

## **Efeito da Proteína Morfogenética Óssea 15 (BMP-15) e do Hormônio Folículo Estimulante (FSH) na viabilidade e ultra-estrutura folicular**

José Jackson do Nascimento Costa<sup>1</sup>, Maria Juliane Passos<sup>3</sup>, Regislane Pinto Ribeiro<sup>2</sup>, José Renato de Sousa Passos<sup>3</sup>, Antonia Moemia Lúcia Rodrigues Portela<sup>2</sup>, José Roberto Viana Silva<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Doutorando em Biotecnologia – Renorbio, Universidade Federal do Ceará – *Campus Sobral*

\*[jackson.costa@hotmail.com](mailto:jackson.costa@hotmail.com)

<sup>2</sup>Mestranda em Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará – *Campus Sobral*

<sup>3</sup>Núcleo de Biotecnologia de Sobral – NUBIS – Universidade Federal do Ceará - *Campus Sobral*

### **Resumo**

Este estudo avaliou o efeito de BMP-15 e FSH na viabilidade e ultra-estrutura folicular de vimento de folículos secundários bovinos cultivados *in vitro* por 12 dias. Para o cultivo, folículos secundários foram microdissecados e cultivados durante 12 dias em  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> sozinho ou suplementado com BMP-15, FSH sequencial, tanto o BMP-15 e FSH ou BMP-15 a partir de D0 a D6 e FSH a partir de D7 a D12. No que diz respeito a viabilidade do folículo, todos os tratamentos foram capazes de manter a sobrevivência folicular durante 12 dias de cultivo, exceto o tratamento contendo BMP-15+FSH (D0-D12) ( $p < 0,05$ ). Além disso, os folículos cultivados neste tratamento tiveram uma redução na viabilidade com o aumento do período de cultura de 6 para 12 dias ( $p < 0,05$ ). Folículos morfológicamente normais cultivadas durante 12 dias, em diferentes tratamentos foram analisadas por MET, com exceção dos folículos cultivados com BMP-15 e FSH (D0-D12), demonstraram oócito retraído, com organelas pouco visíveis, um grande número de vacúolos intracitoplasmáticos e células da granulosa com núcleo condensado. Em conclusão, este estudo demonstrou que a combinação de BMP-15 + FSH (D0-D12) reduz a viabilidade folicular e integridade ultra-estrutural dos folículos.

**Palavras-chave:** bovinos, folículo ovariano, BMP-15

### **Introdução**

A BMP-15 é um fator de crescimento derivado do oócito e tem papel chave em diferentes aspectos do desenvolvimento folicular, incluindo recrutamento do folículo primordial, proliferação das células da granulosa e células da teca, atresia e esteroidogênese (Wu et al., 2007). Devido a sua homologia com o fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF-9) esta proteína é conhecida também como GDF-9B e está diretamente relacionada com o controle da fertilidade feminina e das funções ovarianas (Paulini e Melo, 2011). A BMP-15 é sintetizada como um pre-pro-peptídeo precursor, contendo um peptídeo sinal, um pro-domínio e um domínio maduro (Chang et al., 2002). Na BMP-

15, o resíduo de cisteína conservado é substituído por serina, e os dímeros são formados por meio de interações não-covalentes. Foi verificado que a BMP-15 poderia se ligar aos vários receptores de células da granulosa como BMPR-II, receptor de ativina tipo II, ALK-2 e ALK-6. Desses receptores, ALK-6 é o mais eficiente na ligação a BMP-15 e BMPR-II é mais eficaz na bioatividade de BMP-15 (Wu et al., 2007). A BMP-15 primeiramente liga-se ao receptor BMP tipo IB, e recruta o receptor BMP tipo II (Shimasaki et al., 2004). Silva et al. (2004) utilizando a técnica de imunohistoquímica demonstraram a presença do RNA mensageiro para BMP-15, BMPR-IA, BMPR-IB e BMPR-II em folículos primordiais, primários, secundários, bem como no oócito e células da granulosa de folículos antrais caprinos. Além disso, Lima et al., (2012) quantificaram a expressão dos receptores para BMP-15 (BMPR-IB e BMPR-II) em em todos os estágios do desenvolvimento folicular na espécie caprina.

