



---

Universidade de Brasília

**FACULDADE DE MEDICINA**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFUNCIONAL DAS  
CÉLULAS SOMÁTICAS DE FOLÍCULO OVARIANO  
BOVINO, CULTIVADO EM MEIO DE CULTURA  
DEFINIDO, NÃO INDUTOR DE LUTEINIZAÇÃO.**

**ROSÂNGELA BATISTA DE VASCONCELOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**BRASÍLIA/ DF**

**JUNHO/2008**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFUNCIONAL DAS CÉLULAS SOMÁTICAS DE  
FOLÍCULO OVARIANO BOVINO, CULTIVADO EM MEIO DE CULTURA DEFINIDO,  
NÃO INDUTOR DE LUTEINIZAÇÃO.**

**ROSÂNGELA BATISTA DE VASCONCELOS**

**ORIENTADOR: ALZIRA AMÉLIA MARTINS ROSA E SILVA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**PUBLICAÇÃO:**

**BRASÍLIA/DF  
JUNHO/2008**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFUNCIONAL DAS CÉLULAS SOMÁTICAS DE  
FOLÍCULO OVARIANO BOVINO, CULTIVADO EM MEIO DE CULTURA DEFINIDO,  
NÃO INDUTOR DE LUTEINIZAÇÃO.**

**ROSÂNGELA BATISTA DE VASCONCELOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À FACULDADE DE MEDICINA DA  
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS  
A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS MÉDICAS NA ÁREA DE  
CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIAS MÉDICAS.**

**APROVADA POR:**

**ALZIRA AMÉLIA MARTINS ROSA E SILVA UnB  
(ORIENTADOR) CPF: 552.143.208-68  
[aamresil@unb.br](mailto:aamresil@unb.br)**

**ADELINA MARTA DOS REIS - UFMG  
(EXAMINADOR EXTERNO) CPF: 005.749.578-55**

**ADRIANO BUENO TAVARES - UCB  
(EXAMINADOR EXTERNO) CPF 141.745.998-07**

**BRASÍLIA/DF JUNHO DE 2008.**

**FICHA CATALOGRÁFICA**

Vasconcelos, R.B

Caracterização de hemissecação da parede de folículo ovariano bovino cultivado em meio de cultura definido./ Rosângela Batista de Vasconcelos; orientação de Alzira Amélia Martins Rosa e Silva. – Brasília, 2008.

78p.: il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Medicina, 2008.

1. Hemissecação folículo ovariano. 2. Esteroidogênese. 3. Biotecnologia. I. Rosa e Silva AAM.

**REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA**

Vasconcelos, R.B Caracterização de hemissecação da parede de folículo ovariano bovino cultivado em meio de cultura definido. Brasília: Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, 2008, 78 p. Dissertação de Mestrado.

**CESSÃO DE DIREITOS**

NOME DO AUTOR: Rosângela Batista de Vasconcelos

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Caracterização de hemissecação da parede de folículo ovariano bovino cultivado em meio de cultura definido.

GRAU: Mestre      Ano: 2008

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor

---

Rosângela Batista de Vasconcelos

CPF: 675.970.252-20

Endereço: Avenida Araguaia nº1559 Setor Santos Dumont

CEP- 68550-000 Redenção/PA - Brasil

Tel: (94) 3424-0419 E-mail: [rvfar@yahoo.com.br](mailto:rvfar@yahoo.com.br)

*"É melhor tentar e falhar,  
que preocupar-se e ver a vida passar;  
é melhor tentar, ainda que em vão,  
que sentar-se fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar,  
que em dias tristes em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz, embora louco,  
que em conformidade viver ..."*

**Martin Luther King**

*Dedico este trabalho à minha Família e à minha amiga Cejana (Aninha),  
você são as minhas duas metades.  
Aqui está a materialização dos nossos sonhos em comum.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, proteção e pelos amigos que colocou na minha vida.

À minha orientadora, professora Dra. Alzira, pela confiança e credibilidade. Por todos os papéis que adotou na minha vida: orientadora, amiga e conselheira. Por compartilhar seus conhecimentos e ensinar-me a pensar, mas principalmente por me ajudar a enfrentar meus medos e a me superar. Muito Obrigada.

Aos meus pais, Antônio e Rosirene, sou apenas um reflexo de vocês. Obrigada pelo amor incondicional, pela educação, pelos conselhos, pelo apoio onipresente e incentivo. Vocês são o meu suporte, a pedra fundamental da minha vida.

Às minhas irmãs, Roseane e Apoliane, por estarem sempre ao meu lado, e por me amarem apesar dos infindáveis defeitos. Seremos sempre inseparáveis. Sem vocês nada disso seria possível.

À minha querida amiga CejANA, não tenho palavras que descrevam fielmente o que você é para mim. Você me fez uma pessoa melhor... Ensinou-me a ler as entrelinhas... Ler a alma... Fez o meu caminho mais suave... alegre e colorido. TE AMO...

Ao meu querido Dan. Tudo começou com a amizade, respeito, admiração e cumplicidade, conversas intermináveis, cafezinhos diários, que na verdade só refletiam uma vontade inexplicável de ficarmos juntos... e aqui estamos... sou feliz com você.

