



PARÂMETROS FUNCIONAIS RELACIONADOS À FERTILIDADE E DESEMPENHO REPRODUTIVO DE FÊMEAS *KNOCKOUT* PARA O RECEPTOR $\alpha 7$ NACHR

Palavras-Chave: Obesidade, Fertilidade, Receptor $\alpha 7$ nAChR

Autores(as):

CAROLINE ALVES DOS SANTOS, FCA – UNICAMP

Prof^a. Dr^a. LETÍCIA IGNÁCIO-SOUZA (orientadora), FCA - UNICAMP

Dr^a. PRISCILLA KARLA LOPES (co-orientadora), FCA - UNICAMP

INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica não-transmissível e se tornou um problema de saúde pública que tem crescido mundialmente (WHO, 1998; WHO, 2016). Esse crescimento também é observado nas gerações mais jovens, o que indica, ainda, que a obesidade em idade materna é um fator determinante na programação metabólica da prole (WHO, 2019).

Dentre as alterações ocasionadas pela obesidade, destaca-se a inflamação, um estado crônico de baixo grau caracterizado pela produção elevada de citocinas pró-inflamatórias que podem alterar o ambiente intra-uterino (SEGOVIA *et al.*, 2014). Além disso, supõe-se que o acúmulo de gordura excessiva esteja associado a infertilidade, pois pode estar envolvido em processos fisiopatológicos relacionados a alterações no sistema reprodutivo feminino, incluindo à fertilidade (BROUGHTON, 2017).

Existem vias e mecanismos que apresentam uma resposta anti-inflamatória e são amplamente estudados, como a via anti-inflamatória colinérgica, que possui receptores de acetilcolina (AChR), em específico a subunidade nicotínica $\alpha 7$ nAChR, que auxilia o nervo vago na redução dos níveis das citocinas pró-inflamatórias (PAVLOV *et al.*, 2003; OLOFSSON *et al.*, 2011). Animais que apresentam a deleção desse receptor apresentaram ninhadas menores ou redução na fertilidade (ORR-URTREGGER *et al.*, 1997; The Jackson Laboratory, 2022). Desta maneira, visto a correlação entre obesidade materna e o papel do receptor nicotínico, pretende-se avaliar os parâmetros funcionais relacionados à fertilidade e à reprodução de fêmeas *knockout* para o receptor $\alpha 7$ nAChR.

METODOLOGIA

Para realização da primeira parte deste trabalho, foram resgatados os registros da Ata de Manutenção de Colônias Geneticamente Modificadas do Laboratório de Distúrbios do Metabolismo:

As matrizes com cerca de 6 semanas de vida estão aptas ao acasalamento e são mantidas com machos adultos da mesma linhagem. Para cada fêmea é destinado um macho, estes são mantidos juntos até que sinais visuais de prenhez sejam reconhecidos: precocemente pela identificação da presença de tampão seroso vaginal ou, mais tardiamente, pela evolução positiva e significativa no ganho de peso.

A partir da confirmação da prenhez, as fêmeas são isoladas em gaiolas individuais para que o curso da gestação seja acompanhado. Os filhotes nascem por via vaginal e permanecem em lactação até o 28º dia de vida, aproximadamente. Neste momento é realizada a confirmação do sexo da prole e são coletadas amostras da ponta da cauda do animal para realização de genotipagem.

Para avaliação funcional da qualidade e eficiência reprodutiva, alguns dos pontos de maior importância são: 1) as taxas de sucesso no acasalamento 2) a taxa de prolificidade e o tamanho da ninhada, 3) a quantidade

de machos e fêmeas com o genótipo de interesse, 4) o número de filhotes vivos até o desmame e, dessa forma, a viabilidade neonatal, 5) o tempo decorrido para a ocorrência da prenhez e 6) o total de insucessos reprodutivos.

A taxa de acasalamento/fertilidade é calculada pelo número de fêmeas com diagnóstico de prenhez positivo/número de fêmeas acasaladas, a taxa de prolificidade é determinada pelo número de nascidos vivos a cada prenhez e o total de insucessos, é a relação entre o número de fêmeas prenhes que não mantiveram a sua prole, seja por aborto, reabsorção fetal e/ou por comportamentos como o canibalismo ou o abandono do filhote.

- **Acasalamento e acompanhamento do ciclo estral**

Após a primeira metade do plano de trabalho e com a avaliação prévia dos dados, foi realizada a avaliação do ciclo estral de fêmeas representativas de cada uma das linhagens.

