

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS DE CURITIBANOS
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Gislaine dos Santos

Alcalóides pirrolizidínicos do *Senecio* spp. alteram a expressão de genes controladores da cascata ovulatória de células da granulosa de bovinos *in vitro*

Curitibanos

2021

Gislaine dos Santos

Alcalóides pirrolizidínicos do *Senecio* spp. alteram a expressão de genes controladores da cascata ovulatória de células da granulosa de bovinos *in vitro*

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Medicina Veterinária do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Médica Veterinária.
Orientador: Prof. Dr. Marcos Henrique Barreta

Curitiba

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Santos, Gislaine dos

Alcalóides pirrolizidínicos do *Senecio* spp. alteram a expressão de genes controladores da cascata ovulatória de células da granulosa de bovinos in vitro / Gislaine dos Santos ; orientador, Marcos Henrique Barreta, 2021.

31 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Curitibanos, Graduação em Medicina Veterinária, Curitibanos, 2021.

Inclui referências.

1. Medicina Veterinária. 2. *Senecio* spp.. 3. ovulação. 4. granulosa. I. Henrique Barreta, Marcos . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Medicina Veterinária. III. Título.

Alcalóides pirrolizidínicos do *Senecio* spp. alteram a expressão de genes controladores da cascata ovulatória de células da granulosa de bovinos *in vitro*

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharelado em Medicina Veterinária aprovado em sua forma final pela seguinte banca:

Curitibanos, 14 de maio de 2021.

Prof. Dr. Malcon Andrei Martinez Pereira
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcos Henrique Barreta
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

M.V André Lucio Fontana Goetten
Avaliador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Vitor Braga Rissi
Avaliador
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela vida. Por toda a proteção, saúde, sabedoria e por permitir eu viver essa experiência.

À minha família. Meus pais Lindomar e Marlene, as pessoas mais batalhadoras que eu conheço. Vocês são meu exemplo de força, garra e determinação. Obrigada por apoiarem e incentivarem meu sonho de ser Médica Veterinária. Sem vocês eu não teria chegado até aqui. À minha irmã Jaqueline, por cuidar de mim e sempre estar disposta a me ajudar. Obrigada pelo apoio, conversas e conselhos. Minha eterna gratidão e respeito, “quando eu crescer quero ser igual você”. Aos meus avós (*in memoriam*), por me ensinarem a importância da simplicidade e da generosidade. Tenho certeza que irão sempre me acompanhar e torcer por mim.

Ao Luan, por ser meu abrigo e meu melhor amigo. Por me ensinar a ser uma pessoa melhor e me incentivar todos os dias. Sou eternamente grata por tudo que faz por mim e pela bisteca, vocês são minha melhor companhia e tornam tudo mais fácil.

Aos verdadeiros motivos da escolha da minha profissão: Bisteca, Bob, Nina, Meg e Miminha. Por me mostrarem o significado de amor incondicional.

Aos meus amigos. Em especial à Eduarda e Fernanda, por serem as minhas irmãs da Veterinária. Obrigada pela presença mesmo nos momentos mais difíceis, pelos ensinamentos e por tornarem a rotina da faculdade mais leve e feliz. Ao grupo “o pai conhece o gado”, pelas risadas, companhia, brigas, cachaças e por tornarem esses 5 anos inesquecíveis.

À equipe do LAFRA, André, professor Vitor e professor Luiz. Pelos ensinamentos durante a graduação, por compartilhar experiências e por incentivar a vida acadêmica. Ao professor Marcos, por me orientar durante todo o meu trajeto na universidade. Agradeço pela confiança, pela oportunidade, ensinamentos, ajuda e disponibilidade. Vocês são exemplos de profissionais e pessoas a serem seguidos.

Agradeço imensamente a toda a equipe do BioRep. Por me acolher desde o primeiro dia, me incentivar e principalmente por todo conhecimento compartilhado. Em especial ao professor Valério pela supervisão de estágio, pelos aprendizados e pela confiança depositada. À Daniele e ao Zigomar pela amizade, companhia, apoio e pela dedicação em transmitir conhecimento.

Às minhas companheiras de Santa Maria, Emily e Mitiani. Agradeço por tornarem a distância de casa menos dolorosa, pelos conselhos e conversas, por acreditarem em mim e pela ajuda nos momentos difíceis.

RESUMO

O *Senecio brasiliensis* é uma planta tóxica encontrada por toda América do Sul. Na região Sul do Brasil, esta planta é conhecida como maria-mole e está sendo associada a causa de morte entre bovinos. Seu efeito tóxico se deve as altas concentrações de alcalóides pirrolizidínicos encontrados na planta, que quando metabolizados pela enzima citocromo P450 em pirróis no fígado levam a casos de subfertilidade e conseqüentemente perdas econômicas expressivas. O objetivo deste trabalho foi validar um sistema de cultivo de células da granulosa e avaliar os efeitos da Senecionina (SO) e Senecifilina (SE; alcalóides pirrolizidínicos encontrados no *Senecio* spp.) sobre os genes da cascata ovulatória em células da granulosa de bovinos *in vitro*. Para isso, ovários de bovinos foram obtidos em abatedouro e transportados ao laboratório em solução salina (0,9% NaCl; 30°C) contendo penicilina (100 UI/ml) e estreptomicina (50 µg/ml). Folículos com diâmetro maior que 12 mm foram aspirados para obtenção das células da granulosa. As células foram cultivadas (1×10^6 células/mL) em meio DMEM/F12 suplementado com SFB, insulina, BSA, penicilina e estreptomicina e mantidos em incubadora a 38,5°C e 5% CO₂. Após 24 h, as células foram expostas ao meio livre de soro. A SO (0, 10 e 100 ng/mL) e a SF (0, 10 e 100 ng/mL) foram adicionadas 18 h após a mudança do meio, juntamente com LH (100 ng/ml). As células foram expostas ao tratamento por 6, 12 ou 18 horas. Foi observado que a adição dos alcalóides pirrolizidínicos aumentou a expressão de RNAm para EREG após 12 h e diminuiu a expressão de RNAm para STAR nesse mesmo período. Estes dados sugerem que a intoxicação de bovinos por *Senecio* spp. pode diminuir a fertilidade causando perdas econômicas superiores as perdas por animais mortos e demonstram que os alcalóides pirrolizidínicos atuam em outros tecidos além do hepático.

