

## PRORENINA INDUZ A SÍNTESE DE PROGESTERONA VIA RECEPTOR DE PRORENINA EM BOVINOS

Amanda Krummenauer<sup>1\*</sup>, Andressa M. P. Dau<sup>1</sup>, Matheus P. De Cesaro<sup>1</sup>, Juliana G. Ferst<sup>1</sup>, Gabrielle R. E. Correa<sup>1</sup>, Monique T. Rovani<sup>1</sup>, Kalyne Bertolin<sup>1</sup>, Alfredo Q. Antoniazzi<sup>1</sup>, Paulo B. D. Gonçalves<sup>1\*\*</sup>.

1. Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal (BIOREP), UFSM

\* Apresentadora

\*\*Orientador

### Resumo:

O sistema renina-angiotensina participa dos eventos reprodutivos em diferentes espécies, mas o papel do receptor de prorenina ((P)RR) no corpo lúteo ovariano não está claro. Neste estudo, avaliou-se o efeito da prorenina na síntese de progesterona (P4). Utilizando a espécie bovina como modelo *in vivo*, a injeção intrafolicular de alisquireno (inibidor do (P)RR), resultou na redução da síntese de P4 no dia 6 após tratamento. Em cultivo *in vitro* de tecido lúteo de ovários bovinos, ocorreu síntese de P4 mesmo em tratamento com saralalina (antagonista do receptor para angiotensina II), entretanto, este efeito foi inibido por alisquireno. Prorenina induziu a fosforilação de ERK1/2, e a síntese de P4 foi reduzida na presença do inibidor de ERK1/2. Ainda, o uso do inibidor de EGFR bloqueou a síntese de P4 induzida pela prorenina *in vitro*. Dessa forma, reportamos que prorenina promove a síntese de P4 agindo sobre (P)RR, um processo que, em cultivos, foi mediado pelas vias ERK1/2 e EGF.

**Autorização legal:** Todos os procedimentos experimentais com animais foram revisados e aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Maria (nº.115/2014), de acordo com normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA; Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação).

**Palavras-chave:** ATP6AP2; luteinização; corpo lúteo.

**Apoio financeiro:** CAPES, FAPERGS e CNPq.

**Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição:** UFSM.

### Introdução:

A elucidação sobre os mecanismos celulares envolvidos na luteinização tem importante papel como base para a resolução de problemas reprodutivos e aplicação de biotecnologias na reprodução animal. A prorenina é um dos principais componentes do sistema renina-angiotensina (RAS), um mecanismo de ajuste e manutenção da pressão sanguínea. Nesse sistema, a renina, ativada após clivagem da prorenina, é sintetizada nos rins e liberada na circulação, na qual atua clivando angiotensinogênio (AOG) para formar Ang I, que por sua vez, sob ação da enzima conversora da angiotensina (ECA), é clivada para formar a angiotensina II (Ang II), considerada o principal efetora do RAS (NGUYEN et al., 2002; URAOKA et al., 2009).

Posteriormente à identificação dos componentes do RAS, o receptor de (pro)renina ((P)RR), ATP6AP2, foi descrito por Nguyen em 2002. Este receptor possui a capacidade de mediar as ações de renina e de prorenina formando uma via de sinalização intracelular independente da Ang II, desempenhando suas funções pela ligação ao (P)RR, pelo qual a prorenina apresenta afinidade duas a três vezes maior que a renina (NABI et al., 2009). A prorenina também participa da formação da Ang I e, conseqüentemente, atua na via dependente da Ang II (NGUYEN et al., 2002; URAOKA et al., 2009; FERRI et al., 2011).

Com base em dados obtidos em células não reprodutivas, em resposta à ligação de prorenina ao (P)RR, ocorre a transativação do receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR), via cascata de sinalização intracelular pela fosforilação de ERK1/2 independentemente da Ang II (URAOKA et al., 2009). As vias de sinalização supracitadas também são descritas como essenciais para que ocorra a ovulação, e conseqüentemente, luteinização (KOBAYASHI et al., 2001; FERREIRA et al., 2007).

