

# DESEMPENHO REPRODUTIVO DE FÊMEAS *KNOCKOUT* PARA O RECEPTOR $\alpha 7nAChR$ E O PAPEL DA SINALIZAÇÃO COLINÉRGICA OVARIANA

Palavras-Chave: Fertilidade,  $\alpha 7nAChR$ , Inflamação

Autores(as): CAROLINE ALVES DOS SANTOS, FCA – UNICAMP  
Prof<sup>fa</sup>. Dr<sup>a</sup>. LETÍCIA IGNÁCIO DE SOUZA ZIMMERMANN (orientadora), FCA – UNICAMP  
Me. ANA PAULA VARELA SANCHES (co-autora), 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 (BROUGHTON, 2017).

Fisiologicamente, nosso organismo apresenta mecanismos de resposta anti-inflamatória para garantir a homeostase em determinadas situações, como por exemplo a via anti-inflamatória colinérgica. Como um componente desta via, destacamos os receptores de acetilcolina (AChR), em específico a subunidade nicotínica  $\alpha 7nAChR$ , que auxilia o nervo vago na redução dos níveis das citocinas pró-inflamatórias (PAVLOV *et al.*, 2003; OLOFSSON *et al.*, 2011). Curiosamente, animais que apresentam a deleção desse receptor e portanto alguma falha na ativação dessa via, apresentaram ninhadas menores e/ou redução na fertilidade (ORR-URTREGER *et al.*, 1997; The Jackson Laboratory, 2022).

A literatura demonstra, ainda, a presença do receptor  $\alpha 7$  nos ovários de mamíferos, inclusive de camundongos (CHENG *et al.*, 2018 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11441#gene-expression>; YUE *et al.*, 2014). Além disso, estudos também apresentam evidências acerca da expressão de acetilcolina e colina nos ovários e no fluido folicular, sendo essenciais para a ativação de  $\alpha 7nAChR$  (BLOHBERGER *et al.*, 2015; URRRA *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2022). O receptor é expresso tanto nos ovários de fêmeas, quanto nos testículos de machos, o que poderia ser relacionado a fertilidade desses animais, que se encontra reduzida (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11441#gene-expression>).

Desta maneira, visto a correlação entre a função do receptor nicotínico e a fertilidade, pretende-se avaliar os parâmetros funcionais relacionados à fertilidade e à reprodução de fêmeas *Knockout* para o receptor  $\alpha 7nAChR$  e o papel da sinalização ovariana.

## METODOLOGIA:

O protocolo de experimentação animal envolvido neste trabalho foi aprovado pela CEUA/UNICAMP sob número 6359-1/2023.

Para a obtenção de fêmeas geneticamente modificadas para este trabalho, matrizes machos e fêmeas *Knockout B6.129S7-Chrma-7tmBay1/J* foram recebidos do CEMIB/UNICAMP e, estando aptos ao acasalamento, foram mantidos juntos a partir de cerca de 6 semanas de vida. 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. Apenas animais com o genótipo confirmado podem ser utilizados para as análises. Dessa forma, como já foi esclarecido, como possuem fertilidade reduzida, a obtenção dos animais experimentais não se dá de maneira única e direta, mas necessita de uma série de experimentos sequenciais.

- **Acasalamento e acompanhamento do ciclo estral**

Após as fêmeas da prole completarem 6 semanas, passamos à segunda etapa do trabalho ao realizarmos a avaliação do ciclo estral das mesmas. É importante destacar que o experimento foi realizado quando as fêmeas completaram 6 e 10 semanas de idade, sendo respectivamente quando as fêmeas estão iniciando a maturidade sexual e quando a maturidade sexual já se encontra bem estabelecida (ELVIS-OFFIAH *et al.*, 2022).

O acompanhamento do ciclo estral foi realizado em horário diário coincidente durante dez dias de 12 fêmeas *Knockout*. 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.

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, com predominância de células nucleadas; estro, com a presença majoritária de células queratinizadas; metaestro (M, Figura 6E), no qual há uma distribuição igualitária de células nucleadas, células queratinizadas e leucócitos polimorfonucleares; e diestro (D, Figura 6G), com predominância de leucócitos polimorfonucleares.

- **Eutanásia e avaliação de seções seriadas**

Após a observação do ciclo estrole identificação da fase fértil (Proestro ou Estro) após 10 dias de análise para registro da oscilação do ciclo, foi realizada a eutanásia das fêmeas e posterior laparotomia para a coleta dos ovários para a realização da histologia e avaliação dos folículos ovarianos. Dessa forma, todos os ovários foram extraídos e congelados até a análise histológica em -80°C.

