

Controle parácrino da foli- culogênese em ovinos

Carlos José Hoff de Souza
Jaume, CM
Moraes, JCF

O crescimento dos folículos ovarianos é controlado da forma endócrina clássica através do estímulo das gonadotrofinas hipofisárias (FSH e LH) que são reguladas por retroalimentação pelos hormônios produzidos pelo ovário, notadamente os esteróides e a inibina. Entretanto, a foliculogênese também sofre regulação parácrina através de fatores de crescimento produzidos dentro do próprio ovário pelos diversos tipos celulares nele contidos. Desde o início desta década fatores de crescimento da família das Proteínas Morfogenéticas de Osso (BMP) que são membros da super-família do Fator de Crescimento Transformante (TGF) beta estão sendo apontados como chaves no controle local do crescimento folicular ovariano (ver revisão Shimasaki et al. 2004). Inicialmente estas proteínas foram descritas em roedores como produto das células da teca com ação sobre as células da granulosa (Shimasaki et al. 1999). Mais tarde, houve um incremento no volume de evidências, demonstrando que o ovócito também tem um papel fundamental na regulação das células somáticas do folículo ovariano (Eppig, 2001; Braw-tal, 2002).

Embrapa Pecuária Sul, Cx. Postal 242, CEP 96401-970, Bagé, RS
(csouza@cppsul.embrapa.br)

Controle parácrino da

2007

SP-2007.00041



10936-1



Normalmente, a experimentação sobre regulação local da foliculogênese é realizada em roedores, mas ovelhas com mutações em genes que codificam para proteínas da família das BMPs ou para seus receptores são excelentes modelos biológicos para demonstrar a importância destas proteínas no controle parácrino ou local da foliculogênese (para revisão ver Souza et al., 2004).

As BMPs agem através de receptores serina/treonina com um único domínio transmembrana, que existem como dois subtipos, tipo 1 e tipo 2 sendo que este último é constitutivamente fosforilado. Ambos os tipos possuem baixa afinidade pelo ligante quando de forma isolada, mas quando em associação são capazes de ligação de alta afinidade. A ligação do ligante ao receptor tipo 2 em associação com o do tipo 1 leva a formação de um complexo heterotetramérico de receptores e fosforilação do receptor tipo 1. Depois que o receptor tipo 1 foi fosforilado, este transfosforila proteínas Smad do citoplasma da célula (Smad 1,5 ou 8), estas então heterodimerizam com o Smad comum (Smad 4). Este complexo de proteínas Smad fosforilado migra para o núcleo da célula e se associa com fatores de transcrição nucleares ativando a transcrição dos genes alvo (Massague, 1998; Miyazono et al., 2001).

Nos ovários dos ovinos, os receptores para BMPs (BMPR) estão localizados predominantemente na camada granulosa dos folículos, desde o estágio de folículo primário até o de folículo antral grande (BMPR1A, BMPR1B and BMPR2). Embora eles também estejam presentes no ovócito, corpo lúteo, epitélio superficial do ovário e em menor intensidade na camada da teca do folículo (Souza et al., 2002).

Nos ovinos, o mRNA para o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF9) está localizado nos ovócitos dos folículos desde o estágio de primordial até o de folículo antral grande (Bodensteiner et al., 1999), enquanto que a expressão de mRNA da BMP5 começa nos ovócitos dos folículos primários

(Galloway et al., 2000). Análises de *Northern Blot* de tecidos ovinos demonstraram que BMP 4 e 7 são fortemente expressas nas células da granulosa e da teca, BMP2 está localizada na camada granulosa e BMP6 é expressa no ovócito (Souza et al., 2003).

O fenótipo Booroola foi identificado em ovelhas Merino na Austrália, no final da década de 70, como sendo causado por um gene principal com efeito aditivo sobre a taxa de ovulação (TO) e dominância sobre o tipo de parto (Bindon, 1984). Os genótipos Booroola foram inicialmente classificados de acordo com a segregação da TO em ovelhas Merino e Romney. Ovelhas com uma TO de dois ou menos foram classificadas como homozigotas não portadoras (++), heterozigotas com TO entre 3 e 4 (B+) e homozigotas portadoras (BB) fêmeas com mais de 5 ovulações por ciclo. Nos machos não foi evidenciado nenhum fenótipo, sendo, portanto, o genótipo atribuído com base na genealogia e na TO das filhas (Davis et al., 1982; Bindon, 1984). Recentemente, este fenótipo foi associado com uma mutação de ponto no domínio da quinase do gene do receptor para proteínas morfogenéticas de osso 1 B (BMPR1B), causada por uma transição de A para G na posição 746, substituindo uma glutamina no alelo normal por uma arginina na posição 246 (Q246R) da proteína mutante (Mulsant et al., 2001; Souza et al., 2001; Wilson et al., 2001)