A possibilidade de participação do (P)RR foi sugerida durante eventos fisiológicos ovarianos, como divergência folicular e reinício da meiose. Além disso, estudos identificaram a presença de (P)RR nas células da teca, granulosa, corpo lúteo de bovinos e complexos cumulus-oócitos (FERREIRA et al., 2011; DAU et al., 2016), entretanto, seu papel no corpo lúteo (CL) durante a luteinização não está esclarecido.

Neste estudo, objetivou-se avaliar o efeito da prorenina na síntese de P4 durante a luteinização em bovinos, e identificar a cascata de sinalização que resulta na indução da síntese de P4, avaliando a fosforilação de ERK1 e ERK2 e via EGFR.

### Metodologia:

A função do (P)RR intrafolicular para a síntese de P4 foi analisada *in vivo*, empregando bovinos. Para isso, 20 vacas foram submetidas à sincronização do ciclo estral e avaliação via ultrassonografia (US) quanto à presença de folículos preovulatórios ( $\geq 12$  mm de diâmetro). Os animais com folículo  $\geq 12$  mm de diâmetro

receberam 100 µg de GnRH intramuscular, e injeção intrafolicular de alisquireno (inibidor de (P)RR; n = 6) ou veículo (PBS; n = 4). A concentração final de alisquireno (10 µmol/L) foi calculada com base na estimativa do volume de fluido folicular. A ocorrência da ovulação foi monitorada via US, e nos dias 6 e 8 após o tratamento intrafolicular, foi coletado sangue da veia jugular para mensuração de P4 sérica via eletroquimioluminescência.

A fim de avaliar a resposta do luteal frente a tratamentos *in vitro*, foi utilizado cultivo de células de corpo lúteo de ovários bovinos. Em vista disso, foram obtidos ovários de fêmeas bovinas em um abatedouro. Foram selecionadas amostras de corpos lúteos (CL) com diâmetro de 10 a 20 mm, dissecadas e digeridas por 1h a 37 °C em meio modificado de Dulbecco, contendo 1 mg/mL de colagenase. As células foram lavadas em meio de cultura, filtradas e cultivadas em placas de 90 mm, em ambiente controlado, durante cinco dias. Ao final desse período, foram tripsinizadas e semeadas em placas de 96 poços na concentração de  $3 \times 10^4$  células viáveis por poço, e novamente cultivadas por 12 h. A viabilidade celular foi determinada através de coloração e citometria (FACSVerse TM, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) com iodeto de propídeo (50µg/mL) e FITC 123 Anexina V (5 µL; BD Biosciences). A viabilidade das replicatas foi superior a 85%.

O efeito da prorenina na síntese de P4 foi determinado cultivando tecido lúteo com diferentes doses de prorenina (0.1; 1; e 10 nmol/L) por 4 h, e quantificado por imunoenensaio de eletroquimioluminescência. A importância da via extracelular do (P)RR para a síntese de P4, e seu efeito independente da via Ang II, por sua vez, foram avaliadas através dos seguintes tratamentos: 1) controle; 2) 1 µmol/L Ang II; 3) 1 µmol/L Ang II + 10 µmol/L saralasin; 4) 1 nmol/L prorenina; 5) 1 nmol/L prorenina + 10 µmol/L alisquireno; e 6) 1 nmol/L prorenina + 10 µmol/L saralasin.