Para a realização da histologia, foi necessário padronizar o procedimento, pois tal protocolo não havia ainda sido executado em nosso grupo de pesquisa e, por isso, parte do plano de trabalho foi dedicado a padronizá-lo.

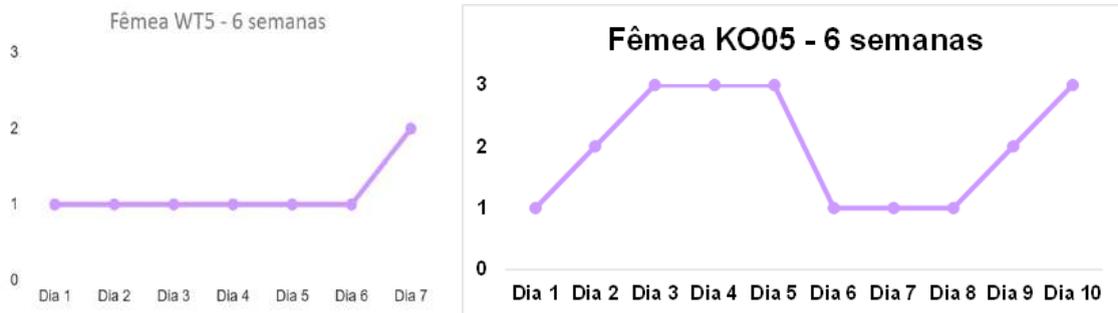
Os ovários congelados (n = 7) foram embebidos em Tissue Tek e seccionados em série em criostato. Posteriormente, os tecidos embebidos em Tissue Tek foram cortados (10 µm de espessura) e cada corte foi corado com hematoxilina e eosina (H&E) para avaliar a morfologia geral, a presença de folículos e corpos lúteos ao microscópio. Devido à necessidade de padronização de imagens, protocolo de coloração, corte e fixação, as análises dos folículos foram demoradas e estes foram classificados de acordo com o tamanho e morfologia, conforme descrito a seguir. Os folículos primordiais são os menores e apresentam um oócito cercado por células granulosas achatadas; os folículos primários possuem um oócito circundado por uma camada de células granulosas cúbicas; os folículos secundários apresentaram pelo menos duas camadas de células granulosas ao redor do oócito sem cavidade antral; os folículos terciários ou antrais são caracterizados pela presença de duas camadas de células granulosas ao redor do oócito e uma cavidade antral (Seßenhausen *et al.*, 2023). Também foi verificada a presença de corpos lúteos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

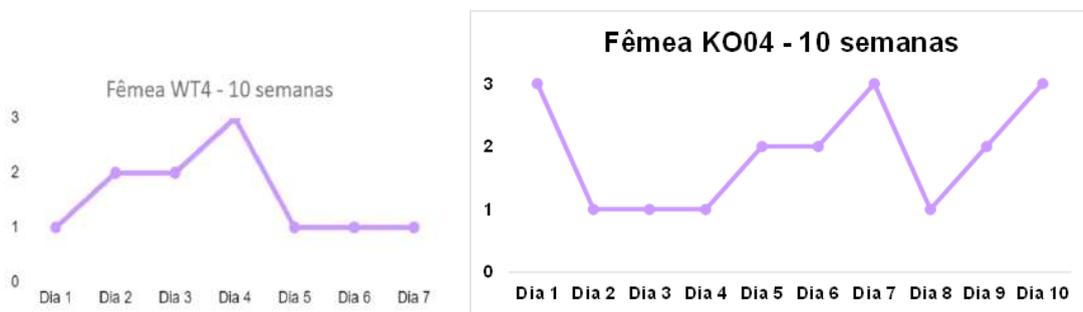
Este trabalho é uma continuação de um estudo anterior do grupo, onde comparamos o ciclo estral das fêmeas selvagens (*WildType*) e *Knockout* (KO). No entanto, aumentamos o número de fêmeas avaliadas *Knockout* (de n= 6 para um n=12) e dias avaliados (de 7 dias aumentamos para 10 dias). É importante salientar, que foi necessário utilizar os dados relacionados às fêmeas *WildType* do estudo anterior, porque tivemos

dificuldade no fornecimento de animais dessa linhagem e conseguimos avançar com o estudo somente com as fêmeas KO.

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.