Foi demonstrado, através de estudos *in vitro*, que a BMP-15 desempenha também um papel fundamental na regulação das funções através dos processos de mitose, proliferação, apoptose, luteinização, metabolismo e expansão através de sinalização mitogênica e transdução (Qiao e Feng, 2010), além de participar da maturação oocitária, ovulação e formação do corpo lúteo. Galloway et al. (2000) afirmaram que a BMP-15 é essencial nos estágios iniciais de desenvolvimento folicular (transição de primordial para primário), promovendo proliferação das células da granulosa e prevenindo diferenciação. Folículos com níveis elevados de BMP-15 apresentaram morfologia normal, alta taxa de clivagem e um maior número de embriões viáveis. Além disso, a BMP-15 é capaz de manter a baixa incidência de apoptose em células do cumulus (Wu et al., 2007a).

Estudos realizados com células da granulosa de ratas demonstraram que a BMP-15 recombinante (100 ng/mL) estimula a proliferação destas células independente do FSH, mas diminui os efeitos do FSH no que se refere à produção de progesterona sem afetar a produção de estradiol (Otsuka et al., 2000). Nessa mesma concentração (100 ng/mL), a BMP-15 é capaz de estimular a expressão do Kit ligand (KL) nas células da granulosa de ratas (Otsuka e Shimasaki, 2002), além de estimular a expressão do fator de crescimento epidermal (EGF) nas células do cúmulus de camundongas (Yoshino et al., 2006). Já a adição de BMP-15 (50 ng/mL) no cultivo de folículos secundários caprinos foi capaz de promover o crescimento folicular e a formação da cavidade antral, além de manter a integridade ultra-estrutural, após 18 dias de cultivo (Lima et al., 2012). Foi sugerido em estudos com ovelhas, que a BMP-15 é requerida para o desenvolvimento de folículos pré-ovulatórios (Juengel et al., 2002).

## **Objetivos**

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de BMP-15 e FSH, isoladamente ou em diferentes associações sobre a integridade e viabilidade ultraestrutural de folículos bovinos cultivados *in vitro* durante 12 dias.

## Material e métodos

Ovários (n = 40) de vacas adultas (*Bos taurus*) foram coletados em abatedouro local imediatamente após o abate. Após a coleta, os ovários foram lavados uma vez em álcool 70% por cerca de 10s, por duas vezes em solução salina 0,9%, e transportados em Meio Mínimo Essencial ( $\alpha$ -MEM) suplementado com 100  $\mu$ g/mL de penicilina e estreptomicina, e em seguida, transportados ao laboratório à 4°C por até 1 hora. No laboratório, os ovários foram microdissecados cuidadosamente em  $\alpha$ -MEM. Resumidamente, foram retirados fragmentos da região cortical do ovário (1-2 mm de espessura), de onde os folículos pré-antrais de aproximadamente 0,18 mm de diâmetro, foram visualizados sob o estereomicroscópio e isoladas manualmente usando agulhas 26G acopladas a uma seringa. Após isolamento, os folículos foram transferidos para gotas de 100 $\mu$ L de meio fresco ( $\alpha$ -MEM), à temperatura ambiente para a avaliação. Folículos com um oócito visível, rodeado por células da granulosa, uma membrana basal intacta e sem cavidade antral foram selecionados para o cultivo. Após a seleção, os folículos foram cultivados individualmente em gotas de 100 $\mu$ L de meio de cultura em placas de petri (60 x 15 mm; Corning, Lowell, MA, EUA), sob óleo mineral, durante 12 dias a 39°C e 5% CO<sub>2</sub> no ar. O meio de cultivo de base consistiu  $\alpha$ -MEM (pH 7,2-7,4) suplementado com 3 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), ITS (10  $\mu$ g/mL de insulina, 5,5  $\mu$ g/mL de transferrina e 5 ng/mL de selênio), 2 mM de glutamina, 2 mM de hipoxantina e 50  $\mu$ g/mL de ácido ascórbico. Folículos foram distribuídos aleatoriamente em cinco tratamentos,  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> (controle), BMP-15 (50 ng/mL), FSH sequencial (D0 - D6: 50 ng/mL e D7 - D12: 100 ng/mL), BMP-15 + FSH sequencial (D0 - D12), BMP-15 (D0 - D6: 50 ng/mL) + FSH (D7 - D12: 100 ng/mL). A cada dois dias, 60  $\mu$ L de meio de cultivo foi substituído por meio fresco, exceto no dia 6, em que foi realizada a troca total. Durante o cultivo os folículos foram classificados de acordo com características morfológicas e sinais de degeneração morfológica, tais como enegrecimento do oócito e células do *cumulus*, ou ainda oócitos deformados. O cultivo foi repetido 5 vezes, e pelo menos 35 folículos foram utilizados em cada tratamento. No final do período de cultivo de 12 dias, em cada tratamento, os folículos passaram por uma avaliação da viabilidade (n = 7) e integridade ultra-estrutural (n = 7).