A todos aqueles que me feriram, magoaram, decepcionaram, a todos que mentiram e me enganaram... Vocês me fizeram mais forte, mais firme, mais segura e esperta. Vocês foram apenas pedras no caminho, que juntei e fiz escadas.

A todos meus familiares que torceram por mim mesmo sem terem compreensão do valor desta conquista.

Ao Rafael e sua família, pelo apoio, amizade, e incentivo. Vocês foram o meu suporte aqui em Brasília.

À Profa. Dra. Eliana Pinheiro por ter me iniciado ao mundo científico, e pelo exemplo de pesquisadora e mulher.

A todos do Laboratório Integrado, especialmente as bat girls, Joicy e Caroline, e a Luciana, pela convivência e amizade durante estes anos.

Às minhas amigas do laboratório, Ingrid, Laura, Luciana Guilhem, Luciana Lana, João Vitor, Dany Cris, muito obrigada pela amizade, pelas conversas e momentos agradáveis, pelo incentivo, carinho... Sem a ajuda de vocês tudo teria sido muito mais difícil!

Agradecimento especial à minha amiga Ingrid. Com você tudo ficou mais fácil, mais divertido, tranquilo e calmo. Obrigada pela paciência em me ouvir durante horas afinco, e pelos minutos de palavras pronunciadas com sabedoria que me fizeram refletir...

À Loise pela amizade, carinho e paciência com os RT-PCRs. Você surgiu na minha vida como um anjo.

Aos meus amigos, Helena e Wanderlei, pelas oportunidades e compreensão nos momentos de ausência.

Ao prof. Dr. Fernando Torres Araripe, por disponibilizar conhecimento, orientação e o Laboratório de Biologia Molecular.

À professora Mônica e ao professor Ricardo, do módulo 7, que cederam o laboratório de cultura de células onde pudemos iniciar os experimentos.

À professora Anamélia e a todos do LIB, pela orientação e auxílio nos procedimentos de histologia e imunohistoquímica.

Ao laboratório e de Farmacologia por disponibilizarem equipamentos necessários para a conclusão deste trabalho.

Às meninas e ao menino que passaram pelo laboratório: Eveline, Juliana, Lívia, Daniele e Rodrigo muito obrigado pela amizade e por também terem ajudado em várias etapas da realização deste trabalho.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação, por toda atenção dispensada.

Aos docentes com os quais tive a oportunidade de ampliar meus conhecimentos, muito obrigada.

Aos proprietários e funcionários dos matadouros que cederam os ovários para a realização deste trabalho, em especial ao Sr. João Grilo e Dna. Aidê, por fazerem as horas de espera tão agradáveis.

À UnB, FAPDF, PRONEX e CAPES por proporcionarem a realização deste.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AP-1 – Proteína – 1 ativadora  
ATP – Adenosina trifosfato  
BSA – Albumina sérica bovina  
BMP – Proteína morfogenética do osso  
3 $\beta$ -HSD – 3 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase  
17 $\beta$ -HSD – 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase  
cAMP – Adenosina monofosfato cíclico  
CG – CG  
CT – CT  
CRE – Elemento responsivo ao estrógeno  
C-FOS – Protooncogene  
Cx 43 – Conexina 43  
cDNA – DNA complementar  
DTT – Ditioneitol  
dNTPs – Deoxinucleosídeo trifosfato  
DNA – Ácido  $\square$ ibonucléico $\square$ cléico  
DEPC – Dietil-pirocarbonato  
E2 – 17 $\beta$  estradiol  
ERK – Proteínas quinase reguladas por extracelular (quinases serina/treonina)  
FSH – Hormônio folículo estimulante  
GDF-9 – Fator de diferenciação do crescimento-9  
GAPD – Gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase  
HS – Hemisseção folicular  
HMG-CoA – 3-hidroxi 3-metilglutaril coenzima A  
HDL – Lipoproteínas plasmáticas de alta densidade  
LDL - Lipoproteínas de baixa densidade  
IGF-I – Fator de crescimento semelhante a insulina tipo I  
IGFBP – Proteína ligadora de IGF  
KL – kit ligante derivado das CG  
KSR - Cetoesteróides redutase  
LH – Hormônio luteinizante  
MAPKs – Proteínas quinases ativadoras de mitógenos