O procedimento consiste em inserir aproximadamente 20 µL de solução salina estéril no canal vaginal utilizando uma pipeta, dispensando e sugando o volume no vestíbulo da vagina para obtenção das células epiteliais descamadas e muco. O material coletado foi disposto em uma lâmina e observado, a fresco, em microscópio óptico com iluminação de campo escuro, para prognóstico do estadiamento do ciclo estral. Este acompanhamento foi realizado no mesmo horário, diariamente, durante uma semana.

O estadiamento do ciclo estral e suas transições (WESTWOOD, 2008) foi avaliado pela presença de pelo menos 4 dos 7 estágios identificados com base nas características morfológicas do lavado vaginal: proestro (P, Figura 6A), com predominância de células nucleadas; transição proestro-estro (P-E, Figura 6B); estro (E, Figura 6C), com a presença majoritária de células queratinizadas; transição estro-metaestro (E-M, Figura 6D); metaestro (M, Figura 6E), no qual há uma distribuição igualitária de células nucleadas, células queratinizadas e leucócitos polimorfonucleares; transição metaestro-diestro (M-D, Figura 6F); e diestro (D, Figura 6G), com predominância de leucócitos polimorfonucleares.

- **Apresentação dos dados e análises**

Os dados são apresentados em frequência absoluta e relativa e as taxas e índices calculados, em média e desvio padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1: Resumo dos dados relacionados aos acasalamentos registrados na Ata de Manutenção de Linhagem KO $\alpha 7NACHR$ do Laboratório de Distúrbios do Metabolismo de 2019 a 2023.

	WT / WT	KO / KO	KO / Het
Sucesso no acasalamento (%)	82%	69,3%	77,7%
Tamanho da ninhada (n)	5,5	4,12	4,18
Genótipo Fêmea (n de KO)	-	50,2%	38%
Genótipo Macho (n de KO)	-	49,8%	39%
Idade macho (dias)	99	104	91
Idade fêmea (dias)	78	87	104
Filhotes vivos até desmame (n)	5,4	3,9	4
Tempo para acasalar (dias)	14,59	14,86	18,4
Mortes neonatais (%)	16%	17%	22%

Abortos (%)	57%	45%	50%
Canibalismo (%)	43%	45%	50%
Acasalam. Interrompido (%)	7%	12%	11%
Total de insucessos (%)	23%	29%	33%
Prolificidade (%)	80%	75%	61%
Viabilidade neonatal (%)	98,1%	94,7%	95,7%

Tomando como comparação o acasalamento dos animais selvagens *Wild Type* (WT/WT), de acordo com os resultados apresentados na Tabela 1, a taxa de sucesso no acasalamento confirmava uma observação prática do início da manutenção das colônias que era um maior percentual de sucesso quando o casal era composto de uma fêmea *Knockout* (KO) e um macho Heterozigotos (Het). Tal fato, pode ser associado à uma redução na fertilidade em animais com deleção do receptor $\alpha 7$ (ORR-URTREGER *et al.*, 1997; CHENG *et al.*, 2018) e, assim, um acasalamento homozigótico geneticamente modificado poderia potencializar esses prejuízos. Dessa forma, tornou-se interessante avaliar se essa maior taxa de sucesso também era acompanhada de outros parâmetros importantes para a progressão da colônia.

Assim, avaliando o tamanho da ninhada e a viabilidade neonatal, ambos os acasalamentos das fêmeas *Knockout* não apresentaram diferenças significativas entre o tamanho da ninhada, a viabilidade da prole (filhotes vivos até o desmame) e a idade dos animais, independente do genótipo do macho. Por outro lado, embora o sucesso na confirmação da prenhez tenha sido maior nos casais KO/Het, quando consideramos as mortes neonatais este mesmo acasalamento demonstrou um pior desempenho. Isso gera uma menor taxa de prolificidade e que somado ao maior tempo decorrente até a confirmação da prenhez, sugere que, ao contrário do que se avaliava inicialmente, este tipo de acasalamento não parece ser viável.

Assim, embora os machos Het não carreguem as implicações férteis do knockout, utilizá-los para a manutenção da colônia em busca de um maior sucesso no acasalamento não é vantajoso se considerarmos o desfecho fetal e a manutenção da prole, que, além disso, tem um menor percentual de animais geneticamente modificados, como era de se esperar.