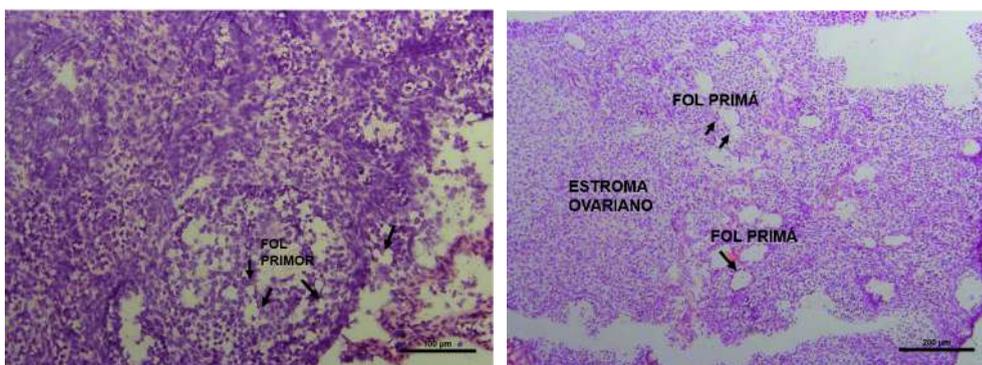


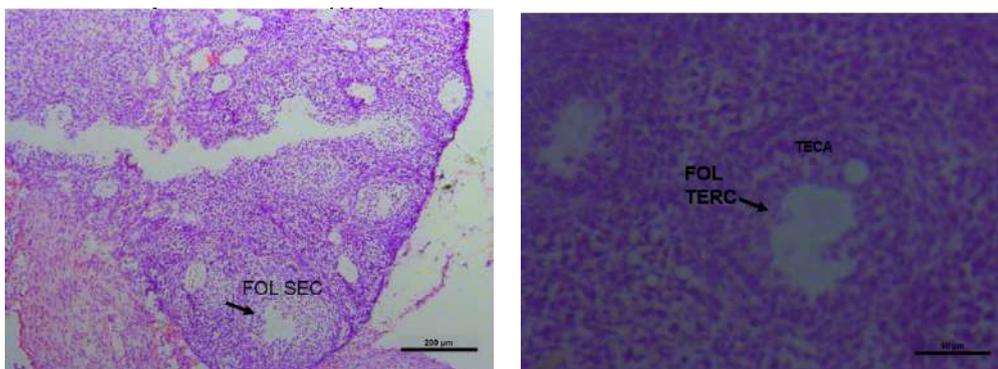
**Figuras 1 e 2:** Gráficos representativos do ciclo estral de fêmeas *Wild Type* e *Knockout* com 6 semanas.



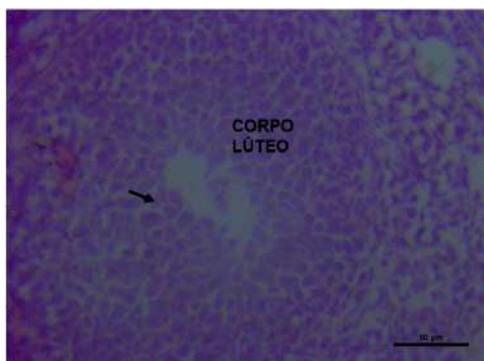
**Figuras 3 e 4:** Gráficos representativos do ciclo estral de fêmeas *Wild Type* e *Knockout* com 10 semanas.

A avaliação qualitativa dos gráficos nos permite sugerir que o ciclo das fêmeas *Knockout* parece ser mais curto, uma vez que cerca de 58% delas passaram pelo estro duas vezes em um período de dez 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 cerca de 41% delas ( $n = 5$ ), já às 6 semanas, apresentaram características do período do estro em pelo menos 1 dos dias avaliados e outros 41% ( $n = 5$ ) de outras fêmeas apresentaram também características de estro em 2 dos dias avaliados, ao passo que as fêmeas selvagens ainda não apresentavam características de maturidade sexual.





**Figura 7 e 8:** Imagens representativas dos folículos secundários (FOL SEC) e folículos terciários (FOL TERC) apontados pelas setas.



**Figura 9:** Imagem representativa do corpo lúteo.

Examinamos a morfologia ovariana em camundongos *Knockout (KO)* nas fases férteis Proestro ou Estro. Nesse sentido, foi possível identificar folículos primordiais, primários, secundários e terciários, além de corpo lúteo. É interessante ressaltar que observamos tecido estromal abundante nesses animais. No entanto, foi observado que o número de folículos primordiais e terciários foi menor.