mRNA – RNA mensageiro

PAPP-A – Proteína-A associada a gravidez

PIVE – Produção *in vitro* de embriões

PKA – Proteína quinase A

PVA – Álcool polivinílico

PBR – Receptor benzodiazepínico periférico

P4 – Progesterona

P450arom – Enzima P450 aromatase

P450c17 –17 $\alpha$  hidroxilase

P450scc –P450 side chain cleavage

RE – Retículo endoplasmático

RNA – Ácido Ribonucléico

RT-PCR – *Reverse Transcriptase Chain Reaction*

SFB – Soro fetal bovino

StAR – Proteína de regulação aguda da esteroidogênese

SR-BI – Receptor scavenger classe B tipo I.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2. OBJETIVOS</b>	4
<b>3. REVISÃO</b>	5
<b>3.1 Foliculogênese</b>	5
3.1.1 <i>Estágios do desenvolvimento folicular</i>	6
3.1.2 <i>Dinâmica folicular durante o ciclo estral</i>	8
3.1.3 <i>Folículo dominante versus folículo subordinado</i>	10
<b>3.2 Esteroidogênese no folículo ovariano</b>	14
3.2.1 <i>Aquisição de colesterol</i>	17
3.2.2 <i>Enzimas da Esteroidogênese folicular</i>	18
3.2.2.1 <i>Proteína de regulação aguda da esteroidogênese – StAR</i>	18
3.2.2.2 <i>Reação side chain cleavage – P450 scc</i>	19
3.2.2.3 <i>3<math>\beta</math>hidroxiesteróide Desidrogenase <math>\Delta</math>5-<math>\Delta</math>4 isomerase – 3<math>\beta</math>HSD</i>	19
3.2.2.4 <i>17<math>\alpha</math>Hidroxilase / 17, 20 desmolase / P450 c17</i>	20
3.2.2.5 <i>P450 aromatase</i>	21
3.2.2.6 <i>17<math>\beta</math>hidroxiesteróide desidrogenase</i>	21
<b>3.3 Expressão da Conexina 43 em células foliculares</b>	23
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	24
<b>4.1 Delineamento Experimental</b>	24
4.1.1 <i>Experimento 1</i>	24
4.1.2 <i>Experimento 2</i>	25
4.1.3 <i>Experimento 3</i>	25
<b>4.2 Coleta dos ovários, obtenção e cultivo das HS foliculares</b>	26
<b>4.3 Determinação do RNAm das Enzimas da Esteroidogênese nas HS por RT-PCR.</b>	27
4.3.1 <i>Extração de RNAm</i>	27
4.3.2 <i>Transcrição Reversa – RT</i>	28
4.3.3 <i>Oligonucleotídeos iniciadores – Primers</i>	29
4.3.4 <i>Reação de Polimerase em cadeia – PCR</i>	30
<b>4.4 Dosagem hormonal</b>	30
<b>4.5 Imunohistoquímica para a proteína Cx43</b>	31
<b>4.6 Análise estatística</b>	32

<b>5. RESULTADOS</b>	33
<b>5.1 Determinação da concentração de E2 e P4 nos meios TCM e <math>\alpha</math>-MEM</b>	33
<b>5.2 Expressão do RNAm da proteína StAR, do rFSH, e das enzimas da Esteroidogênese.</b>	37
<b>5.3 Aspecto morfológico das células somáticas do folículo ovariano bovino após cultivo em meio TCM e <math>\alpha</math>-MEM.</b>	39
<b>5.4 Imunolocalização da proteína Cx43 nas hemisseção de folículo ovariano bovino após cultivo em meio TCM e <math>\alpha</math>-MEM.</b>	41
<b>6. DISCUSSÃO</b>	43
<b>7. CONCLUSÃO</b>	53
<b>8. REFERENCIAS</b>	54

## ESCLARECIMENTOS

O meio de cultura definido desenvolvido pelo nosso laboratório, sob orientação da Profa. Dra. Alzira Amélia Martins Rosa e Silva, aqui denominado como  $\alpha$ -MEM, está sob regime de patente, a qual foi depositada no INPI sob o Protocolo nº 012080000612. Portanto a sua composição não será apresentada neste trabalho, nem os dados obtidos divulgados publicamente durante período previsto de confidencialidade.

## Resumo

Os efeitos dos hormônios gonadotrópicos sobre o desenvolvimento folicular já são bem caracterizados, no entanto, interações entre gonadotrofinas, esteróides e fatores de crescimento sobre os mecanismos intraovarianos envolvidos na regulação da foliculogênese e esteroidogênese ainda são pouco compreendidos. Neste sentido, o presente trabalho padroniza sistemas de cultivo com as células somáticas da parede do folículo, representado pela hemissecção da parede folicular, utilizando dois meios distintos: Um meio definido, aqui denominado  $\alpha$ -MEM e um meio indefinido, aqui denominado TCM. Os sistemas de cultura foram avaliados com relação à manutenção da atividade esteroidogênica, por dosagem dos hormônios estradiol e progesterona, expressão do RNAm da proteína StAR, enzimas da esteroidogênese, e receptor de FSH, aspectos morfológicos e imunomarcção para Cx43 nas hemissecções antes e após cultivo por 24 e 48 horas. Foram utilizados ovários de vacas abatidas em frigoríficos e transportados até o laboratório em solução salina à 37 °C, dos quais foram dissecados folículos aparentemente saudáveis com 4 e 5 mm diâmetro. Os folículos foram seccionados ao meio para obter as hemissecções da parede do folículo, ou em três para obtenção das partes utilizadas na análise de RT-PCR. As secções do folículo foram cultivadas em meio 100ul do meio e incubadas em estufa a 37,5°C com 5% CO<sub>2</sub> e 95% umidade por 24 ou 48 horas. Os Resultados mostram que os meios possuem capacidades de regulação distintas sobre a esteroidogênese folicular, características morfológicas e imunomarcção para Cx43. Os Sistemas de cultura com meio TCM apresentaram elevada concentração de P4 com 24 horas, e aumento progressivo da secreção deste hormônio no cultivo com 48 horas, redução da luminosidade das bandas das enzimas da esteroidogênese (P450<sub>scc</sub>, arom, 17 $\beta$ HSD, 3 $\beta$ HSD) e do receptor do FSH após cultivo de 48 horas, além de alteração da morfologia celular a qual adquire forma semelhante a fibroblastos e perda da comunicação célula-célula evidenciada pela ausência da imunomarcção para Cx43 nas células foliculares; resultados que indicam luteinização celular, que podem ser decorrentes do uso do soro fetal bovino e elevadas concentração de FSH utilizado neste meio. Já os resultados obtidos para os sistemas de cultura que utilizaram o meio definido  $\alpha$ -MEM puro ou acrescido de FSH em concentração fisiológica, mostra habilidade deste meio em manter atividade esteroidogênica ao longo do tempo de cultura, com menor secreção de P4 do que a