Palavras-chave: *Senecio* spp., ovulação, granulosa

ABSTRACT

Senecio brasiliensis is a toxic plant found throughout South America. In southern Brazil, this plant is known as maria-mole and is being associated with a cause of death in cattle. Its toxic effect is due to the high doses of pyrrolizidine alkaloids found in the plant, which when metabolized by the cytochrome P450 enzyme in pyrroles in the liver lead to cases of subfertility and consequently attenuate significant losses. The objective of the work was to validate a culture system for granulosa cells and to evaluate the effects of Senecionin (SO) and Senecifilina (SE; pyrrolizidine alkaloids found in *Senecio* spp.) on the genes of the ovulatory cascade in bovine granulosa cells in vitro. For this, bovine ovaries were obtained in a abattoir and transported to the laboratory in saline solution (0.9% NaCl; 30°C) containing penicillin (100 IU/mL) and streptomycin (50 µg/mL). Follicles with a diameter greater than 12 mm were aspirated to obtain granulosa cells. The cells were cultured (1×10^6 cells/mL) in DMEM / F12 medium supplemented with SFB, insulin, BSA, penicillin and streptomycin and collected in an incubator at 38.5°C and 5% CO₂. After 24 h, the cells were exposed to serum-free medium. SO (0, 10 and 100 ng/mL) and SF (0, 10 and 100 ng/mL) were added 18 h after changing the medium, together with LH (100 ng/mL). The cells were exposed to treatment for 6, 12 or 18 hours. Pyrrolizidine alkaloids increased the mRNA expression for EREG and decreased for STAR at 12 h of culture. These data suggest that cattle poisoning by *Senecio* spp. it can decrease fertility causing economic losses higher than the losses for dead animals and demonstrate that the pyrrolizidine alkaloids act in other tissues besides the liver.

Keywords: *Senecio* spp., ovulation, granulosa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Células luteínicas grandes com megalocitose (seta). Bovino. Obj, 400×.	19
Figura 2 – RNAm do gene CYP11A1 é expresso em células da granulosa (CG), células da teca (CT) e embriões bovinos (EB) cultivados <i>in vitro</i>	20
Figura 3 – Desenho esquemático do dia 0 do cultivo de células da granulosa de folículos ovarianos grandes de bovinos. Os folículos eram submetidos a movimentos contínuos e consistentes de interposição de meio para dentro do folículo para descolar as células da granulosa. Antes de ser semeado nas placas, esse conteúdo passou por um filtro de dissociação celular e por lavagens através de centrifugações.	21
Figura 4 – Desenho esquemático da placa semeada com os tratamentos no dia 2 do cultivo de células da granulosa de folículos ovarianos grandes de bovinos. Tratamentos realizados com LH (0 ou 100 ng/mL), SO (0; 10 ou 100 ng/mL) e SF (0; 10 ou 100 ng/mL).	22
Figura 5 – Cultura de células da granulosa oriundas de folículos grandes de bovinos. A) Aumento de 10X B) Aumento de 40X.	22
Figura 6 – Efeito do LH (100 ng/mL) na expressão de RNAm para EREG, em células da granulosa cultivadas sem SFB. Os dados são mostrados como valores relativos e representam a média de três cultivos replicados independentes. Asteriscos (***) indicam diferença estatística ($P < 0,05$).	24
Figura 7 – Efeitos do SO e SF na expressão de genes que codificam RNAm envolvidos na cascata ovulatória em células da granulosa de bovinos cultivadas <i>in vitro</i> . Os dados representam a média de três cultivos replicados independentes. Barras com letras diferentes indicam diferenças estatística ($P < 0,05$).	25
Figura 8 – Efeitos do SO e SF na expressão do gene CTGF que codifica RNAm envolvido na proliferação de células da granulosa de bovinos cultivadas <i>in vitro</i> . Os dados representam a média de três cultivos replicados independentes. Não houve diferença estatística entre os grupos ($P > 0,05$).	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Primers utilizados para o PCR em tempo real.....	23
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAM17	<i>ADAM metallopeptidase domain 17</i>
ANGII	Angiotensina II
AMPC	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
AP	Alcalóide pirrolizidínico
APs	Alcalóides pirrolizidínicos
AREG	Ampiregulina
BSA	Albumina sérica bovina
BTC	Betacelulina
cDNA	DNA complementar
CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i>
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGFR	Receptor de EGF
EREG	Epiregulina
ERK1/2	Quinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
H2A	Histona H2A
LH	Hormônio Luteinizante
PKA	Serina proteína quinase A
PTGS2	Prostaglandina sintetase 2
qPCR	PCR em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SF	Senecifilina
SO	Senecionina
STAR	<i>Steroidogenic Acute Regulatory Protein</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	OVULAÇÃO.....	18
3.2	ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS.....	18
4	MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1	CULTIVO CELULAR	21
4.2	EXTRAÇÃO DE RNA E REAL-TIME RT-qPCR.....	23
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
5	RESULTADOS	24
6	DISCUSSÃO	27
7	CONCLUSÃO.....	29
	REFERÊNCIAS.....	30

1 INTRODUÇÃO

As intoxicações por plantas representam uma importante causa de morte em animais de produção. No Sul do Brasil, estima-se que mais de 50% das mortes de bovinos causadas por plantas tóxicas são decorrentes da ingestão e intoxicação por *Senecio* spp. (LUCENA et al., 2010; RIET-CORREA; MEDEIROS, 2001; RISSI et al., 2007), popularmente conhecida como maria-mole, causando grandes perdas econômicas na cadeia produtiva. Devido ao alto teor de alcaloides pirrolizidínicos (AP), o *Senecio brasiliensis* (MÉNDEZ et al., 1990) é capaz de induzir hepatotoxicidade (PANZIERA et al., 2017) e levar o animal a morte. Estima-se que 5% da população bovina morre anualmente (MÉNDEZ; RIET-CORREA, 2008) sendo que no sul do Brasil 14% desses casos acontecem devido à intoxicação por plantas (RIET-CORREA, F et al., 2000). Destas mortes, cerca de 50% são devido a intoxicação por *Senecio* spp (98 mil animais) (RIET-CORREA, FRANKLIN; MEDEIROS, 2001).

O gênero *Senecio* pertence à família *Asteraceae* e possui mais de 2000 espécies no mundo (PELSER et al., 2007). No Brasil, foram catalogadas cerca de 85 espécies pertencentes ao gênero, sendo que 33 são nativas da região sul (DA SILVA; BOLZAN; HEINZMANN, 2006). A maioria das plantas pertencentes a este gênero contém alcaloides pirrolizidínicos (AP) que apenas quando quebrados em grupos pirróis no fígado, pela enzima citocromo p450, são capazes de causar intoxicação às células levando a inibição da mitose e consequentemente a megalocitose (PRAKASH et al., 1999).

