DE CÉLULAS DE GRANULOSA OBTENIDAS POR ASPIRACIÓN FOLICULAR PARA LA EXTRACCIÓN DE ARN

### RESUMEN

El estudio de la expresión génica de las células foliculares puede ser la clave para el entendimiento de los procesos de crecimiento folicular, ovulación y luteinización. Las células foliculares de animales pueden ser recuperadas *in vivo* a través de la aspiración folicular (AF) guiada por ultrasonografía, una alternativa para no someter a las hembras al procedimiento quirúrgico de ovariectomía. Sin embargo, la AF comúnmente posibilita la recuperación de una pequeña cantidad de células en fluido folicular generalmente contaminado por células sanguíneas, lo que perjudica la extracción de RNA e interfiere en la calidad de la muestra. En el presente estudio se compararon la recolección y el almacenamiento de células foliculares con salina, Trizol<sup>®</sup>, dos tampones de lisis de eritrocitos

o RNA later®. Las cantidades adecuadas de ARN y muestras de mejor calidad basadas en la expresión de los genes de referencia 18S rRNA, GAPDH, RPL19 y PPIB se obtuvieron en las células foliculares tratadas con tampón de lisis celular inmediatamente después de la recolección.

**Palabras clave:** Expresión génica. Extracción de ARN. Lisis celular. ARN later. Trizol.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Edital PRONEX 12/2014, 16/2551-0000494-3). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## REFERÊNCIAS

AGHADAVOD, E.; ZARGHAMI, N.; FARZADI, L.; et al. Isolation of granulosa cells from follicular fluid; applications in biomedical and molecular biology experiments. *Advanced biomedical research*, v.4, p.250-250. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/2277-9175.170675>. Acesso em: 01 Jul, 2019. doi: 10.4103/2277-9175.170675.

ARASHIRO, E.K.; PALHAO, M.P.; WOHLRES-VIANA, S.; et al. In vivo collection of follicular fluid and granulosa cells from individual follicles of different diameters in cattle by an adapted ovum pick-up system. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.11, n.1, p.73. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1477-7827-11-73>. Acesso em: 01 Feb, 2018. doi: 10.1186/1477-7827-11-73.

CHILVERS, R. A.; BODENBURG, Y. H.; DENNER, L. A., et al. Development of a novel protocol for isolation and purification of human granulosa cells. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v.29, n.6, p.547-556, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3370046/#CR10>. Acesso em: 02 Jul, 2019. doi: 10.1007/s10815-012-9739-5

DROST, M.D.; SAVIO, J.D.; BARROS, C.M.; et al. Ovariectomy by colpotomy in the cow. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.200, p.337-342. 1992. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1548167>. Acesso em: 01 Feb, 2018.

FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; YANG, M.Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal Reproduction Science*, v.82-83, p.109-126. 2004. Disponível em:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432004000867>. Acesso em: 01 Fev, 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.031>.

Red Blood Cell Lysis Buffer. Cold Spring Harbor Protocols, v.2006, n.1, p.pdb.rec390. 2006. Disponível em: <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.rec390.short>. Acesso em: 01 Fev, 2018. doi: 10.1101/pdb.rec390.

ROVANI, M.T.; GASPERIN, B.G.; FERREIRA, R.; et al. Methods to study ovarian function in monovulatory species using the cow as a model. Animal Reproduction, v.14, n.2, p.383-391. 2017. Disponível em: [http://www.cbpa.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v14/v14n2/p383-391\(AR832\).pdf](http://www.cbpa.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v14/v14n2/p383-391(AR832).pdf). Acesso em: 01 Fev, 2018. doi: 10.21451/1984-3143-AR832.