É relatado pela literatura que em animais adultos, os oócitos de pequenos folículos (como os primordiais e primários) são locais de expressão do receptor *alfa7* (Seßenhausen *et al.*, 2023). Além disso, assim como observado pelo nosso estudo, Seßenhausen *et al.* (2023) também demonstraram contagens mais baixas de folículos primordiais, em comparação com animais selvagens, o que poderia indicar a importância do papel do receptor *alfa7* na formação de folículos primordiais e posterior ativação e/ou crescimento após o nascimento dos animais. Entretanto, ainda não está bem estabelecido as alterações nesses folículos, pois parecem estar relacionadas a fatores anteriores ao nascimento, pois os folículos primordiais são formados ainda no período fetal (SKINNER, 2005), que são modulados por fatores de crescimento e manutenção dos folículos primordiais, como PGRMC2 (PELUSO *et al.* 2018). Ainda, é importante destacar que a contagem de folículos primários e secundários ainda precisa ser confirmada e confrontada com um maior número de animais selvagens para maiores conclusões.

Já em relação à redução de folículos terciários de fêmeas *Knockout* não há evidências na literatura que discorrem sobre isto. Porém, sabe-se que os folículos terciários são importantes, pois antecedem a ovulação e possível concepção (MOTTA, 2016). Assim, especulamos que uma redução na contagem desses folículos poderia estar relacionada à redução na fertilidade destes animais. Contudo, são necessários mais estudos, devido a relação da 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 (Seßenhausen *et al.*, 2023).

## CONCLUSÕES:

Neste estudo, continuamos a observar 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 desses animais. Além disso, este plano de trabalho permitiu o desenvolvimento do protocolo de secção e coloração com H&E dos ovários de camundongos, experimento antes não realizado em nosso laboratório e conduzido pela aluna PIBIC deste projeto.

Também observamos, de maneira preliminar, que os folículos ovarianos das fêmeas geneticamente modificadas estão em desproporção, podendo os primários e terciários se encontrarem reduzidos, o que poderia estar relacionado com a ausência do receptor *alfa7* nesses animais. Entretanto são necessárias mais evidências para fazer esta afirmação. Novos grupos experimentais estão em andamento a fim de cobrir esta lacuna.

---

## 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.
- BLOHBERGER J. *et al.* Readthrough acetylcholinesterase (AChE-R) and regulated necrosis: pharmacological targets for the regulation of ovarian functions? **Cell Death and Dis**, v. 6, 2015.
- CHENG, S. F. *et al.* Nicotine exposure impairs germ cell development in human fetal ovaries cultured in vitro. **Ageing**, v. 10, p. 1556-1574, 2018.
- ELVIS-OFFIAH, U. B. *et al.* Our Clear-Cut Improvement to the Impact of Mouse and Rat Models in the Research Involving Female Reproduction. **Animal Models and Experimental Research in Medicine**. DOI: 10.5771/intechopen.106858. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/chapters/85238>>. Acesso em: 13 de maio de 2024.
- MOTTA, L. C. B. **Avaliação histológica da viabilidade de folículos ovarianos suínos submetidos a diferentes condições de transporte**. 2016. 41 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016. Disponível em: <[https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/48073/3/2016\\_tcc\\_lcbmotta.pdf](https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/48073/3/2016_tcc_lcbmotta.pdf)>.
- NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **Chrna7 cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 7 [ *Mus musculus* (house mouse) ]**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11441#gene-expression>>. Acesso em: 16 ago. 2023.
- OLOFSSON, P. S. *et al.*  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine Receptor ( $\alpha 7$ nAChR) 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. *et al.* 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.
- PELUSO, J.J. *et al.* PGRMC1/2 promotes luteal vascularization and maintains the primordial follicles of mice. **Reproduction**, v. 156, p. 365–373, 2018.
- SEBENHAUSEN, P. *et al.* 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. *et al.* Maternal Obesity, Inflammation, and Developmental Programming. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-14, 2014.
- SKINNER, M. K. Regulation of primordial follicle assembly and development. **Human Reproduction Update**, v. 11, p. 461–471, 2005.
- THE JACKSON LABORATORY. **B6.129S7-Chrna7tm1Bay/J**. Disponível em: <<https://www.jax.org/strain/003232>>. Acesso em: 15 de maio de 2022.
- URRA, J. *et al.* In vivo blockade of acetylcholinesterase increases intraovarian acetylcholine and enhances follicular development and fertility in the rat. **Sci Rep**, v. 6, 2016.
- WANG, L. *et al.* Glutamine and norepinephrine in follicular fluid synergistically enhance the antioxidant capacity of human granulosa cells and the outcome of IVF-ET. **Sci Rep**, v. 12, 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](https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab_1)>. Acesso em: 13 de maio de 2022.
- YUE, F. *et al.* A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. **Nature**, v. 515, p. 355-364, 2014.