O impacto econômico se dá pelas perdas diretas por morte. Entretanto, presume-se que as perdas econômicas sejam ainda maiores pois os animais podem apresentar manifestações subclínicas e crônicas da doença, que levam a perdas por baixa produtividade (taxa de produção de carne e leite) e susceptibilidade a outras doenças e falhas na reprodução. Acreditava-se que as baixas taxas reprodutivas em decorrência da intoxicação por *Senecio* spp. fossem decorrentes da condição nutricional dos animais doentes causada pelas lesões hepáticas. Contudo, estudos recentes (KRABBE et al., 2015) revelaram a presença de megalocitose e pseudo inclusões nucleares em células luteínicas grandes de bovinos com seneciose crônica. Sabe-se que ovários de suínos são capazes de expressar e transcrever a enzima citocromo P450 e suas isoformas (LEIGHTON et al., 1995), enzima responsável por biotransformar os AP em pirróis. Além disso, estudos demonstraram a alta capacidade dos AP em induzir vias apoptóticas em células (STEENKAMP et al., 2001; XU et al., 2019).

Desta forma, quando associamos os animais com intoxicação crônica e subclínica que podem apresentar problemas reprodutivos sem causa aparente, a expressão da P450 nas células da granulosa de suínos, a indução de vias apoptóticas em camundongos e a megalocitose em bovinos, nós levantamos a hipótese de que podem existir casos de subfertilidade devido uma ação direta dos alcaloides sobre as células ovarianas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Baseado na necessidade de esclarecer a hipótese de que a intoxicação por *Senecio* spp. pode levar a subfertilidade por ação direta dos alcaloides pirrolizidínicos (AP) sobre as células ovarianas, este trabalho buscou avaliar se os alcaloides pirrolizidínicos podem comprometer as células da granulosa *in vitro* e a expressão de genes relacionados ao processo ovulatório podendo ser um fator de subfertilidade e conseqüentemente de perdas econômicas importantes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validação do sistema de cultivo *in vitro* de células da granulosa.
- Investigar se os AP são capazes de interferir na expressão de enzimas envolvidas no processo ovulatório e na expressão do CTGF (gene responsável pela regulação da apoptose e de proliferação celular).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 OVULAÇÃO

O processo ovulatório nos mamíferos é similar a uma resposta inflamatória (DUFFY et al., 2019). Após a fase de dominância folicular, o folículo dominante é responsável por produzir altas concentrações de estrógeno que associados aos baixos níveis de progesterona circulante (BAIRD; SWANSTON; MCNEILLY, 1981; BAIRD; SWANSTON; SCARAMUZZI, 1976) aumentam a frequência dos pulsos de GnRH estimulando o pico pré-ovulatório de LH na adenohipófise (RUSSELL; ROBKER, 2007). Esses eventos ovulatórios são controlados pela capacidade de resposta ao LH dentro do folículo, que acontece com maior expressividade em folículos maiores que 12 mm de diâmetro, pois é nessa fase que os transcritos dos receptores de LH da granulosa são capazes de formar uma proteína funcional (SARTORI et al., 2001). Na cascata ovulatória, o receptor de LH nas células da granulosa é acoplado a proteína G. A ativação de adenilato ciclase acontece com o LH ligando-se ao seu receptor. Esse mecanismo desencadeia o aumento dos níveis de AMPc intracelular que ativa PKA, conseqüentemente ativando as vias de transcrição de genes da cascata ovulatória (como por exemplo, STAR). A enzima ADAM17 é estimulada por LH e a ANGII é responsável por liberar o domínio de EREG para se ligar em EGFR ativando a via ERK1/2 estimulando a expressão de EREG, AREG, BTC e PTGS2 (PORTELA et al., 2011).

3.2 ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS

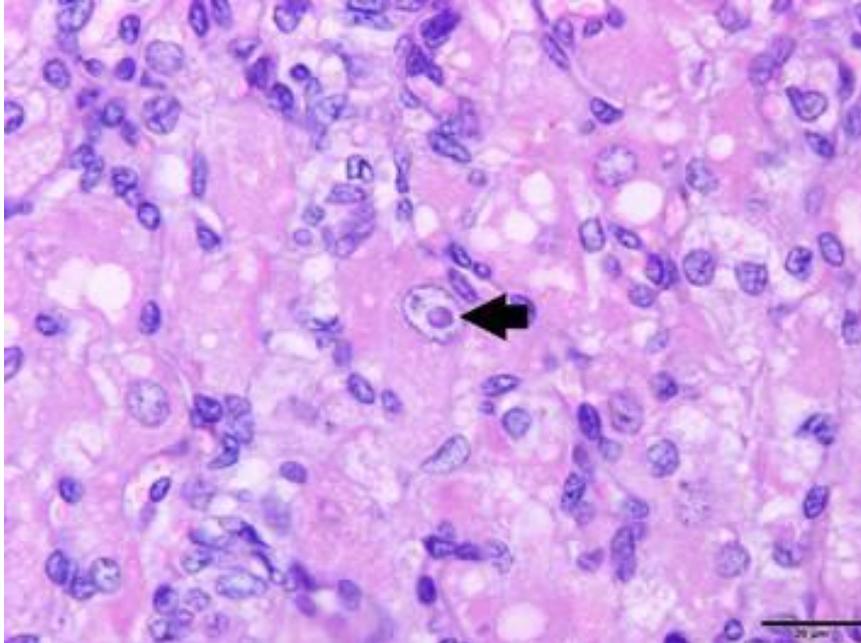
Os alcalóides pirrolizidínicos, em especial senecionina (SO) e senecifilina (SF), são considerados um grupo importante associado ao gênero *Senecio* que causa grandes perdas econômicas na produção de bovinos, ovinos e suínos no sul do Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai (HABERMEHL et al., 1988; ILHA et al., 2001). O *Senecio brasiliensis* é uma planta altamente resistente que se adaptou às diferentes condições climáticas dos locais onde se encontra e está amplamente disponível para consumo dos animais, principalmente no inverno.

Esses alcaloides sozinhos não apresentam toxicidade. Após a absorção dos AP, a circulação portal transporta-os até o fígado. Para induzir o efeito tóxico, é necessário a biotransformação em álcool e éster pirrol pela enzima citocromo p450 (CYP 1A1) no fígado.

Esses derivados pirróis são altamente reativos, levando a inibição da mitose e consequentemente a megalocitose e morte celular (PRAKASH et al., 1999).

Na literatura são descritos casos de intoxicação por *Senecio* spp. como alvo o fígado e os hepatócitos (ILHA et al., 2001; LUCENA et al., 2010; MÉNDEZ et al., 1990; PANZIERA et al., 2017; PRAKASH et al., 1999; RIET-CORREA; MEDEIROS, 2001), por serem capazes de expressar e transcreever as enzimas responsáveis pela conversão dos AP. Entretanto, Krabbe et al., (2015) descreveu alterações em ovários de bovinos intoxicados por *Senecio brasiliensis* classificadas como megalocitose das células luteínicas (Figura 1).

Figura 1 – Células luteínicas grandes com megalocitose (seta). Bovino. Obj, 400×.

