

## REGULAÇÃO DE MEMBROS DA FAMÍLIA DOS FATORES DE CRESCIMENTO TRANSFORMANTES BETA NO AMBIENTE UTERINO

BIANCA DA SILVA AMARAL<sup>1</sup>; JULIANA GERMANO FERST<sup>2</sup>; MONIQUE MAZZOROLLO FRATA<sup>3</sup>; WAGNER MARQUES DE LIMA<sup>4</sup>; BERNARDO GARZIERA GASPERIN<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas, [biancaamaral-cavq@hotmail.com](mailto:biancaamaral-cavq@hotmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Santa Maria, [juferst@gmail.com](mailto:juferst@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas, [moniquefrata@hotmail.com](mailto:moniquefrata@hotmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas, [wagner@biotec.vet.br](mailto:wagner@biotec.vet.br)

<sup>5</sup>Univeridade Federal de Pelotas, [bggasperin@gmail.com](mailto:bggasperin@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

Estudos anteriores sugerem um envolvimento de fatores produzidos localmente no ovário, como as proteínas oocitárias GDF9 e BMP15 na regulação da esteroidogênese em bovinos e na ovulação e luteinização em ovinos. Com base no envolvimento do GDF9 na determinação da taxa ovulatória, Tang et al. (2013) identificaram dois polimorfismos (A485T e A625T) relacionados ao número de embriões transferíveis, suportando a hipótese de que mutações nos genes desta proteína também são potenciais marcadores de resposta a superovulação (SOV) em fêmeas bovinas. Quanto ao ambiente uterino, não se conhece qual o perfil de expressão gênica associado com um ambiente mais favorável aos embriões, o que determina a necessidade de identificar marcadores que influenciam no perfil endócrino e no ambiente uterino dos animais que produzem embriões de melhor qualidade.

A realização de técnicas moleculares avaliando o transcriptoma e proteoma das células endometriais, relacionando-os com a qualidade dos embriões recuperados poderia auxiliar na identificação de características favoráveis para o desenvolvimento embrionário. Sabe-se que o processo de SOV causa profundas modificações no transcriptoma do endométrio e dos embriões (FORDE et al., 2012), em parte pelos níveis mais elevados de P4 aos quais as vacas superovuladas são expostas, quando comparado com o diestro natural. Através do presente estudo, pretende-se identificar se membros da família TGF beta são regulados no ambiente uterino de vacas sob diferentes perfis endócrinos.

### 2. METODOLOGIA

Fêmeas bovinas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus* x *Bos indicus*, alocadas em programas comerciais de produção de embriões, foram submetidas a um protocolo de SOV estro-base (SOV/EB) (Lima et al., 2007). Brevemente, a SOV teve início entre oito a dez dias após detecção de um estro natural ou sincronizado. No dia de início da SOV (D1), foi iniciada a aplicação de oito doses decrescentes de FSH com intervalo de 12 h. Juntamente com a sexta e sétima dose de FSH, foi administrada prostaglandina F2 $\alpha$  para induzir a lise do CL e redução nos níveis de P4. Os animais foram observados para detecção do momento de início da manifestação estral a fim de se realizar a aplicação de uma dose de análogo de GnRH para melhor sincronização das ovulações. Às 12 e 24 h após a aplicação do GnRH foram realizadas as IA (D5). A coleta dos embriões (flushing uterino) foi realizada seis dias após a segunda IA (D12). Coletas de sangue foram realizadas em D1, D3 e D12. No D12, durante a coleta dos embriões, foram registrados dados referentes à

resposta superovulatória (número de CL) e taxa de recuperação de estruturas (número, estágio de desenvolvimento e qualidade). Ainda, as células endometriais retidas no filtro de coleta foram recuperadas da placa de busca embrionária e imediatamente acondicionadas em criotubos em botijão criogênico.

O RNA total das células endometriais foi extraído usando Trizol (Invitrogen, Brasil). Para quantificar o RNA extraído, a densidade ótica foi determinada através de espectrofotômetro (NanoDrop) e a pureza avaliada através da taxa de absorção da relação OD260/OD280. O RNA total foi tratado com DNase (Promega, Madison, WI) a 37°C por 15 min para digerir qualquer DNA contaminante. A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando o kit iScript (BioRad), seguindo as instruções do fabricante. A expressão dos genes constitutivos foi realizada por PCR em tempo real (CFX384, BioRad) com SsoFast EvaGreen supermix (CFX384, BioRad). Dosagens de progesterona foram realizadas em laboratório comercial.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Até o presente momento foram realizadas 52 coletas de embriões de doadoras das raças Angus (n=18), Brangus (n=2), Braford (n=18), Holandês (n=2), Polled Hereford (n=8) e Devon (n=4), que apresentaram diferentes perfis endócrinos no dia da coleta. Uma avaliação preliminar revelou que as células endometriais obtidas com o flushing uterino apresentam adequada concentração (acima de 200ng/μl) e pureza de RNA (relação OD260/OD280 acima de 1,8 em todas as amostras) e expressão precoce de genes de referência (dados não demonstrados), o que sugere que o material é adequado para avaliação da expressão de membros da família TGF beta no ambiente uterino.