Considerando então que as fêmeas KO podem carregar traços importantes de alteração de fertilidade, avaliamos o ciclo estral destes animais a fim de buscar algumas adaptações decorrentes da deleção do receptor alfa7. Essas avaliações foram feitas em um período recente, às 6 semanas de vida, quando a fêmea ainda está em fase jovem de maturação e, após, às 10 semanas de vida quando o ciclo reprodutivo já está bem estabelecido.

Os gráficos abaixo são representativos do número de animais avaliados (pelo menos 3 de cada genótipo). Os números 1, 2 e 3 presentes no “eixo y” dos gráficos se referem ao Metaestro/Diestro (1), Proestro (2) e Estro (3), respectivamente.

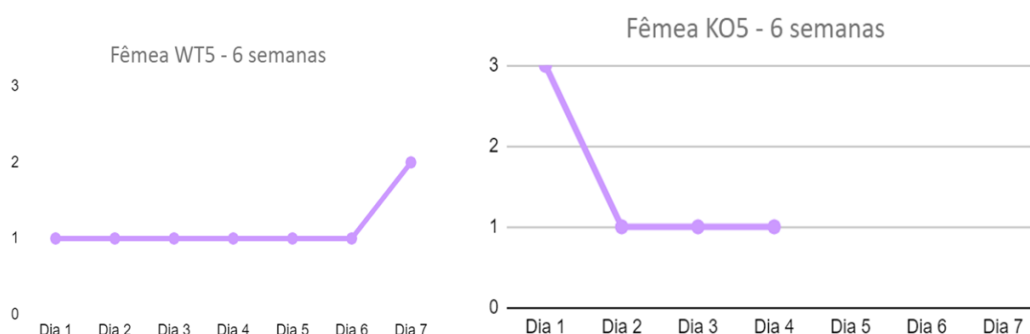


Figura 1: Gráfico representativo do ciclo estral de fêmeas *Wild Type* e *Knockout* com 6 semanas.

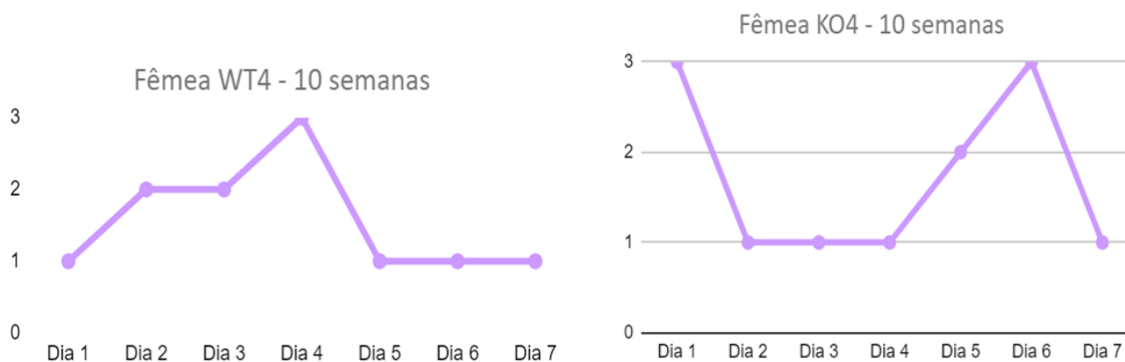


Figura 2: Gráfico representativo do ciclo estral de fêmeas *Wild Type* e *Knockout* com 10 semanas.

Seßenhausen *et al.* (2023) demonstraram a expressão do receptor $\alpha 7$ em várias células ovarianas, podendo este estar envolvido em um complexo fenótipo reprodutivo e interferir na regulação dos ovários de camundongos. Essa expressão parece estar ligada ao aumento na transcrição de proteínas como *Tmsb10*, *Akr1b8*, *Gsta1*, que podem modular as células do estroma, fibroblastos, células da teca folicular ovariana, células imunes, da matriz extracelular e componentes vasculares, podendo ser associadas às mudanças específicas nas células do estroma ovariano. Entretanto, não se sabe como essas células são afetadas, somente que elas regulam o crescimento do folículo fornecendo hormônios, nutrientes e estrutura, sendo depois moduladas pelas células da grânulos e ovócitos (Seßenhausen *et al.*, 2023; RICHARDS *et al.*, 2018). Dessa forma, todo o ciclo reprodutivo poderia ser influenciado pela ausência do receptor.