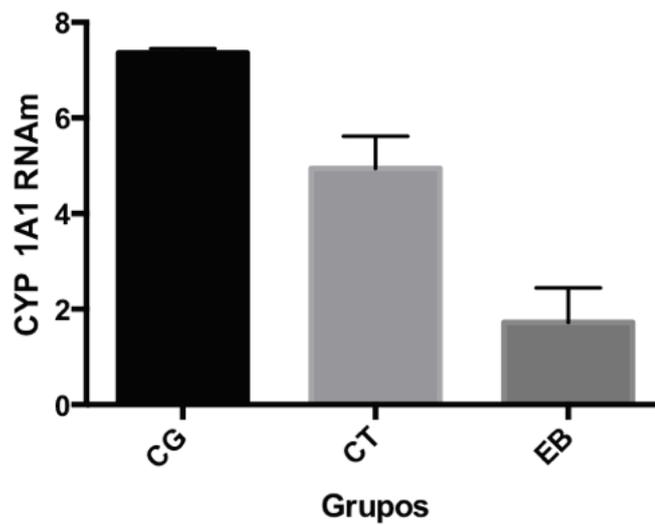


Fonte: (KRABBE et al., 2015)

Sabe-se que é obrigatória a presença do gene CYP1A1 para desencadear o efeito tóxico dos AP (MATTOCKS et al., 1986). Do ponto de vista bioquímico, o CYP1A1 é semelhante a aromatase (CYP19), enzima expressa em células da granulosa que está relacionada com a esteredoigenêse (BAO et al., 1997). Ao associar a semelhança bioquímica entre essas enzimas, as lesões de megalocitose em células luteínicas grandes (KRABBE et al., 2015) e a expressão de CYP1A1 em células da granulosa de suínos (LEIGHTON et al., 1995) levantou-se a hipótese de que provavelmente a CYP1A1 é expressa no tecido ovariano. Dados preliminares demonstraram que a CYP1A1 é expressa em células da granulosa, células da teca e embriões cultivados *in vitro* (Figura 2). Estes resultados sugerem que a presença da enzima no tecido

ovariano bovino permite que os AP sejam convertidos em pirróis e possivelmente induz seu efeito tóxico nas células e embriões.

Figura 2 – RNAm do gene CYP1A1 é expresso em células da granulosa (CG), células da teca (CT) e embriões bovinos (EB) cultivados *in vitro*.



Fonte: dados preliminares.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CULTIVO CELULAR

As células da granulosa foram cultivadas com base em protocolos já propostos (PORTELA et al., 2011) com modificações. Ovários bovinos obtidos em frigorífico foram transportados ao laboratório em solução salina 0,9% a 22-25°C contendo penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (50 µg/mL). Foram selecionados aproximadamente 10 ovários para cada repetição, cada um contendo um único folículo dominante com diâmetro > 12 mm. As células foram coletadas dos folículos por flushing, agrupadas, filtradas e centrifugadas três vezes por centrifugação a 900 g por 10 minutos cada.

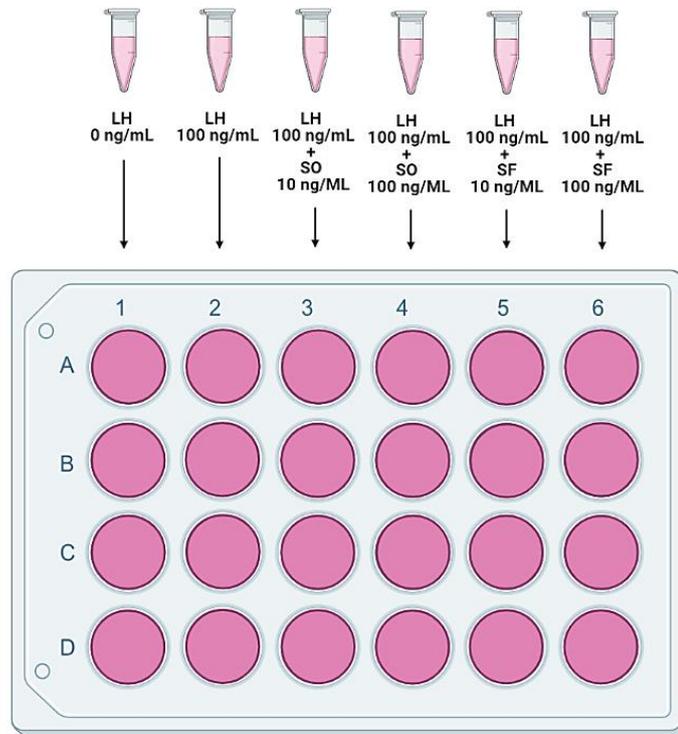
Figura 3 – Desenho esquemático do dia 0 do cultivo de células da granulosa de folículos ovarianos grandes de bovinos. Os folículos eram submetidos a movimentos contínuos e consistentes de interposição de meio para dentro do folículo para descolar as células da granulosa. Antes de ser semeado nas placas, esse conteúdo passou por um filtro de dissociação celular e por lavagens através de centrifugações.



Fonte: autoria própria, 2021.

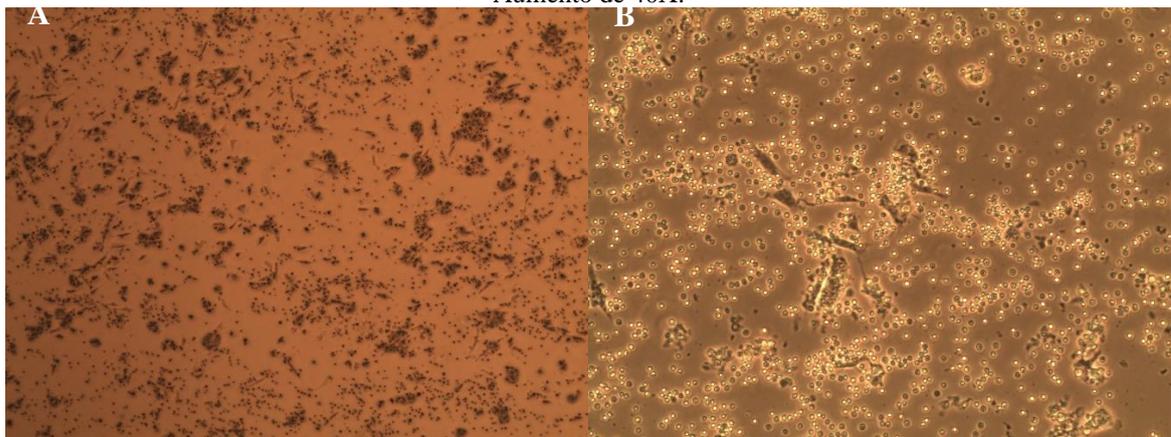
A viabilidade celular foi estimada com 0,4% de Azul de Tripano e as células (1×10^6 células/mL) semeadas em placa de cultivo de 24 poços (com DMEM-F12 (Dulbecco Modified Eagle Medium-Ham F-12) suplementado com soro fetal bovino (SFB; 2%), bicarbonato de sódio (10 mM), penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 µg/mL), albumina sérica bovina (BSA; 0,1%), hormônio folículo estimulante (FSH; 1 ng/mL) e insulina (10 ng/mL). Os cultivos foram mantidos a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas (Figura 3). Após 24 horas, o meio foi substituído por DMEM-F12 suplementado apenas com bicarbonato de sódio (10 mM), penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e BSA; 0,1% (Sigma-Aldrich). Após 18 horas, as células foram estimuladas com LH (100 ng/mL), LH (100 ng/mL) com SO (10 ou 100 ng/mL) ou LH (100 ng/mL) com SF (10 ou 100 ng/mL) (Figura 4). As células foram coletadas 6, 12 e 24 horas após o tratamento (Figura 5) para extração de RNA e análise de expressão gênica.