Quanto às dosagens hormonais, inicialmente foram realizadas as avaliações das concentrações de progesterona (P4) nos dias D1, D3 e D12 do programa de SOV através de quimioluminescência (ADVIA Centaur; Siemens; Ref. 01586287). Foram observadas concentrações médias de 7,7±0,5, 7,8±0,5 e 23,6±2,1 ng/mL de P4 em D1, D3 e D12 respectivamente.

Os animais foram estratificados de acordo com o perfil endócrino, e uma análise preliminar demonstrou que vacas com concentrações de progesterona superiores a 7,7 ng/mL no início da SOV (D1), apresentaram menor taxa de estruturas não fecundadas e uma maior proporção de embriões sobre estruturas totais coletadas no D12 (P<0,05). A partir destes dados, será comparada a expressão gênica dos TGF nas células endometriais de vacas com progesterona baixa, média ou alta no dia da coleta de embriões, correlacionando a expressão com os dados de produção embrionária. Em um segundo momento, pretende-se avaliar se a suplementação de progesterona durante o tratamento superovulatório é capaz de reduzir a taxa de estruturas não fecundadas em vacas submetidas à SOV/EB, bem como regular a expressão dos membros da família TGF.

Além dos marcadores endócrinos e genéticos associados à melhores respostas à SOV, há a necessidade de se entender a relação entre o ambiente dos ovidutos e útero e viabilidade dos embriões coletadas. A análise das células do epitélio do oviduto é mais difícil, uma vez que as mesmas só podem ser obtidas mediante acesso cirúrgico. Por outro lado, células endometriais podem ser obtidas através de citologia (cytobrush), biópsias endometriais (não indicadas para fêmeas inseminadas), ou através da recuperação das células obtidas durante a lavagem uterina. Apesar de serem mais facilmente obtidas, há pouca informação sobre as características das células endometriais obtidas de vacas submetidas à SOV. A realização de técnicas moleculares avaliando o transcriptoma e proteoma das células endometriais, relacionando-os com a qualidade dos embriões recuperados

poderia auxiliar na identificação de características favoráveis para o desenvolvimento embrionário.

Estudos recentes indicam que as concentrações de progesterona durante a superovulação de fêmeas bovinas influenciam na quantidade e qualidade dos embriões obtidos (Wiley et al., 2019). Em um estudo utilizando a técnica de microarranjo (microarray), foi identificado um aumento na expressão de 795 genes e redução na expressão de 439 genes em novilhas (Charolês e Limousin) superovuladas, sete dias após inseminação artificial (IA), em comparação com novilhas com apenas uma ovulação. Maiores alterações foram observadas em genes relacionados ao ciclo e movimentação celular, metabolismo de lipídeos, vitaminas e minerais (FORDE et al., 2012). Apesar de pouco estudado, já foi demonstrado o envolvimento da família TGF na comunicação embrio-materna. PENNETIER et al. (2004) demonstraram que a expressão de BMP15 e GDF9, iniciada pelos oócitos, é mantida durante o desenvolvimento embrionário inicial. Também foi demonstrado o envolvimento de TGFs e seus receptores na comunicação embrio-materna, implantação, decidualização e desenvolvimento embrionário em diversos modelos experimentais (revisado por NI & LI, 2017).

#### 4. CONCLUSÕES

Através das amostras coletadas neste estudo, será possível identificar se os membros da família TGF beta estão associados às mudanças observadas no ambiente uterino de fêmeas bovinas sob diferentes perfis endócrinos.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FORDE, N., et al. Endometrial response of beef heifers on day 7 following insemination to supraphysiological concentrations of progesterone associated with superovulation. **Physiological Genomics**, v.44, n.22, p.1107, 2012.

LIMA, W. M., et al. Improved superovulatory response in beef cattle following ovarian follicular ablation using a simplified transvaginal device. **Anim Reprod Sci**, v.100, n.3-4, p.364-70. 2007.

PENNETIER, S., et al. Spatio-Temporal Expression of the Germ Cell Marker Genes MATER, ZAR1, GDF9, BMP15 and VASA in Adult Bovine Tissues, Oocytes, and Preimplantation Embryos. **Biology of Reproduction**, V. 71, p. 1359–1366, 2004.

Ni N, Li Q. TGF $\beta$  superfamily signaling and uterine decidualization. **Reprod Biol Endocrinol.**, v. 15(1):842017, 2017.

TANG, K. Q., et al. Polymorphisms of the bovine growth differentiation factor 9 gene associated with superovulation performance in Chinese Holstein cows. **Genet Mol Res**, v.12, n.1, p.390-9, 2013.



WILEY, C., et al. Effects of endogenous progesterone during ovarian follicle superstimulation on embryo quality and quantity in beef cows. **Theriogenology**, v.129, p.54-60. 2019