obtida no meio indefinido, que não se altera ao longo da cultura, manutenção da expressão das enzimas da esteroidogênese após 48 horas de cultivo, além de conservar a característica morfológica das células semelhantes às obtidas *in vivo* e elevada expressão da proteína Cx43, resultados semelhantes àqueles obtidos com outros sistemas de cultivo livre de soro, e deixa evidente a capacidade do meio em manter as células foliculares *in vitro* com comportamento semelhante àquele de células de folículos saudáveis e em desenvolvimento. No meio a-MEM acrescido com FSH foi evidente o efeito estimulante sobre atividade esteroidogênica das células somáticas quando utilizado em dose fisiológica, por estimular a P450 aromatase e prevenir morte celular.

## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento folicular está bem caracterizado com relação às ações endócrinas das gonadotrofinas, entretanto, os mecanismos pelos quais fatores intra-ovarianos regulam o desenvolvimento folicular ainda não estão claros. Tendo em vista que os métodos para estudos *in vivo* destes mecanismos intrafoliculares envolvem altos gastos (ROBERTS & ECHATERNKAMP, 1994), e não fornecem o isolamento de eventos fisiológicos, faz-se importante a padronização de cultura de células foliculares que busque contornar tais dificuldades, utilizando métodos que permitam identificar o papel dos fatores locais (ROBERTS & ECHATERNKAMP, 1994; GUTIÉRREZ, *et al.*; 1997a).

Alguns autores vêm tentando estabelecer um sistema de cultura de células de granulosa (CG) capaz de manter *in vitro* as características funcionais e bioquímicas destas células em termos de produção de estradiol e expressão de RNAm da enzima esteroideogênica P450<sub>arom</sub>. Dorringt & Armstrong (1979) obtiveram resultados satisfatórios com o cultivo de CG de ratos, no entanto, estudos realizados com CG de bovinos não alcançaram os mesmos resultados, já que estas células luteinizavam espontaneamente, fato este comprovado pelo aumento da produção de progesterona (P4), concomitante à decrescente produção de estradiol (E2) (LUCK, 1985; SIRARD, 1990; CONG, 1994; ROWILLIER, 1996).

A suplementação do meio de cultivo com o soro fetal bovino (SFB) foi indicada como principal responsável pela luteinização das CG nestes sistemas de cultivo *in vitro*, além disso, este componente tem habilidade de carrear hormônios esteróides e outros fatores desconhecidos quanto a sua quantidade e origem (ROBERTS & ECHATERNKAMP, E GUTIÉRREZ *et al*, 1997), originando um meio com constituição indefinid.

Diante das limitações encontradas com o uso de SFB, tentou-se substituí-lo por substâncias que pudessem desempenhar funções semelhantes e que não carreassem fatores desconhecidos. Assim, alguns pesquisadores sugerem a adição de albumina sérica bovina (BSA) como fonte doadora de macromoléculas e aminoácidos em sistema de cultivo de CG livre de soro (GUTIÉRREZ *et al*, 1997a; SILVA & PRICE, 2002), com o qual obtiveram concentrações crescentes de estradiol em até 6 dias de cultura. No entanto, Mingotti (2000) detectou contaminação de esteróides, principalmente progesterona (P4) no BSA utilizado neste sistema de cultivo.

Na intenção de buscar um sistema de cultivo de células que fosse quimicamente definido, onde todos os componentes são conhecidos quanto a origem e quantidade, sem o risco de se utilizar componentes contaminados com substâncias desconhecidas indesejáveis, sugeriu-se o uso do álcool polivinílico (PVA) como doador de macromoléculas, por ser uma molécula inerte e sintética capaz de manter o ajuste de osmolaridade em sistemas *in vitro* (BIGGERS, 1997; THOMPSON, 1996), permitindo estudar eventos foliculares isolados.

Montezor (2002) padronizou um sistema de cultura de CG bovina sob condições definidas, utilizando o  $\alpha$ -MEM + PVA, onde foi observada elevada síntese de estradiol ao longo das 144 horas de cultura e manutenção das características morfológicas das CG semelhante àquela observada nas CG *in vivo*, estes resultados sugerem que este sistema de cultivo de CG é um modelo viável para estudos relacionados à fisiologia ovariana, já que o meio teve habilidade de manter a atividade esteroidogênica semelhante á observada em folículos em desenvolvimento.