Para a avaliação da viabilidade folicular por microscopia de fluorescência, os folículos foram ainda analisados utilizando marcadores fluorescentes. No final do cultivo, os folículos foram incubadas em gotas de 100  $\mu$ L de  $\alpha$ -MEM contendo 4 mM calceína-AM e 2  $\mu$ M de etídio

homodímero-1 (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha), a 37°C durante 15 min. Em seguida, os folículos foram lavadas três vezes em  $\alpha$ -MEM e examinados sob um microscópio de fluorescência DMLB (Leica, Wetzlar, Alemanha). Os sinais fluorescentes emitidos da calceína-AM e do etídio homodímero-1 foram detectados à 488 e 568 nm, respectivamente. Os oócitos e as células da granulosa foram considerados vivos se o citoplasma foi marcado de forma positiva com calceína-AM (verde) e se cromatina não foi marcada com etídio homodímero-1 (vermelho).

Para a análise ultraestrutural dos folículos pré-antrais bovinos cultivados, foi utilizada a a microscopia eletrônica de transmissão (MET). No final do período de cultivo, os folículos foram fixadas em solução de Karnovsky (paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M - pH 7,2) durante pelo menos 3 horas à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). Após a fixação, os folículos cultivados foram embebidos em gotas de 4% de agarose, e mantidos em tampão cacodilato de sódio. Os espécimes foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1%, 0,8% e ferricianeto de potássio, 5 mM de cloreto de cálcio em 0,1 M de tampão de cacodilato de sódio, durante 1 h à temperatura ambiente, em seguida, foram lavados em tampão de cacodilato de sódio e contrastadas com acetato de uranilo a 5%. As amostras foram em seguida desidratadas por meio de um gradiente de soluções de acetona e em seguida incorporada em resina epóxi (Epoxy Embedding-Kit, Fluka Chemika-BioChemika). Depois, secções semi-finas (2  $\mu$ m) foram cortadas, coradas com azul de toluidina e analisados por microscopia de luz, com uma ampliação de 400 $\times$ . Secções ultra-finas (70 nm) foram obtidas a partir de folículos pré-antrais morfológicamente classificadas como normal em secções semi-finas. Posteriormente, cortes ultra-finos foram contra-corados com acetato de uranila e citrato de chumbo, e examinada sob um microscópio eletrônico de transmissão Morgani-FEI.