O mecanismo de sinalização intracelular pelo qual a prorenina induz a síntese de P4 foi investigado através de cultivo de tecido lúteo tratado com prorenina (0.1; 1; e 10 nmol/L) por 20 min, para avaliação da fosforilação de ERK1/2 por Western Blot. Buscando determinar o envolvimento das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) na síntese de P4, foi realizado um cultivo com suplementação de prorenina e bloqueador para fosforilação de ERK1/2 (PD0325901) ou inibidor de EGFR (AG1478), nos sistemas de cultivo: 1) controle; 2) 1 nmol/L prorenina; 3) 1 nmol/L prorenina + 1 µmol/L PD0325901; e 4) 1 nmol/L prorenina + 5 µmol/L AG1478. A quantificação de P4 foi realizada por imunoenensaio de eletroquimioluminescência.

### Resultados e Discussão:

Em resposta à inibição intrafolicular do (P)RR utilizando alisquireno, foi evidenciada uma redução na síntese de P4 no dia 6 após o tratamento, conforme demonstrado na figura 1 ( $P < 0.05$ ). Esse resultado demonstra que o (P)RR no foliculo preovulatório é necessário para a síntese de P4 durante a luteinização. Nessa análise, somente foram consideradas as vacas que ovularam.

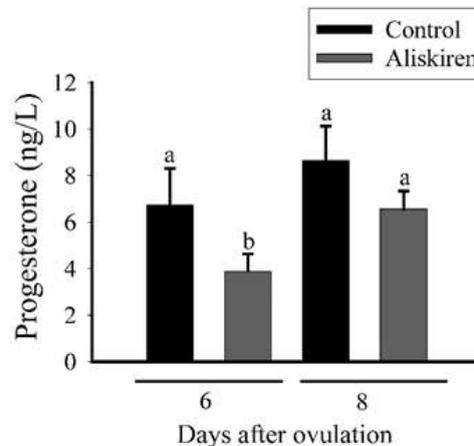


Figura 1. Efeito alisquireno intrafolicular sobre os níveis de progesterona, em vacas que receberam o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Progesterona sérica (ng/mL) nos dias 6 e 8 após a administração de GnRH e injeção intrafolicular de de alisquireno (n = 4) ou veículo (controle; n = 4) em vacas que ovularam.

A prorenina na concentração de 1 nmol/L aumentou os níveis de P4 no cultivo *in vitro*, e esse efeito foi inibido quando utilizado alisquireno ( $P < 0.05$ ), indicando que a ligação entre (P)RR e prorenina regula positivamente a produção de P4 pelas células lúteas. Quando realizada a suplementação no cultivo com saralasin, inibindo a produção de P4 via Ang II, a produção de P4 foi induzida via ligação de prorenina e (P)RR (figura 2). Esse resultado confirma o efeito da ligação prorenina e (P)RR na síntese de P4 corroborando com os dados obtidos *in vivo*.