A parede do folículo é constituída basicamente por CG, CT interna e CT externa; e tanto em bovinos como em outros mamíferos observa-se proeminente interação entres esses tipos celulares. Com o objetivo de estudar a interação entre as CG e CT foram desenvolvidos sistemas de co-cultivo dessas células onde foi possível observar que a comunicação CG-CT resulta em modulação recíproca na proliferação, na atividade esteroidogênica e nas características morfológicas destas células (KOTSUJI, 1990; BOSC, 1997).

Um exemplo de interação intercelular é a complexa cooperação entre CG-CT na síntese de esteróides, onde o andrógeno produzido pela CT serve como substrato para a síntese de estradiol pelas CG (FORTUNE, *et al.*,1994; ERICKSON,

*et al*,1985). Outra interação entre os dois tipos celulares também foi descrita, e consiste nos fatores que implicam na modulação do crescimento folicular, em especial, em uma fase tardia que precede a ovulação (MARIANA, *et al.* 1991; DUFFOUR, 1987). Todos esses fatores evidenciam a importância das interações CG-CT nos mecanismos de controle da função folicular ovariana.

No entanto, apesar dos sistemas de co-cultura já desenvolvidos disponibilizar um ambiente favorável ao estudo de alguns eventos reprodutivos (BOSC, 1997; KOTSUJI,1990), faz-se necessário o desenvolvimento de um sistema de cultura que seja constituído por todos os componentes da parede folicular ou células somáticas, devido a diferentes funções que as CT interna e externa exercem sobre as CG. De maior importância ainda é a busca de condições *in vitro* na qual estas células da parede folicular não se luteinizem e sim produzam  $17\beta$  estradiol e atue fisiologicamente como a parede de um folículo ovariano em crescimento. Uma alternativa que é utilizada, com o fim de suprir essa falha, consiste no cultivo da hemisseção da parede do folículo ovariano, utilizando o meio de cultura definido preparado por nosso grupo de pesquisa, buscando assim, simular um ambiente *in vivo*.

Sirard e colaboradores (1993, 1996) investigaram o efeito inibitório da hemisseção da parede do folículo sobre a retomada da meiose no oócito *in vitro* quando estão em co-cultura. Contudo, o meio de cultura utilizado por Sirard luteiniza as células da HS e, portanto representa um sistema de cultivo com células que se comportam semelhante àsquelas da fase lútea. Além destes trabalhos não há relatos quanto ao comportamento da HS em cultura com relação a síntese de esteróides, a atividade das enzimas da esteroidogênese e característica morfológica das células.

## 2. OBJETIVOS

Geral:

O objetivo do trabalho consiste na caracterização e padronização de dois sistemas de cultivo de células somáticas do folículo ovariano bovino (HS), um em meio quimicamente definido que utiliza o PVA no lugar do BSA, o outro em meio indefinido por ser acrescido de SFB.

Específico:

Avaliar o comportamento das HS da parede de folículos ovarianos saudáveis quando cultivados em meio de cultura definido ( $\alpha$ -MEM e  $\alpha$ -MEM+FSH) ou em meio indefinido (TCM). Estes dois sistemas de cultivo serão investigados com relação à secreção de esteróides, expressão de enzimas da esteroidogênese, características morfológicas das células e imunomarcação para a proteína Cx43.

### 3. REVISÃO

#### 3.1 Foliculogênese

O folículo ovariano de mamíferos é composto por três tipos celulares: o oócito (OO) - a célula germinativa - envolto pelas CG (CG) e as CT (CT), que constituem a porção somática capaz de sintetizar hormônios esteróides. Assim, o folículo desempenha atividade gametogênica e esteroidogênica (MCGEE *et al* , 2000).

O destino do folículo é determinado pela foliculogênese, a qual segue uma dinâmica onde há o recrutamento de um grupo de folículos primordiais para o crescimento, após estímulo gonadotrófico, seguido do desenvolvimento em folículo antral e seleção de um ou mais folículos para adquirir dominância e ovular, liberando o oócito maduro para ser fecundado (HSUEH, 2000). Os demais folículos são degenerados por atresia, destino fisiológico de aproximadamente 99% dos folículos ovarianos (VALDEZ *et al*, 2005).

A foliculogênese ovariana pode ser dividida em fase pré-antral ou independente de gonadotropinas, caracterizada pelo crescimento e diferenciação do oócito controlados por fatores de crescimento locais através de mecanismos autócrinos e/ou parácrinos; e fase antral ou gonadotropina-dependente, marcado pelo rápido crescimento do folículo e regulado pelos hormônios gonadotrópico FSH, LH e por fatores de crescimento.

### 3.1.1 Estágios do desenvolvimento folicular

A oogênese é iniciada anteriormente à foliculogênese. O processo de geração do oócito ocorre ainda na vida fetal a partir das células germinativas primordiais derivadas do endoderma do saco vitelínico do embrião, seguido da proliferação e migração por movimentos amebóides até a crista genital e colonização da gônada primitiva; em bovinos esse evento ocorre em torno do 35º dia de gestação (ADAMS *et al*, 2008). As células germinativas primordiais se diferenciam em oogônias, as quais sofrem uma série de divisões mitóticas antes de do início da sua primeira divisão meiótica e formação do oócito primário, o qual permanece na fase de prófase 1 até o indivíduo atingir a maturidade sexual (PICTON, 2001; VAN de HURK *et al*, 2004).