QUINN, M. C. J.; MCGREGOR, S. B.; STANTON, J. L., et al. Purification of granulosa cells from human ovarian follicular fluid using granulosa cell aggregates. Journal of Reproduction, Fertility and Development. v.18, n.5, p.501-508, 2006. Disponível em: <http://www.publish.csiro.au/rd/ExportCitation/RD05051>. Acesso em: 02 Jul, 2019. doi: <https://doi.org/10.1071/RD05051>

SANCHEZ, R.; SCHUERMANN, Y.; GAGNON-DUVAL, L.; et al. Differential abundance of IGF1, bile acids, and the genes involved in their signaling in the dominant follicle microenvironment of lactating cows and nulliparous heifers. Theriogenology, v.81, n.6, p.771-779. 2014. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X14000259>. Acesso em: 01 Fev, 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.01.005>.

WHITE, F.J.; RUBIO, I.; LENTS, C.A.; et al. Effect of days after calving on insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor binding proteins, progesterone, androstenedione, estradiol, and aromatase mRNA in dominant follicles of postpartum beef cows. Animal Reproduction Science, v.108. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.09.004>. Acesso em: 01 Fev, 2018. doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.09.004.

### 3 Considerações Finais

A regulação dos membros da superfamília TGF $\beta$  e seus receptores já foram amplamente estudados e investigados ao longo do processo de foliculogênese e desenvolvimento folicular. Entretanto, até o presente momento ainda era pouco conhecida a regulação durante o processo de ovulação, luteinização e luteólise em bovinos. De forma geral, os resultados do segundo estudo suportam a hipótese que membros da superfamília TGF $\beta$  participam da modulação do processo de luteólise em bovinos, sendo o aumento na expressão de RNAm de *BMP4*, *BMP6*, *ACVR1B*, *INHBA* e *INHBB* observados no início do processo luteolítico, o que sugere seu envolvimento na luteólise funcional.

Além disso, os resultados do terceiro estudo in vivo demonstram que a BMP15rh influencia o processo de ovulação, pois o tratamento com essa proteína oocitária inibe o desenvolvimento folicular final e bloqueia a ovulação, sem inibir a luteinização induzida por GnRH.

No quarto estudo se identificou que o tratamento dos *pellets* celulares obtidos após aspiração folicular com tampão de lise de eritrócitos, possibilita uma melhor qualidade de RNA extraído para estudos de expressão gênica.

Evidencia-se, a importância desses estudos e seus resultados na compreensão dos mecanismos e fatores envolvidos nos eventos que controlam a dinâmica ovariana na espécie bovina. Além da geração de conhecimento para pesquisa básica, a elucidação do papel dos fatores locais na fisiologia ovariana pode contribuir com o entendimento de processos patológicos nas diferentes espécies, bem como no aprimoramento de tecnologias que tenham por objetivo a contracepção ou o aumento da taxa ovulatória. Um melhor conhecimento da regulação local também levará a um aprimoramento de técnicas reprodutivas para o tratamento da infertilidade ou a otimização da eficiência reprodutiva em espécies de animais domésticos.



## 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.

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.

CHANG, H.-M.; QIAO, J.; LEUNG, P. C. Oocyte–somatic cell interactions in the human ovary—novel role of bone morphogenetic proteins and growth differentiation factors. **Human Reproduction Update**, 2016.

CUI, X.; JING, X.; WU, X.; BI, X.; LIU, J.; LONG, Z.; ZHANG, X.; ZHANG, D.; JIA, H.; SU, D. Abnormal expression levels of BMP15/Smad1 are associated with granulosa cell apoptosis in patients with polycystic ovary syndrome. **Molecular medicine reports**, v. 16, n. 6, p. 8231-8236, 2017.

DAVIS, K. A.; KLOHONATZ, K. M.; MORA, D. S. O.; TWENTER, H. M.; GRAHAM, P. E.; PINEDO, P.; ECKERY, D. C.; BRUEMMER, J. E. Effects of immunization against bone morphogenetic protein-15 and growth differentiation factor-9 on ovarian function in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 192, p. 69-77, 2018.

DRIANCOURT, M. A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**, v. 35, n. 1, p. 55-79, 1991.

ECKERY, D. C.; MILLER, L. A.; KILLIAN, G. J.; DENICOLA, A. J. Effects of Vaccination against GDF9 and BMP15 on Fertility and Ovarian Function in the White-tailed Deer. 2014.