Figura 4 – Desenho esquemático da placa semeada com os tratamentos no dia 2 do cultivo de células da granulosa de folículos ovarianos grandes de bovinos. Tratamentos realizados com LH (0 ou 100 ng/mL), SO (0; 10 ou 100 ng/mL) e SF (0; 10 ou 100 ng/mL).



Fonte: autoria própria, 2021.

Figura 5 – Cultura de células da granulosa oriundas de folículos grandes de bovinos. A) Aumento de 10X B) Aumento de 40X.



Fonte: arquivo pessoal, 2021.

4.2 EXTRAÇÃO DE RNA E REAL-TIME RT-qPCR

O RNA total das amostras foi extraído por coluna de acordo com as orientações do fabricante (PureLink™ RNA Mini Kit; Invitrogen™) e a quantificação e análise da pureza realizada com espectrofotômetro Nano-Drop (Thermo Scientific – Waltham, USA). O RNA das amostras foi incubado com iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad, Hercules, CA) para síntese do DNA complementar (cDNA), de acordo com as instruções do fabricante. A reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) foi conduzida no termociclador CFX384™ (Real Time System, Bio-Rad) de acordo com os critérios estabelecidos (NAGASHIMA et al., 2011) utilizando o fluoróforo BRYT Green® e a Taq DNA Polimerase presentes na GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) e iniciadores específicos para bovinos. Foi realizada uma diluição seriada do cDNA das amostras para gerar a curva padrão e avaliar a eficiência da reação. As amostras foram corridas em duplicata e foram expressas em relação a um gene constitutivo (Histona H2A). A sequência dos primers utilizados está descrita na tabela 1.

Tabela 1 – Primers utilizados para o PCR em tempo real.

Gene	Sense (5'-3')	Antisense (5'-3')
CTGF	AGCTGAGCGAGTTGTGTACC	TCCGAAAATGTAGGGGGCAC
EREG	ACTGCACAGCATTAGTTCAAACACTGA	TGTCCATGCAAACAGTAGCCATT
H2A	GCATGTCACCCAGTTGGTCT	TGGGTCAAGCATGGTGTCTG
PTGS2	TTTGACCCAGAGCTGCTTTT	GAAAGACGTCAGGCAGAAGG

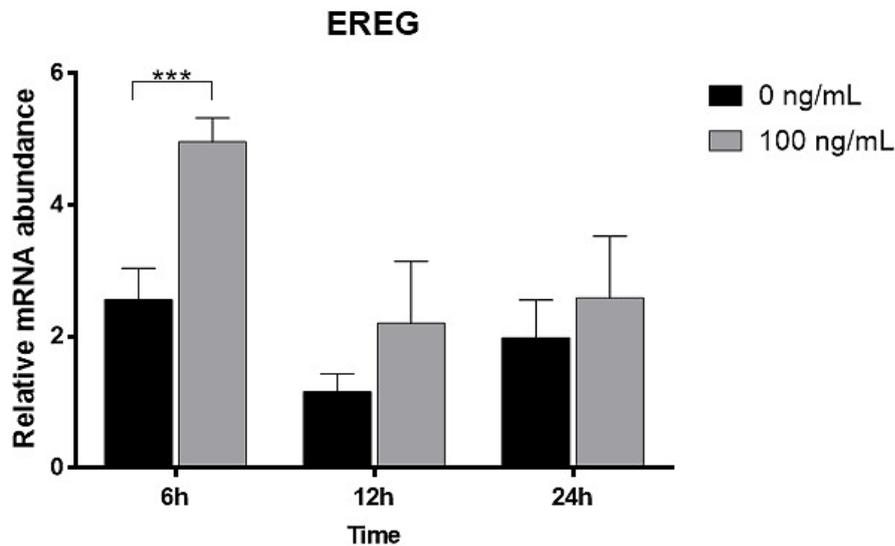
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças entre as médias foram testadas com o teste de comparações múltiplas de Tukey. A homogeneidade de variância foi testada com o teste de O'Brien. Os dados que não seguiram uma distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) foram transformados em logaritmos. Diferença estatística foi considerada quando $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