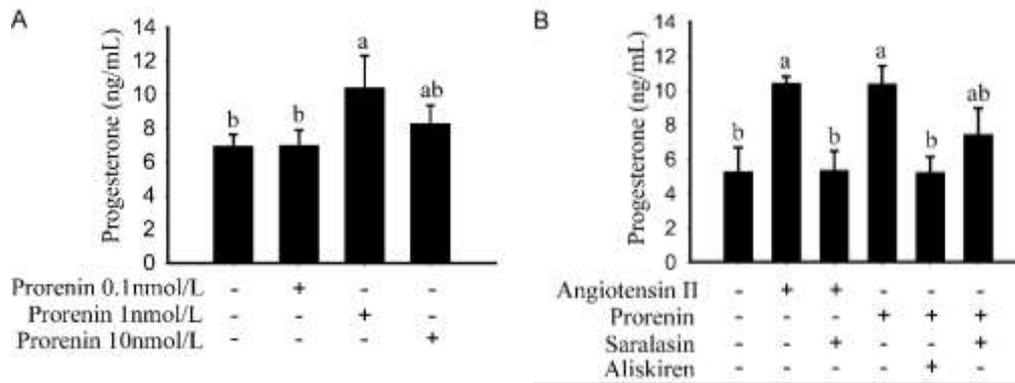


Figura 2. Efeito da prorenina sobre os níveis de progesterona via (P)RR no cultivo de tecido lúteo bovino. Efeito dose-resposta de prorenina (A), e diferentes combinações de componentes (B), 1  $\mu$ mol/L Ang II, 1  $\mu$ mol/L Ang II + 10  $\mu$ mol/L saralasin, 1 nmol/L prorenina, 1 nmol/L prorenina + 10  $\mu$ mol/L aliskireno, e 1 nmol/L prorenina + 10  $\mu$ mol/L saralasin, sobre os níveis e progesterona (ng/mL) no meio de cultura de tecido lúteo bovino após 4 h de tratamento.

No presente estudo, prorenina na concentração de 10 nmol/L foi capaz de induzir a fosforilação de ERK1/2, dessa forma, esta concentração de prorenina foi utilizada no cultivo com os inibidores PD0325901 e AG1478. Quando utilizado o inibidor PD0325901, o efeito estimulatório da prorenina para a secreção de P4 não foi completamente interrompido (figura 3) ( $P < 0.05$ ). Em contraste, o inibidor de EGFR, AG1478, bloqueou a síntese de P4 induzida pela prorenina nas células ( $P < 0.05$ ).

Esses resultados sugerem que a prorenina estimula a síntese de P4 via ERK1/2 e suportam o possível envolvimento de outras vias de sinalização, como a via Ang II (FERREIRA et al., 2007). A transativação de EGFR pode ser um importante mediador da secreção de P4 dependente de prorenina no CL bovino. Esse resultado suporta um papel para EGF / EGFR na síntese de P4, como já demonstrado em estudos em ratos (PENG et al., 1991).

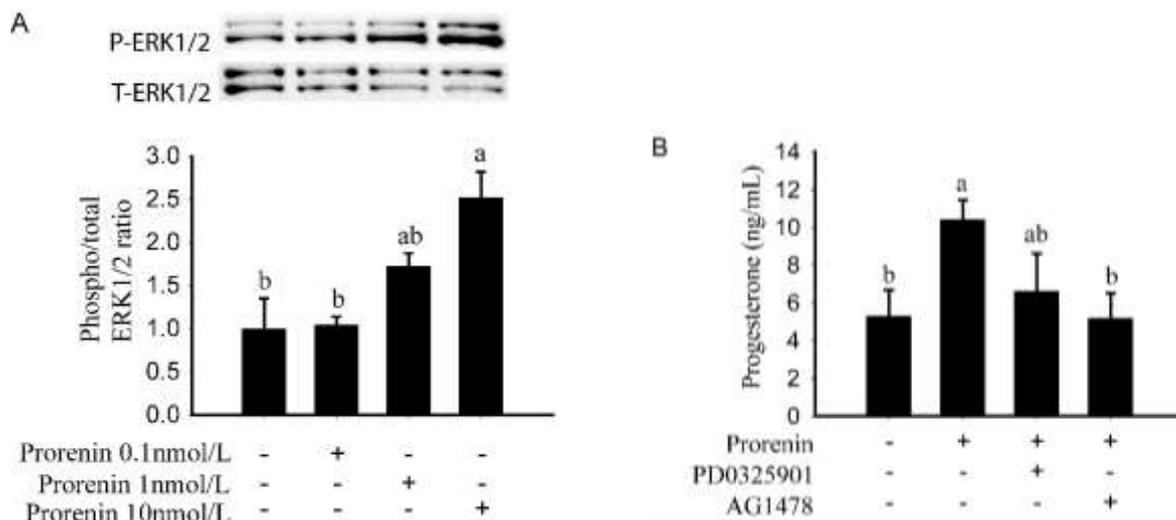


Figura 3. Papel da sinalização por proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) nos níveis de progesterona induzidos por prorenina. (A) Dose-resposta de prorenina na fosforilação das MAPKs ERK1/2 no tecido lúteo após 20 min de tratamento. (B) Efeito de 1 nmol/L de prorenina + 1  $\mu$ mol/L PD0325901 (inibidor MAPK/ERK quinase) ou 1 nmol/L prorenina + 5  $\mu$ mol/L AG1478 (inibidor de EGFR) sobre os níveis de progesterona (ng/mL) em meio de cultura após 4 h de tratamento. As imagens de Western Blot revelam bandas de aproximadamente 44 e 42 kDa para ERK1/2 fosforilado e não fosforilado, respectivamente.