EPPIG, J. J.; WIGGLESWORTH, K.; PENDOLA, F.; HIRAO, Y. Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. **Biology of reproduction**, v. 56, n. 4, p. 976-984, 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, 2003a.

ERICKSON, G. F.; SHIMASAKI, S. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. **Fertility and Sterility**, v. 76, n. 5, p. 943-949, 2001.

\_\_\_\_\_. The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 1, p. 9-9, 2003b.

ESTIENNE, A.; LAHOZ, B.; JARRIER, P.; BODIN, L.; FOLCH, J.; ALABART, J.-L.; FABRE, S.; MONNIAUX, D. BMP15 regulates the inhibin/activin system independently of ovulation rate control in sheep. **Reproduction**, v. 153, n. 4, p. 395-404, 2017.

EVANS, A.; FORTUNE, J. Selection of the Dominant Follicle in Cattle Occurs in the Absence of Differences in the Expression of Messenger Ribonucleic Acid for Gonadotropin Receptors 1. **Endocrinology**, v. 138, n. 7, p. 2963-2971, 1997.

FABRE, S.; PIERRE, A.; MULSANT, P.; BODIN, L.; DI PASQUALE, E.; PERSANI, L.; MONGET, P.; MONNIAUX, D. Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, n. 1, p. 20, 2006.

FORTUNE, J. E. Follicular dynamics during the bovine estrous cycle: A limiting factor in improvement of fertility? **Animal Reproduction Science**, v. 33, n. 1, p. 111-125, 1993.

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. **Nat Genet**, v. 25, n. 3, p. 279-83, 2000.

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.

GIBBONS, J.; WILTBANK, M.; GINTHER, O. Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the follicle-stimulating hormone surge in heifers. **Biology of reproduction**, v. 57, n. 5, p. 1066-1073, 1997.

GINTHER, O.; KNOFF, L.; KASTELIC, J. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, n. 1, p. 223-230, 1989.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; DONADEU, F. X.; BERGFELT, D. R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3, p. 239-257, 2003.

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.

HANEVIK, H. I.; HILMARSEN, H. T.; SKJELBRED, C. F.; TANBO, T.; KAHN, J. A. A single nucleotide polymorphism in BMP15 is associated with high response to ovarian stimulation. **Reproductive biomedicine online**, v. 23, n. 1, p. 97-104, 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.

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, 2004.

JUENGEL, J. L.; DAVIS, G. H.; MCNATTY, K. P. Using sheep lines with mutations in single genes to better understand ovarian function. **Reproduction**, v. 146, n. 4, p. R111-R123, 2013.

KARAGÜL, M. İ.; AKTAŞ, S.; COŞKUN YILMAZ, B.; YILMAZ, M.; OREKICI TEMEL, G. GDF9 and BMP15 Expressions and Fine Structure Changes During Folliculogenesis in Polycystic Ovary Syndrome. **Balkan Medical Journal**, v. 35, n. 1, p. 43-54, 2018.

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.

KHALAF, M.; MORERA, J.; BOURRET, A.; REZNIK, Y.; DENOUAL, C.; HERLICOVIEZ, M.; MITTRE, H.; BENHAIM, A. BMP system expression in GCs from polycystic ovary syndrome women and the in vitro effects of BMP4, BMP6, and BMP7 on GC steroidogenesis. **European Journal of Endocrinology**, v. 168, n. 3, p. 437-444, 2013.

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

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.; 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.; ELSEIN, 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.

NIO-KOBAYASHI, J.; NARAYANAN, R.; GIAKOUMELOU, S.; BOSWELL, L.; HOGG, K.; DUNCAN, W. C. Expression and localization of inhibitor of differentiation (ID) proteins during tissue and vascular remodelling in the human corpus luteum. **Molecular Human Reproduction**, v. 19, n. 2, p. 82-92, 2013.

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, 2001.