O início da meiose no oócito coincide com o início da formação dos folículos primordiais e, conseqüentemente, do processo de foliculogênese. O folículo primordial consiste em um oócito primário (~25µm diâmetro) circundado por uma camada única de células somáticas achatadas, conhecidas como células pré-granulosa, as quais são originadas de células do mesonefro que migraram até o ovário; envoltas por uma lâmina basal que separa a pré-granulosa das células do estroma ovariano (PICTON, 2001). Os oócitos remanescentes que não formaram folículos primordiais entram em processo de degeneração.

O número de folículos primordiais presentes no ovário bovino no momento do nascimento são aproximadamente 150.000 e constitui a reserva total de oócitos a serem recrutados, selecionados e ovulados ao longo da vida reprodutiva (WEBB *et al*, 1999).

Estes folículos primordiais permanecem quiescentes no ovário até entrarem em um evento conhecido como recrutamento inicial, um processo contínuo que inicia após a formação do folículo e continua até pouco antes do início da puberdade. Nesse evento, um grupo de folículos primordiais é estimulado a iniciar seu crescimento sob efeito de fatores locais (MCGEE *et al*, 2000); neste momento há a transição para folículos primários, onde a camada simples de células achatadas em torno do oócito se torna cuboidal e adquire atividade mitogênica, passando a serem chamadas CG (SALHA *et al*, 1998). A transição dos folículos primordiais a primários é considerada um evento independente da ação direta do FSH (MEDURI *et al*, 2002). O recrutamento inicial não deve ser confundido com o

recrutamento cíclico, que ocorre após a puberdade como resultado do aumento transitório do FSH circulante a cada ciclo reprodutivo que leva ao recrutamento de um grupo de folículos antrais iniciais.

Alguns dos fatores locais que influenciam positivamente a transição dos folículos primordiais a primários descritos para bovinos são o KL (kit ligante derivado das CG), o GDF-9 (fator de diferenciação do crescimento-9), a ativina e o BMP (Proteína morfogenética do osso). Enquanto o KL estimula o crescimento do oócito, o GDF-9 regula a proliferação e diferenciação das CG (PARROTT *et al*, 1999; VAN DE HURK *et al*, 2004).

Apesar de folículos antrais bovinos com diâmetro de até 4mm poderem crescer na ausência de FSH, uma alteração importante no folículo primário é a expressão do receptor de FSH nas CG, sugerindo o papel coadjuvante do FSH no controle do estágio pré-antral, podendo acelerar o seu desenvolvimento folicular (XU *et al*, 1995).

À medida que as CG dos folículos primários proliferam formando duas ou mais camadas, esses folículos passam a ser chamados folículos secundários ou pré-antrais. Neste estágio os oócitos aumentam de tamanho (~120µm) e secretam as glicoproteínas da zona pelúcida; as CG proliferam ativamente sob ação da GDF-9 e BMPs, há a formação de junções comunicantes (“gap junctions”) entre o oócito e CG e entre CG-CG, permitindo transporte bidirecional de moléculas reguladoras e nutrientes (EPPIG, 1994), e formação as CT, provenientes da diferenciação das células do estroma (VAN DE HURK *et al*, 2004), seguido de efeito angiogênico que gera vasos na camada da teca carreando tanto nutrientes quanto hormônios gonadotrópicos. Logo, o folículo secundário contém um oócito envolto por uma zona pelúcida e aproximadamente nove camadas de CG, lâmina basal, CT interna, CT externa e uma rede de capilares.

Apesar de pouco vascularizados, os folículos secundários podem responder aos hormônios gonadotrópicos e desenvolverem-se até folículo antral, mesmo com pequenas quantidades de FSH circulante. No entanto, o LH parece ser mais importante neste estágio do que o FSH, já que as CT expressam receptor para LH, o qual controla a biossíntese de andrógenos por essas células e são capazes de estimular a formação de receptores de FSH nas CG e amplificar o efeito do FSH no folículo secundário (VAN de HURK *et al*, 2004).

A formação do folículo antral é caracterizada por uma multicamada de CG e pela presença de uma cavidade preenchida por fluido chamado fluido folicular, o antro. O fluido folicular é produto do transudato plasmático dos vasos da camada da teca e de secreções do oócito e das CG. Sua produção é intensificada pelo incremento na vascularização folicular e permeabilidade dos vasos sanguíneos. O tamanho do folículo antral ou folículo de Graaf é determinado pelo acúmulo do fluido folicular e pela proliferação das CG e da teca.

A formação dos folículos antrais iniciais é relativamente independente de gonadotrofinas. As CT sintetizam progestágenos e andrógenos enquanto que as CG permanecem deficientes da enzima aromatase, apesar de expressarem RNAm para o receptor de FSH. A partir deste ponto a continuidade do crescimento dos folículos antrais se torna dependente dos hormônios gonadotrópicos e seguem então a dinâmica folicular, a qual compreende três eventos distintos: o recrutamento, a seleção e a dominância folicular.