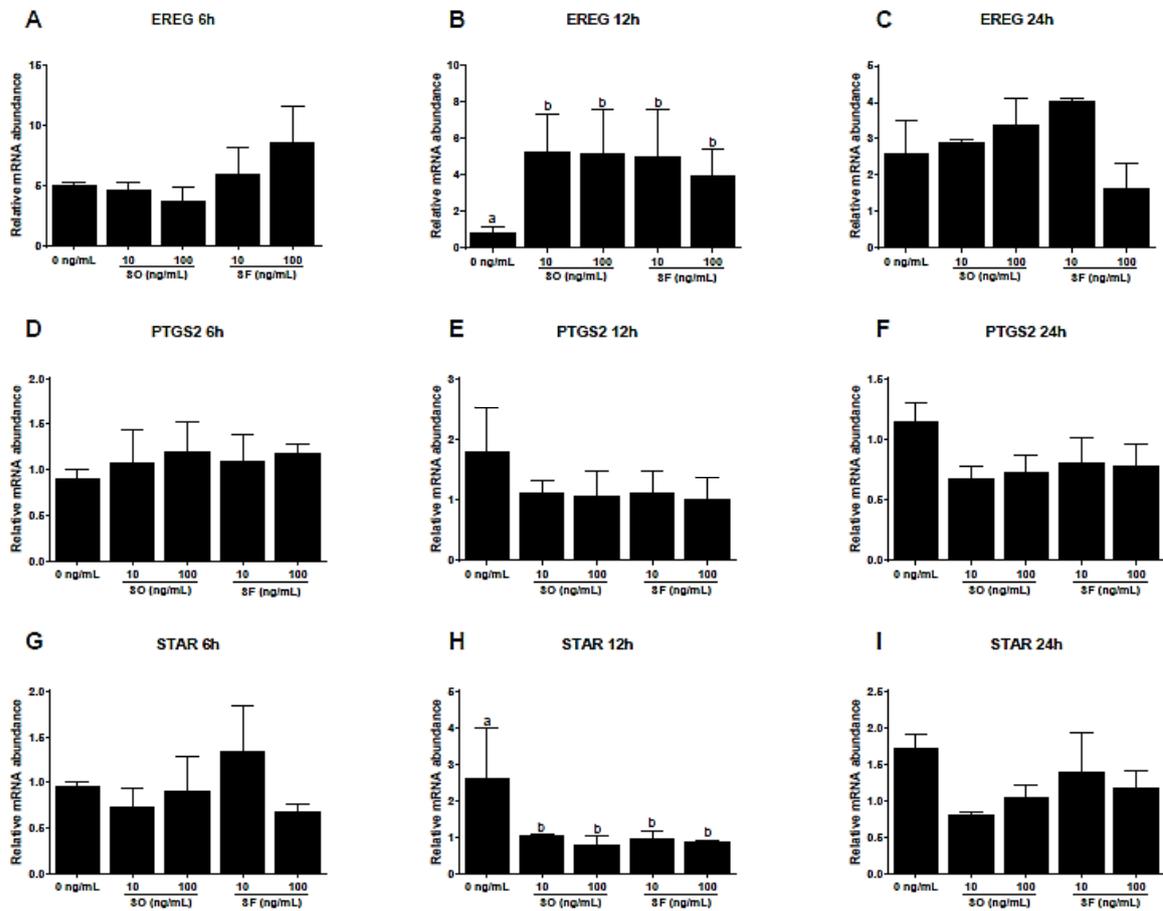
Para validação do modelo de cultivo de células da granulosa *in vitro* estabelecido por Portela et al. (2011), foram cultivadas células com soro por 24 h, e depois em meio livre de soro por mais 18 h, antes de adicionar LH. Houve um aumento na expressão de EREG nas células da granulosa cultivadas por 6 h na presença de LH (100 ng/mL) (Figura 6).

Figura 6 – Efeito do LH (100 ng/mL) na expressão de RNAm para EREG, em células da granulosa cultivadas sem SFB. Os dados são mostrados como valores relativos e representam a média de três cultivos replicados independentes. Asteriscos (***) indicam diferença estatística ($P < 0,05$).



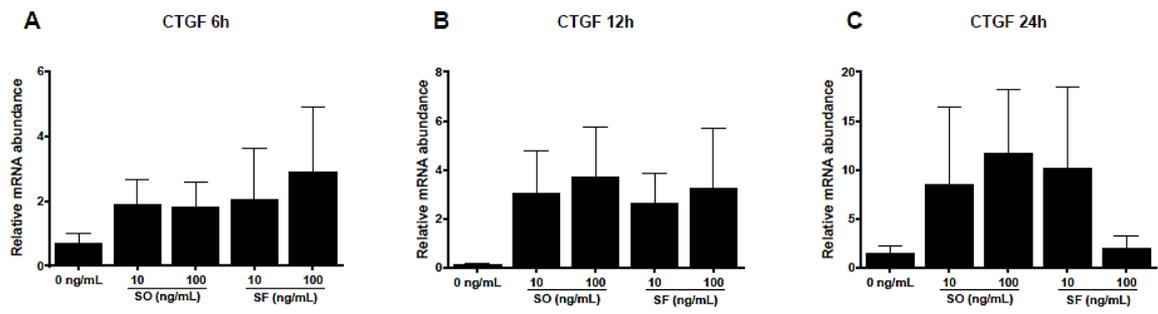
Investigamos a ação dos alcaloides pirrolozidínicos SO e SF sobre os a expressão de RNAm de genes envolvidos na ovulação em células da granulosa cultivadas *in vitro*. Para isso, as células foram tratadas com os alcalóides em duas doses: 10 ng/mL e 100 ng/mL. O efeito na ação do LH foi avaliado após 6, 12 e 24 h do tratamento. Para explorar os possíveis efeitos dos alcaloides, foram avaliados os genes EREG, STAR e PTGS2 envolvidos no controle da cascata ovulatória. Inicialmente, os alcaloides não estimularam a expressão de RNAm de EREG em comparação com o LH sozinho após 6 h de cultivo (Figura 7A). Entretanto, após 12 h houve um aumento significativo da expressão de EREG (Figura 7B), voltando a valores basais após 24 h (Figura 7C). Os APs não alteraram a expressão de PTGS2 às 6, 12 e 24 h de cultivo (Figura 7 D-F). Os APs reduziram a expressão de STAR às 12 h de cultivo (Figura 7 I), mas não alteram a expressão deste gene às 6 e 24 h (Figura 7 G-H).

Figura 7 – Efeitos do SO e SF na expressão de genes que codificam RNAm envolvidos na cascata ovulatória em células da granulosa de bovinos cultivadas *in vitro*. Os dados representam a média de três cultivos replicados independentes. Barras com letras diferentes indicam diferenças estatística ($P < 0,05$).



Para avaliar a hipótese de que pirróis podem regular a expressão de genes envolvidos na proliferação celular nas células da granulosa, foi avaliada a expressão de RNAm de CTGF as 6, 12 e 24 h após o tratamento com SO e SF. Os AP não alteraram a expressão de RNAm para CTGF quando comparado ao grupo tratado apenas com LH após 6, 12 e 24 h (Figura 8 A-C).

Figura 8 – Efeitos do SO e SF na expressão do gene CTGF que codifica RNAm envolvido na proliferação de células da granulosa de bovinos cultivadas *in vitro*. Os dados representam a média de três cultivos replicados independentes. Não houve diferença estatística entre os grupos ($P>0,05$).



6 DISCUSSÃO

Os resultados desse estudo demonstram que a presença de LH no meio de cultivo aumentou os níveis de RNAm para EREG às 6 h quando comparado ao grupo não estimulado com LH (Figura 6). Estes resultados foram relatados da mesma forma por Portela et al. (2011), que demonstrou o pico de expressão de EREG às 6 h. Como EREG é utilizado como gene marcador da ovulação, os resultados obtidos no estudo sugerem que o modelo de cultivo utilizado é eficiente para estudar os genes envolvidos nos eventos pré-ovulatórios dependentes de LH nas células da granulosa.