A principal característica das ovelhas prolíficas Booroola é a diferenciação precoce dos folículos ovarianos, os quais ovulam com um diâmetro menor mas em maior número que nos animais do tipo selvagem (Baird & Campbell, 1998; Souza et al., 2003). Em células HEK-293, co-transfectadas com BMPR1B e BMPR2 resultou numa construção repórter BMP específica que era ativada pela BMP4. Entretanto, quando o receptor BMPR1B com a mutação Q249R foi usado na construção a resposta a BMP4 foi abolida. (Fabre et al., 2003). Esta redução na função do receptor também é ilustrada pelo fato de células da granulosa obtidas de ovelhas homozigotas mutantes quando cultivadas in vitro são 3 vezes menos responsivas à inibição da produção

de progesterona induzida pela BMP4 que células obtidas de ovelhas sem a mutação (Fabre et al., 2003).

Outro mecanismo de ação proposto para a mutação Q249R é a redução da função biológica da BMP6, que inibe a ação da adenil ciclase, o que levaria a um aumento da ação do FSH sem alteração na sua concentração sérica nem na cinética de ligação com o receptor (Shimasaki et al., 2003).

O ovócito produz, entre outras proteínas, dois fatores de crescimento com estrutura muito relacionada, o GDF9 e a BMP15. Mutações naturalmente ocorridas em qualquer um destes fatores de crescimento causam aumento da TO em ovelhas heterozigotas e infertilidade em fêmeas homozigotas (Galloway et al., 2000; Hanrahan et al., 2004). Nos ovinos, ambos fatores de crescimento são indispensáveis para o crescimento folicular ovariano, pois imunização ativa contra estas proteínas causa bloqueio de desenvolvimento, além do estágio de folículo primário (Juengel et al., 2002).

O mecanismo de ação inicialmente proposto para mutação Inverdale indicava que a substituição de uma valina por um aspartato na região do peptídeo maduro preveniria a formação dos dímeros que é a forma biologicamente ativa da proteína (Galloway et al., 2000). Entretanto, estudos com células transfectadas com BMP15, GDF9 ou ambos demonstraram que eles podem formar homodímeros quando expressos individualmente e heterodímeros quando co-expressos. Quando GDF9 e BMP15 são co-expressos, o processamento de ambas pro-proteínas é diminuído, quando comparado com a atividade de processamento que ocorre quando estas pro-proteínas são expressas individualmente, sugerindo que os heterodímeros são menos susceptíveis à clivagem proteolítica. Células que somente expressam BMP15 com a mutação Inverdale formam dímeros não covalentes embora a eficiência do processamento da pro-proteína mutante seja significativamente menor que a do tipo selvagem, mas quando a BMP15 com a mutação Inverdale é co-expressa com GDF9

o processamento e secreção da BMP15 mutante é abolido e acompanhada por uma redução severa no processamento do GDF9 (Liao et al., 2003). Estes resultados demonstraram que a interação entre a BMP15 com a mutação Inverdale e o GDF9 ocorre durante o processamento pós-transcricional já que a expressão de mRNA do GDF9 não é afetada (Liao et al., 2003). Estes resultados são corroborados porque ovelhas homozigotas Inverdale tem níveis de expressão de mRNA para GDF9 similares a animais sem a mutação (Bodensteiner et al., 2000). Outra linha de evidência para a interação entre BMP15 e GDF9 vem do fato de animais com mutações em um alelo dos dois genes tem TO mais elevada animais heterozigotos em somente um dos genes (Hanrahan et al., 2004)

Na BMP15 as mutações Hanna e Galway introduzem um codon de parada prematuros e que provavelmente resulta que proteína madura não seja processada (Galloway et al., 2000; Hanrahan et al., 2004). A mutação Belclare na serina 99 da BMP15 madura ocorre num resíduo que é altamente conservado nos membros da super-família do TGF beta, o qual é essencial para ligação com o receptor tipo 2 (Hanrahan et al., 2004).

A mutação High Fertility ocorre numa região do gene do GDF9 que muito provavelmente está envolvida com a ligação com o receptor tipo 1 mas que também pode afetar a ação biológica da proteína pela redução da estabilidade do dímero (Hanrahan et al., 2004).