### *3.1.2 Dinâmica folicular durante o ciclo estral bovino*

A dinâmica folicular em bovinos tem sido amplamente estudada, principalmente com o desenvolvimento da técnica de ultra-sonografia associada a dosagens hormonais, de modo a ter sido bem caracterizado o padrão de crescimento folicular, o qual segue um modelo de ondas de crescimento que ocorrem ao longo do ciclo estral. Em bovinos podem ocorrer duas ou três ondas foliculares por ciclo, e cada onda é caracterizada pelo recrutamento de um grupo de 8 a 41 folículos antrais pequenos (3 mm) para continuarem a crescer (ADAMS *et al*, 2008), após aumento transitório da concentração plasmática de FSH. A taxa de crescimento permanece similar entre os folículos da onda por dois dias, quando um folículo é selecionado para continuar o crescimento e tornar-se o folículo dominante, enquanto que os folículos subordinados entram em atresia e regredem (CROWE, 1999; WEBB *et al*, 1999). O folículo selecionado para dominância que se desenvolve durante a fase folicular irá se diferenciar até folículo pré ovulatório e ovular, enquanto o folículo dominante que se desenvolve durante a fase lútea do ciclo estral irá entrar em atresia devido à ausência do pico de LH (BAO *et al*, 1997a).

O recrutamento cíclico ocorre após início da puberdade e é resultado do aumento transitório de FSH plasmático (MCGEE *et al*, 2000). O recrutamento e seleção de folículos antrais ocorrem em ondas foliculares e o número varia entre as espécies. Os folículos recrutados expressam RNAm das enzimas P450scc, P450c17, 3 $\beta$ HSD, Star e receptor de LH nas CT e P450 aromatase nas CG, o que permite produzir estradiol a partir dos andrógenos sintetizados na teca. Este aumento da expressão de RNAm para P450scc e P450arom pode estar associado com a preparação do folículo para continuar a crescer (XU *et al*, 1995; BAO *et al*, 1997a).

O evento conhecido como seleção compreende a aquisição, por um folículo, da capacidade de continuar a crescer, diferenciar e ovular, dentre os vários folículos recrutados e que se encontram com tamanhos e em estágios de desenvolvimento semelhantes ao folículo selecionado.

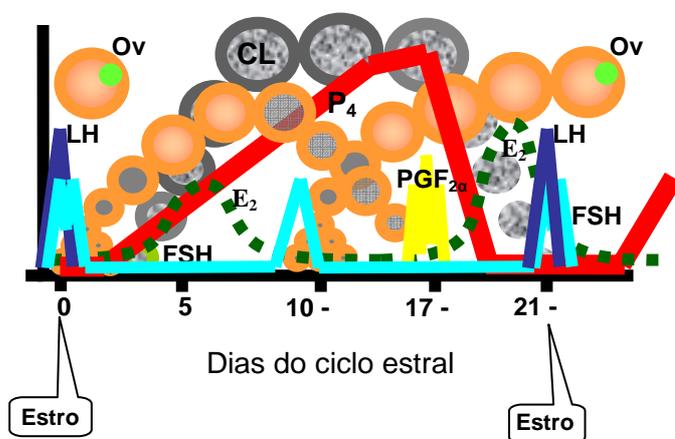
A seleção do folículo dominante parece ocorrer entre 36 e 48 horas após o início da primeira onda folicular (WEBB *et al*, 1999), quando os níveis séricos de FSH caem significativamente, devido ao feedback negativo promovido pelo aumento da produção de estradiol e inibina pelos folículos (MARTIN *et al*., 1991); levando conseqüentemente à diminuição da freqüência de pulsos do LH. O folículo selecionado para continuar a crescer é aquele funcionalmente mais desenvolvido e melhor adaptado para responder aos hormônios gonadotróficos, mesmo quando estes estiverem em baixas concentrações (GINTHER *et al*, 1996; BAO *et al*, 1997a), isto é, aquele cujo microambiente intrafolicular dispõe de mecanismos ou fatores estimulatórios que amplificam os efeitos do FSH, permitindo que responda de maneira mais robusta do que o folículo subordinado às baixas concentrações plasmáticas do FSH (GINTHER *et al*, 2000).

Logo, a seleção folicular para a dominância parece estar associada com a expressão do RNAm do receptor de LH, receptor FSH, P450arom e 3 $\beta$ HSD nas CG e aumento da expressão do rLH nas CT interna (XU *et al*, 1995; BAO *et al*, 1997a, b), o que proveria este folículo de maior capacidade esteroidogênica notada no folículo dominante.

A expressão do RNAm para receptores de LH nas CG é aumentada ao longo do tempo e crescimento do folículo e parece estar limitada a folículos com alta expressão de RNAm para P450scc e P450arom nas CG (BAO *et al*, 1997a).

No entanto, estudos publicados posteriormente mostram que a expressão de receptores de LH nas CG não é o ponto crítico para que o folículo selecionado se torne dominante, mas sim alterações no sistema IGF. O IGF-1 desempenha papel importante no crescimento folicular por estimular a proliferação das CG e aumentar a sua atividade esteroidogênica, além de agir sinergicamente com os hormônios gonadotrópicos para promover a diferenciação das células foliculares (FORTUNE *et al*, 2001; FORTUNE *et al*, 2004; GINTHER *et al*, 2004).