### Conclusões:

A combinação de experimentos *in vitro* e *in vivo* proporcionaram a elucidação de função e mecanismos envolvidos com o gene alvo de estudo. O uso de fármacos antagonistas e inibidores auxiliaram para evidenciarmos possíveis vias de ação da prorenina e seu efeito através de (P)RR nas células luteais, preenchendo algumas lacunas existentes desde a década de 1980 (ITSKOVITZ et al., 1988) sobre a participação de prorenina via seu receptor nos eventos reprodutivos desencadeados pelo hormônio luteinizante (LH).

O presente estudo provém informações sobre a função do (P)RR como uma via alternativa ao RAS para a síntese de P4. A síntese de P4 é essencial para a regulação do ciclo estral, desenvolvimento embrionário e manutenção da gestação, dessa forma, tem potencial para ser um importante alvo da farmacoterapêutica de distúrbios reprodutivos.

Os resultados obtidos confirmam a correlação positiva entre prorenina e P4 no fluido folicular, e sugerem que a prorenina induz a secreção de P4 em células lúteas pela via dependente e independente de Ang II. A participação de EGFR e ERK1/2 também foi evidenciada como potenciais mediadores da secreção de P4 induzida pela prorenina.

### Referências bibliográficas

- Dau AM, da Silva EP, da Rosa PR, Bastiani FT, Gutierrez K, Ilha GF, Comim FV & Goncalves PB 2016 Bovine ovarian cells have (pro)renin receptors and prorenin induces resumption of meiosis in vitro. **Peptides** 81 1-8.
- FERREIRA, R. et al. Angiotensin II profile and mRNA encoding RAS proteins during bovine follicular wave. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, v. 12, n. 4, p. 475-82, Dec 2011. ISSN 1752-8976 (Electronic)
- Ferreira R.; Oliveira J. F.; Fernandes R.; Moraes J. F.; Goncalves P. B., 2007: The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. **Reproduction**, 134 713-719.
- FERRI, N. et al. Aliskiren reduces prorenin receptor expression and activity in cultured human aortic smooth muscle cells. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, v. 12, n. 4, p. 469-74, Dec 2011. ISSN 1752-8976
- Itskovitz J, Sealey JE, Glorioso N, Laragh JH & Rosenwaks Z. 1988. The ovarian prorenin-angiotensin system. Lessons from IVF. **Ann N Y Acad Sci**, 541 179-189.
- KOBAYASHI, S. et al. Production and localisation of angiotensin II in the bovine early corpus luteum: a possible interaction with luteal angiogenic factors and prostaglandin F2 alpha. **J Endocrinol** 170 369-380.
- Nabi A. H.; Biswas K. B.; Nakagawa T.; Ichihara A.; Inagami T.; Suzuki F., 2009: Prorenin has high affinity multiple binding sites for (pro)renin receptor. **Biochim Biophys Acta**, 1794 1838-1847.
- PENG, X. R. et al. 1991. Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. **Endocrinology**, v. 129, n. 6, p. 3200-7
- Uraoka M, Ikeda K, Nakagawa Y, Koide M, Akakabe Y, Nakano-Kurimoto R, Takahashi T, Matoba S, Yamada H, Okigaki M & Matsubara H 2009 Prorenin induces ERK activation in endothelial cells to enhance neovascularization independently of the renin-angiotensin system. **Biochem Biophys Res Commun** 390 1202-1207.