PATIÑO, L. C.; WALTON, K. L.; MUELLER, T. D.; JOHNSON, K. E.; STOCKER, W.; RICHANI, D.; AGAPIOU, D.; GILCHRIST, R. B.; LAISSUE, P.; HARRISON, C. A. BMP15 Mutations Associated With Primary Ovarian Insufficiency Reduce Expression, Activity, or Synergy With GDF9. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 102, n. 3, p. 1009-1019, 2017.

PERSANI, L.; ROSSETTI, R.; DI PASQUALE, E.; CACCIATORE, C.; FABRE, S. The fundamental role of bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and its involvement in female fertility disorders. **Human Reproduction Update**, v. 20, n. 6, p. 869-883, 2014.

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.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P. C.; GONG, J. G.; ARMSTRONG, D. G. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences<sup>1,2</sup>. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. suppl\_13, p. E63-E74, 2004.

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.

ZHAO, S.-Y.; QIAO, J.; CHEN, Y.-J.; LIU, P.; LI, J.; YAN, J. Expression of growth differentiation factor-9 and bone morphogenetic protein-15 in oocytes and cumulus granulosa cells of patients with polycystic ovary syndrome. **Fertility and sterility**, v. 94, n. 1, p. 261-267, 2010.

## **Anexos**

## ANEXO I- Documento da Comissão de Ética no Uso de Animais UFSM



### UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-UFSM

#### CARTA DE APROVAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

**Título do Projeto:** "Sinalização na litogênese e luteólise em espécie monovulvária."

**Número do Parecer:** 112/2014

**Pesquisador Responsável:** Prof. Dr. Paulo Bayard Dias Gonçalves

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

**OBS:** Anualmente deve-se enviar à CEUA relatório parcial ou final deste projeto.

Os membros da CEUA-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

**DATA DE APROVAÇÃO:** 11/09/2014.

Santa Maria, 12 de setembro de 2014.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Alexandre Krause".

Prof. Dr. Alexandre Krause  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais- UFSM

## ANEXO II- Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal UFPel



Pelotas, 10 de dezembro de 2015

**De:** M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

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

**Para:** Prof. Bernardo Garziera Gasperin

*Departamento de Patologia Animal – Faculdade de Veterinária*

Senhor Professor:

A CEEAA analisou o projeto intitulado: “**Função da BMP15 e GDF9 sobre a expressão gênica das células foliculares**”, processo nº23110.008439/2015-23, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, pois está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

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

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao COBALTO para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEAA 8439-2015).

Vigência do Projeto: 15/01/2016 a 01/12/2018

Espécie/Linhagem: Bovina/ Holandês e Jersey

Nº de animais: 30

Idade: 3-12 anos

Sexo: Fêmeas

Origem: Centro Agropecuário da Palma - UFPel

**M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix**

*Presidente da CEEAA*

Ciente em: 16 / 12 / 2015

Assinatura do Professor Responsável: \_\_\_\_\_



## ANEXO III- Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal UFPel



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:

## ANEXO IV- Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal UFPel



Pelotas, 16 de novembro de 2015

**De:** M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix  
*Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)*

**Para:** Prof. Bernardo Garzeira Gasperin  
*Departamento de Patologia - Faculdade de Veterinária*

Senhor Pesquisador:

A CEEA analisou a solicitação o projeto intitulado: "**Controle da ovulação em bovinos e suínos**", processo nº23110.000288/2015-65, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, pois está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

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

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao **COBALTO** para posterior registro no **COCEPE** (código para cadastro nº **CEEA 0288-2015**).

Vigência do Projeto: 17/11/2015 a 20/12/2019

Espécie/Linhagem: Suínos e Bovinos/variados

Nº de animais: 740 suínos e 110 bovinos

Idade: 4 meses a 4 anos (suínos) e 2 a 8 anos (bovinos)

Sexo: Fêmeas

Origem: Granjas comerciais de suínos e Fazenda Experimental de Bovinos

  
\_\_\_\_\_  
**M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix**  
*Presidente da CEEA*

Ciente em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/2015

Assinatura do Professor Responsável: \_\_\_\_\_