A avaliação qualitativa dos gráficos nos permite sugerir que o ciclo das fêmeas *Knockout* parece ser mais curto, uma vez que cerca de 60% delas passaram pelo estro duas vezes em um período de sete dias, em comparação com 25% das fêmeas *Wild Type* que, em sua maioria, passaram pelo estro somente uma vez. Além disso, apesar da análise do ciclo em fêmeas mais novas não estar completa, parece que elas, já às 6 semanas, apresentaram características do período do estro em pelo menos 1 dos dias avaliados, ao passo que as fêmeas selvagens ainda não apresentavam características de maturidade sexual.

CONCLUSÕES

Os resultados iniciais deste trabalho permitiram a sistematização dos dados da colônia de manutenção da linhagem *$\alpha 7nAChR$ KO* para além dos parâmetros de fertilidade avaliados com base apenas no sucesso de acasalamento. Assim, embora a combinação de um genótipo *KO* da fêmea com o macho heterozigoto pudesse parecer mais vantajoso pela presença de um alelo não polimórfico, os nossos dados mostraram que em termos de desfecho e viabilidade fetal, o acasalamento em homozigose ainda é o mais profícuo.

Adicionalmente, confirmamos modificações funcionais importantes no ciclo estral de fêmeas *$\alpha 7nAChR$ KO*, sugerindo que a falta do receptor alfa 7 pode estar antecipando a vida reprodutiva das fêmeas e levando a uma ciclagem mais curta na vida adulta, o que poderia interferir diretamente no tempo de viabilidade fértil. Essas e outras questões ainda precisam ser respondidas e podem estar relacionadas à mudanças hormonais e na reserva folicular ovariana, que serão exploradas no próximo ano do projeto.

BIBLIOGRAFIA

- BROUGHTON, D. E.; MOLEY, K. H. Obesity and female infertility: potential mediators of obesity's impact. **Fertil Steril**, v. 107, p. 840-847, 2017.
- CHENG, S. F.; QIN, X. S.; HAN, Z. L.; SUN, X. F.; FENG, Y. N.; YANG, F.; GE, W.; LI, L.; ZHAO, Y.; DE FELICI, M.; ZOU, S. H.; ZHOU, Y; SHEN, W. Nicotine exposure impairs germ cell development in human fetal ovaries cultured in vitro. **Aging**, v. 10, p. 1556-1574, 2018.
- OLOFSSON, P. S.; KATZ, D. A.; ROSAS-BALLINA, M.; LEVINE, Y. A.; OCHANI, M.; VALDÉS-FERRER, S. I.; PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J.; CHAVAN, S. S. $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor ($\alpha 7nAChR$) Expression in

Bone Marrow-Derived Non-T Cells Is Required for the Inflammatory Reflex. **Molecular Medicine**, v.18, p. 539-543, 2012.

ORR-URTREGER, A.; GÖLDNER, F.M.; SAEKI, M.; LORENZO, I.; GOLDBERG, L.; DE BIASI, M.; DANI, J. A.; PATRICK, J.W.; BEAUDET, A.L. Mice deficient in the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor lack alpha-bungarotoxin binding sites and hippocampal fast nicotinic currents. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, p. 9165-9171, 1997.

PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. The vagus nerve and the inflammatory reflex-linking immunity and metabolism. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 8, p. 743-754, 2012.

SEßENHAUSEN, P.; CABAN, K. M.; KREITMAIR, N.; PEITZSCH, M.; STOCKL, J. B.; MEINSOHN, M. C.; PEPIN, D.; POPPER, B.; FROHLICH, T.; MAYERHOFER, A. An ovarian phenotype of alpha 7 nicotinic receptor knock-out mice. **Reproduction**. Disponível em: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/aop/rep-23-0123/rep-23-0123.xml?body=article-info>. Acesso em: 31 jul. 2023.

SEGOVIA, S. A.; VICKERS, M. H.; GRAY, C.; REYNOLDS, C. M. Maternal Obesity, Inflammation, and Developmental Programming. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-14, 2014.

THE JACKSON LABORATORY. **B6.129S7-Chrna7tm1Bay/J**. Disponível em: <https://www.jax.org/strain/003232>. Acesso em: 15 de maio de 2022.

WESTWOOD, F. R. The Female Rat Reproductive Cycle: A Practical Histological Guide to Staging. **Toxicologic Pathology**, v. 36, p. 375-384, 2008.

WORD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity**. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab_1. Acesso em: 13 de maio de 2022.