## **Resultados**

Quanto a viabilidade folicular, nossos resultados mostraram quem, em todos os tratamentos, a manutenção da sobrevivência folicular e viabilidade foram mantidas durante os 12 dias de cultivo, de forma semelhante ao dia 0, excetuando-se o tratamento que continha BMP-15 e FSH durante todo o período de cultivo. (D0-D12) ( $p < 0,05$ ). Além disso, os folículos cultivados neste tratamento tiveram uma redução na viabilidade com o aumento do período de cultura de 6 para 12 dias ( $p < 0,05$ ) (Tabela 3). A viabilidade dos folículos, que haviam sido considerados morfológicamente normal, foi estabelecida por coloração com calceína-AM. Nesta análise, tanto o oócito e as células da granulosa foram positivamente coradas em verde, indicando a viabilidade do folículo inteiro.

No que se refere ao estudo da integridade ultra estrutural dos folículos cultivados, foi evidenciado que folículos morfológicamente normais cultivadas durante 12 dias, em diferentes tratamentos foram avaliados por MET. Com exceção de folículos cultivados com tanto BMP-15 e

FSH (D0-D12), os folículos mostraram oócitos com citoplasma homogêneo, núcleo arredondado, numerosas mitocôndrias e zona pelúcida regular, evidenciando que os folículos apresentavam-se normais. As células da granulosa apresentaram-se bem organizadas em torno do oócito, tinham numerosas mitocôndrias e abundante retículo endoplasmático liso. Círculos concêntricos de retículo endoplasmático também eram visíveis nas células da granulosa, após o cultivo. Além disso, folículos cultivados em meio contendo os BMP-15 e FSH (D0-D12) apresentaram um oócito retraído com organelas pouco visíveis, um grande número de vacúolos intracitoplasmáticos e células da granulosa com núcleo condensado.

### Conclusões

Em conclusão, este estudo demonstrou que a proteína BMP-15 e FSH sozinho desempenha um papel importante no desenvolvimento folicular bovino. Além disso, a combinação de BMP-15 + FSH (D0-D12) durante o cultivo por 12 dias reduz a viabilidade folicular, afetando a integridade ultra-estrutural dos folículos.

### Referências Bibliográficas

- Chang H, Brown CW, Matzuk MM.** Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev*, v. 23, p. 787–823, 2002.
- Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MP, Juengel JL, Jokiranta TS, McLaren RJ, Luiro K, Dodds KG, Montgomery GW, Beattie AE, Davis GH, Ritvos O.** Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nature Genetics*, v. 25, p.279-283, 2000.
- Lima IMT, Brito IR, Rossetto R, Duarte ABG, Rodrigues GQ, Saraiva MVA, Costa JJN, Donato MAM, Peixoto CA, Silva JRV, Figueiredo JR, Rodrigues APR.** BMPRII and BMPRII mRNA expression levels in goat ovarian follicles and the in vitro effects of BMP-15 on preantral follicle development. *Cell Tissue Res*, v.348, p.225–238, 2012.
- Paulini F, Melo EO.** The role of oocyte-secreted factors GDF9 and BMP15 in follicular development and oogenesis. *Reprod Domest Anim*, v.46, p.354–361, 2011.
- Qiao J, Feng HL.** Extra- and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence. *Hum Reprod Update*, v.0, p.1–19, 2010.
- Shimasaki S, Moore KR, Otsuka F, Erickson GF.** The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endoc Rev*, v.25, p.72-101, 2004.
- Silva JRV, Van Den Hurk R, Van Tol HTA, Roelen BAJ, Figueiredo JR.** Expression of growth differentiation factor-9 (GDF-9), bone morphogenetic protein 15 (BMP-15) and BMP receptors in the ovaries of goats. *Mol Reprod Dev*, v.70, p.11-19, 2004.

**Wu YT, Tang L, Cai J, Lu XE, Xu J, Zhu XM, Luo Q, Huang HF.** High bone morphogenetic protein-15 level in follicular fluid is associated with high quality oocyte and subsequent embryonic development. *Hum Reprod*, v.22, n.6, p.1526–1531, 2007.