Para o segundo estudo, determinamos se a presença dos AP, SO e SF era capaz de alterar a expressão de genes reguladores da cascata ovulatória através do cultivo de células da granulosa estimuladas com LH. Surpreendentemente, os alcalóides aumentaram a expressão de RNAm para EREG após 12 h (Figura 7B) quando comparado ao grupo tratado apenas com LH ($P < 0,05$), indicando um efeito estimulante dos AP sobre a expressão de RNAm para EREG. Por ser considerado um gene marcador da ovulação, não era esperado que a expressão de EREG estivesse maior nas células estimuladas com os AP. No entanto, a literatura mostra que a expressão de EREG pode estar relacionada com a regulação da apoptose quando as células estão sendo desafiadas (RIESE; CULLUM, 2014; WHITE et al., 2010). Já está esclarecido que alguns AP induzem vias apoptóticas (JI et al., 2008; STEENKAMP et al., 2001; XU et al., 2019). De maneira semelhante ao encontrado nas células da granulosa estimuladas com AP, algumas células cancerígenas também apresentaram aumento da expressão de EREG a medida que é necessário o controle da apoptose (SUNAGA et al., 2013; SUNAGA; KAIRA, 2015). Além disso, em células pulmonares cancerígenas o bloqueio de EREG induziu a morte celular por apoptose (SUNAGA et al., 2013). Dessa forma, a expressão de EREG pode estar diretamente relacionada ao controle da apoptose pelas células da granulosa que podem estar utilizando como fator anti-apoptose.

Não obstante, os níveis de expressão de RNAm para STAR em células da granulosa tratadas com AP diminuíram as 12 h quando comparado ao grupo estimulado apenas com LH (Figura 7H), indicando que o papel fisiológico de STAR foi comprometido, pois não apresentou o comportamento esperado na cascata ovulatória para este horário (PORTELA et al., 2011). A STAR é uma proteína aguda que regula o transporte de colesterol para dentro da mitocôndria (CLARK et al., 1994). O colesterol é convertido em pregnenolona, precursora de progesterona, nas células da granulosa (CASTILLO et al., 2014). Por isso, STAR é considerada um marcador

de luteinização expresso nas células da granulosa e teca (PESCADOR et al., 1996). Estudos mostraram que humanos e camundongos sem atividade de STAR nascem com insuficiência adrenal, destacando sua importância para a produção de corticosteróides (BOSE et al., 2000; HASEGAWA et al., 2000a). Dentro do cenário reprodutivo, a STAR possui papel fundamental para a produção de progesterona. A ausência de STAR foi relacionada ao desenvolvimento de cistos ovarianos devido a anovulação contínua em humanos (HASEGAWA et al., 2000b). De forma semelhante aos efeitos dos AP em células da granulosa, estudos mostraram que a menor expressão de STAR em camundongos na puberdade desencadearam a deposição de lipídios nas células afetadas, maturação folicular incompleta e menor produção de progesterona, levando a insuficiência ovariana (HASEGAWA et al., 2000b). A deposição de lipídios pode levar a danos físicos e químicos na célula. Em ovinos intoxicados por *Senecio* spp. está descrito o acúmulo de gotas lipídicas em hepatócitos caracterizando um processo degenerativo (HASEGAWA et al., 2000b). Além disso, um estudo demonstrou que a diminuição de STAR em folículos antrais de camundongos expostos ao bisfenol A resultou na menor absorção de colesterol e conseqüentemente menor produção hormonal (PERETZ et al., 2011). Dessa forma, acredita-se que os baixos índices de STAR podem estar afetando a produção hormonal devido à redução no transporte do colesterol.

Os alcalóides não foram capazes de alterar a expressão de RNAm para PTGS2 após 6, 12 e 24 h (Figura 7 D-F), seguindo o padrão fisiológico descrito na literatura (PORTELA et al., 2011). A PTGS2 é responsável pela conversão de ácido araquidônico em prostaglandina em folículos ovulatórios (DUFFY, 2015). Este processo é extremamente importante pois a prostaglandina é responsável por participar do processo de luteinização e por estimular a síntese de enzimas colagenolíticas que degradam os tecidos conjuntivos da parede do folículo no período pré-ovulatório (KAWAKAMI; KOHMOTO, 1992). Além disso, a expressão de RNAm para CTGF após 6, 12 e 24 h de estímulo pelos AP não foi alterado quando comparado ao grupo estimulado apenas com LH (Figura 8 A-C). Este gene atua regulando a proliferação e diferenciação celular, apoptose e remodelação da matriz extracelular (CHEN; LAU, 2009). No cenário reprodutivo, sua expressão é importante no desenvolvimento embrionário, ovulação e luteinização (SHIRASAWA et al., 2004).

7 CONCLUSÃO

Os AP alteram a expressão de genes envolvidos na cascata ovulatória em células da granulosa bovina *in vitro*. Estes dados sugerem que a intoxicação de bovinos por *Senecio* spp. pode ser causa de diminuição da fertilidade causando perdas econômicas superiores as perdas por animais mortos. Estes dados demonstram que os APs atuam em outros tecidos além do hepático. Novos estudos precisam ser feitos para elucidar o mecanismo envolvido nestas alterações.

REFERÊNCIAS

- BAIRD, D. T.; SWANSTON, I. A.; MCNEILLY, A. S. Relationship Between LH, FSH, and Prolactin Concentration and the Secretion of Androgens and Estrogens by the Preovulatory Follicle in the Ewe. **Biology of Reproduction**, v. 24, n. 5, p. 1013–1025, 1 jun. 1981.
- BAIRD, D. T.; SWANSTON, I.; SCARAMUZZI, R. J. Pulsatile Release of LH and Secretion of Ovarian Steroids in Sheep During the Luteal Phase of the Estrous Cycle. **Endocrinology**, v. 98, n. 6, p. 1490–1496, 1 jun. 1976.
- BAO, B. et al. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. **Biology of Reproduction**, v. 56, n. 5, p. 1158–1168, 1997.
- BOSE, H. S. et al. Mutations in the Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) in Six Patients with Congenital Lipoid Adrenal Hyperplasia 1. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 85, n. 10, p. 3636–3639, out. 2000.
- CASTILLO, A. F. et al. The role of mitochondrial fusion and StAR phosphorylation in the regulation of StAR activity and steroidogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**. Elsevier Ireland Ltd, 5 jun. 2014.
- CHEN, C. C.; LAU, L. F. Functions and mechanisms of action of CCN matricellular proteins. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. Pergamon, 1 abr. 2009.
- CLARK, B. J. et al. The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the Steroidogenic Acute Regulatory protein (StAR). **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 45, p. 28314–28322, 11 nov. 1994.
- DA SILVA, C. D. M.; BOLZAN, A. A.; HEINZMANN, B. M. Pyrrolizidine alkaloids from Senecio species. **Quimica Nova**; Sociedade Brasileira de Química, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000500026&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 27 abr. 2021
- DUFFY, D. M. Novel contraceptive targets to inhibit ovulation: The prostaglandin E2 pathway. **Human Reproduction Update**, v. 21, n. 5, p. 652–670, 1 set. 2015.
- DUFFY, D. M. et al. **Ovulation: Parallels with inflammatory processes** **Endocrine Reviews** Oxford University Press, 2019. Disponível em: <[pmc/articles/PMC6405411/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36405411/)>. Acesso em: 16 mar. 2021
- HABERMEHL, G. G. et al. Livestock poisoning in South America by species of the Senecio plant. **Toxicon**, v. 26, n. 3, p. 275–286, 1 jan. 1988.
- HASEGAWA, T. et al. Developmental roles of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) as revealed by StAR knockout mice. **Molecular Endocrinology**, v. 14, n. 9, p. 1462–

1471, 2000a.