O mecanismo de ação de mutações em genes das BMPs mostra claramente o papel chave que esta família de proteínas tem na função ovariana pelos fenótipos reprodutivos das fêmeas. Ao mesmo tempo, são um modelo alternativo aos roedores, para estudo do controle parácrino da foliculogênese.

Referências bibliográficas

BAIRD, D. T.; CAMPBELL, B. K. Follicle selection in sheep with breed differences in ovulation rate. *Molecular and Cellular Endocrinology*, London, v. 145, n. 1-2, p. 89-95, 1998.

BINDON, B. M. Reproductive biology of the Booroola Merino sheep. *Australian Journal of Biological Science*, Melbourne, v.37, n. 3, p. 163-89, 1984.

BODENSTEINER, K.J. et al. Molecular cloning of the ovine Growth/Differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biology of Reproduction*, Madison, v. 60, n. 2, p. 381-6, 1999.

BODENSTEINER, K.J. et al. Expression of Growth and Differentiation Factor-9 in the Ovaries of Fetal Sheep Homozygous or Heterozygous for the Inverdale Prolificacy Gene (FecXI). *Biology of Reproduction*, Madison, v. 62, n. 6, p.1479-1485, 2000.

BRAW-TAL, R. The initiation of follicle growth: the oocyte or the somatic cells? *Molecular and Cellular Endocrinology*, London, v. 187, n. 1-2, p. 11-18, 2002.

DAVIS, G.H. et al. Segregation of a major gene influencing fecundity in progeny of Booroola sheep. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, Wellington, v. 25, p. 525-529, 1982.

EPPIG, J.J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, London, v. 122, n. 6, p. 829-38, 2001.

FABRE, S. et al. The Booroola mutation in sheep is associated with an alteration of the bone morphogenetic protein receptor-IB functionality. *Journal of Endocrinology*, Manchester, v. 177, n. 3, p. 435-44, 2003.

GALLOWAY, S.M. et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nature Genetics*, New York, v. 25, n. 3, p. 279-83., 2000.

HANRAHAN, J.P. 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*, Madison, v. 70, p. 900-909, 2004.

JUENGEL, J.L. et al. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biology of Reproduction*, Madison, v. 67, n. 6, p. 1777-1789, 2002.

LIAO, W.X. et al. Effect of intracellular interactions on the processing and secretion of bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) and growth and differentiation factor-9. Implication of the aberrant ovarian phenotype of BMP-15 mutant sheep. *Journal of Biological Chemistry*, Birmingham, v. 278, n. 6, p. 3713-3719, 2003.

MASSAGUE, J. TGF-beta signal transduction. *Annual Reviews of Biochemistry*, Palo Alto, v. 67, p. 753-791, 1998.

MIYAZONO, K. et al. Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *Journal of Cell Physiology*, Maryland, v. 187, n. 3, p. 265-276, 2001.

MULSANT, P. et al. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. *Proceedings of the National Academy of Science U S A*, Standford, v. 98, n. 9, p. 5104-5109, 2001.

SHIMASAKI, S. et al. The role bone morphogenetic proteins in ovarian function. *Reproduction Supplement*, London, v. 61, p. 323-337, 2003.

SHIMASAKI, S. et al. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocrine Reviews*, Galveston, v. 25, n. 1, p. 72-101, 2004.

SHIMASAKI, S. et al. A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *Proceedings of the National Academy of Science U S A*, Standford, v. 96, n. 13, p. 7282-7287, 1999.

SOUZA, C.J. et al. Effect of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on oestradiol and inhibin A production by sheep granulosa cells, and localization of BMP receptors in the ovary by immunohistochemistry. *Reproduction*, London, v. 123, n. 3, p. 363-369, 2002.

SOUZA, C.J. et al. Bone morphogenetic proteins and folliculogenesis: lessons from the Booroola mutation. *Reproduction Supplement*, London, v. 61, p. 361-370, 2003.

SOUZA, C.J. et al. Mechanisms of action of the principal prolific genes and their application to sheep production. *Reproduction Fertility and Development*, Collingwood, v. 16, n. 4, p. 395-401, 2004.

SOUZA, C.J. et al. The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPRII) gene. *Journal of Endocrinology*, Manchester, v. 169, n. 2, p. 1-6, 2001.

WILSON, T. et al. Highly Prolific Booroola Sheep Have a Mutation in the Intracellular Kinase Domain of Bone Morphogenetic Protein II Receptor (ALK-6) That Is Expressed in Both Oocytes and Granulosa Cells. *Biology of Reproduction*, Madison, v. 64, n. 4, p. 1225-1235., 2001.