HASEGAWA, T. et al. Developmental Roles of the Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) as Revealed by StAR Knockout Mice. **Molecular Endocrinology**, v. 14, n. 9, p. 1462–1471, 1 set. 2000b.

ILHA, M. R. S. et al. Spontaneous poisoning in sheep by *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) in southern Brazil. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 123–138, 2001.

Jl, L. et al. Involvement of Bcl-xL degradation and mitochondrial-mediated apoptotic pathway in pyrrolizidine alkaloids-induced apoptosis in hepatocytes. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 231, n. 3, p. 393–400, 15 set. 2008.

KAWAKAMI, S.; KOHMOTO, H. Production of Prostaglandin F₂.ALPHA.(PGF₂.ALPHA.) in Primary Culture of Granulosa Cells from Mature Follicles of Estrous Cows. **Journal of Reproduction and Development**, v. 38, n. 3, p. 239–241, 1992.

KRABBE, A. A. et al. Megalocitose de células luteínicas grandes de vacas prenhes com seneciose crônica. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 35, n. 1, p. 33–38, 2015.

LEIGHTON, J. K. et al. Expression of cytochrome P450 1A1, an estrogen hydroxylase, in ovarian granulosa cells is developmentally regulated. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 52, n. 4, p. 351–356, 1995.

LUCENA, R. B. et al. Poisoning by pyrrolizidine alkaloids in ruminants and horses in Brazil. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 30, n. 5, p. 447–452, 2010.

MATTOCKS, A. R. et al. Metabolism and toxicity of synthetic analogues of macrocyclic diester pyrrolizidine alkaloids. **Chemico-Biological Interactions**, v. 58, n. C, p. 95–108, 1 jan. 1986.

MÉNDEZ, M. DEL C. et al. Intoxicação experimental por cinco espécies de *Senecio* em bovinos e aves. **Pesqui. vet. bras**, p. 63–9, 1990.

MÉNDEZ, M. C.; RIET-CORREA, F. Plantas tóxicas e micotoxícoses. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária/UFPel, 2000. 112 p

MÉNDEZ, M. C.; RIET-CORREA, F. Plantas tóxicas e micotoxícoses. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária/UFPel, 2008. 298 p.

NAGASHIMA, T. et al. Connective tissue growth factor is required for normal follicle development and ovulation. **Molecular Endocrinology**, v. 25, n. 10, p. 1740–1759, 1 out. 2011.

PANZIERA, W. et al. Intoxicação por *senecio brasiliensis* em bezerros: Padrão e evolução de lesões hepáticas. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 37, n. 1, p. 8–16, 1 jan. 2017.

PELSER, P. B. et al. An ITS phylogeny of tribe Senecioneae (Asteraceae) and a new delimitation of *Senecio* L. **TAXON**, v. 56, n. 4, p. 1077–1104, 1 nov. 2007.

- PERETZ, J. et al. Bisphenol A Impairs Follicle Growth, Inhibits Steroidogenesis, and Downregulates Rate-Limiting Enzymes in the Estradiol Biosynthesis Pathway. **Toxicological Sciences**, v. 119, n. 1, p. 209–217, 1 jan. 2011.
- PESCADOR, N. et al. Steroidogenic acute regulatory protein in bovine corpora lutea. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 2, p. 485–491, 1996.
- PORTELA, V. M. et al. Role of Angiotensin II in the Perioovulatory Epidermal Growth Factor-Like Cascade in Bovine Granulosa Cells In Vitro1. **Biology of Reproduction**, v. 85, n. 6, p. 1167–1174, 1 dez. 2011.
- PRAKASH, A. S. et al. Pyrrolizidine alkaloids in human diet. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 443, n. 1–2, p. 53–67, 15 jul. 1999.
- RIESE, D. J.; CULLUM, R. L. Epiregulin: Roles in normal physiology and cancer Seminars in Cell and Developmental Biology. **Elsevier Ltd**, 1 abr. 2014.
- RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: Importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 1, p. 38–42, 2001.
- RISSI, D. R. et al. Plant and plant-associated mycotoxins poisoning in cattle in Rio Grande do Sul, Brazil: 461 Cases. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 7, p. 261–268, 2007.
- RUSSELL, D. L.; ROBKER, R. L. **Molecular mechanisms of ovulation: Co-ordination through the cumulus complex. Human Reproduction Update**. Hum Reprod Update, maio 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17242016/>>. Acesso em: 28 abr. 2021
- SARTORI, R. et al. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 5, p. 1403–1409, 2001.
- SHIRASAWA, S. et al. Dermatitis due to epiregulin deficiency and a critical role of epiregulin in immune-related responses of keratinocyte and macrophage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 38, p. 13921–13926, 21 set. 2004.
- STEENKAMP, V. et al. The effect of Senecio latifolius a plant used as a South African traditional medicine, on a human hepatoma cell line. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, n. 1, p. 51–58, 1 nov. 2001.
- SUNAGA, N. et al. Oncogenic KRAS-induced epiregulin overexpression contributes to aggressive phenotype and is a promising therapeutic target in non-small-cell lung cancer. **Oncogene**, v. 32, n. 34, p. 4034–4042, 22 ago. 2013.
- SUNAGA, N.; KAIRA, K. **Epiregulin as a therapeutic target in non-small-cell lung cancer Lung Cancer: Targets and Therapy**. Dove Medical Press Ltd., 12 out. 2015. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC5217521/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25217521/)>. Acesso em: 3 maio. 2021

WHITE, G. E. et al. Fractalkine has anti-apoptotic and proliferative effects on human vascular smooth muscle cells via epidermal growth factor receptor signalling. **Cardiovascular Research**, v. 85, n. 4, p. 825–835, mar. 2010.

XU, J. et al. **Pyrrolizidine alkaloids: An update on their metabolism and hepatotoxicity mechanism** **Liver Research**. KeAi Communications Co, 1 dez. 2019.