Alguns dos fatores intrafoliculares indicados como responsáveis pela ativação do processo de seleção folicular são o sistema IGF, esteróides, peptídeos inibina A/ activina A, receptores de gonadotropinas e fatores angiogênicos (ARMSTRONG & WEBB, 1997). Entretanto, os únicos fatores envolvidos funcionalmente na seleção folicular são os hormônios IGF-1 associado ao sistema IGF, estradiol e aos receptores de LH (GINTHER *et al*, 2004).



**Esquema 1** - Ciclo estral completo em uma vaca com duas ondas foliculares. (adaptado Roberto Sartori.)

### 3.1.3 Folículo Dominante versus Folículo subordinado

Uma maneira de compreender os mecanismos importantes envolvidos na seleção do folículo dominante é via determinação das diferentes características entre folículos subordinados e dominantes após a seleção. Embora ocorra a emergência de um folículo significativamente maior (dominância morfológica) que

os demais recrutados, sabe-se que este evento é precedido por alterações no ambiente intrafolicular (dominância bioquímica) mesmo enquanto todos os folículos possuem o mesmo tamanho. Dentre as modificações intrafoliculares que ocorrem no folículo selecionado para a dominância antes mesmo da alteração morfológica está a produção de estradiol, expressão de RNAm para receptores de gonadotropinas e enzimas da esteroidogênese e o sistema IGF.

Uma das características mais marcantes do folículo dominante é a alta capacidade de síntese de estradiol, e conseqüente alta concentração desse hormônio no fluído folicular, quando comparado ao folículo subordinado de uma mesma onda folicular (FORTUNE *et al*, 2001). Em ondas não ovulatórias, quando o folículo dominante desenvolve durante a fase lútea, o alto nível de produção de estradiol não é mantido, e outro aumento transitório do FSH ocorre (GINTHER *et al*, 2000) e recruta uma nova onda folicular. Entretanto, se há a luteólise durante a seleção do folículo dominante, a produção de estradiol aumenta rapidamente e progressivamente no folículo preovulatório (FORTUNE *et al*, 2004).

O aumento da secreção de estradiol é a chave para o sucesso do desenvolvimento folicular e ovulação, no entanto, uma questão crítica é como um folículo dentre outros semelhantes é capaz de aumentar a síntese de estradiol tão rapidamente. Em busca de melhor compreensão deste evento e tendo em vista que a síntese de estradiol ocorre sob estimulação de gonadotropinas e depende tanto da síntese de andrógenos quanto da aromatização do estradiol, Bao e Garverick (1998) compararam os níveis de RNAm para receptores de LH e FSH, e de enzimas da esteroidogênese de folículos recrutados e selecionados. Eles encontraram que o folículo dominante possui altos níveis de RNAm para receptores de LH nas CT e da granulosa do que os folículos recrutados, mas os níveis de receptores de FSH nas CG não diferiram. Além disso, os níveis de RNAm da 17 $\alpha$  hidroxilase e aromatase é maior nas CG de folículos dominantes do que de folículos recrutados, enquanto que a P450<sub>scc</sub> está aumentada somente nas CG.

No entanto, o grupo de pesquisa de Fortune (2004), encontrou resultados diferentes comparando o folículo dominante com o maior folículo subordinado. E encontraram elevados níveis de RNAm para receptores de LH e 17 $\alpha$ hidroxilase nas CT e RNAm de receptores de FSH e aromatase nas CG de folículos dominantes do que em folículos subordinados. Não sendo detectada alteração na expressão do RNAm para receptores de LH (rLH) nas CG dos folículos

dominantes, sugerindo que a aquisição do rLH ocorre num estágio tardio da diferenciação do folículo dominante.

A expressão do RNAm para receptores de gonadotropinas e enzimas da esteroidogênese são importantes para a alta produção de esteróides pelo folículo dominante. No entanto, observou-se que estes dois eventos ocorrem concomitantes com a dominância morfológica, isto é, aumento do tamanho do folículo. Estudos demonstram que a dominância bioquímica, alterações no ambiente intrafolicular, ocorre antecedendo à dominância morfológica, e é caracterizada principalmente por mudanças no sistema IGF (FORTUNE *et al*, 2001; FORTUNE *et al*, 2004), o qual desempenha papel importante na seleção do folículo dominante.

O sistema IGF ovariano é constituído por dois ligantes, IGF-I e IGF-II, dois receptores, tipo 1 e tipo 2, seis proteínas ligadoras de IGF, IGFBP-1, 2, 3, 4, 5 e 6, e a protease de proteína ligadora de IGF, IGFBP protease, (SPICER *et al*, 2001).

O IGF-I *in vitro* estimula a proliferação das CG, aumenta a síntese de estradiol e aumenta a resposta das CG ao FSH (SPICER *et al*, 2001; MONGET *et al*, 2002; GINTHER, 2006). Em contraste, as proteínas ligadoras de IGF, principalmente as IGFBP-2, 4, e 5, exercem efeito negativo sobre as ações do IGF por ligar-se a ele e impedir sua ligação com seu receptor. No entanto, as proteases de IGFBP clivam as IGFBPs, permitindo que o IGF permaneça livre e se ligue ao seu receptor, isto é, ele aumenta a biodisponibilidade do IGF. Então, uma alteração neste sistema complexo pode afetar potencialmente o desenvolvimento folicular (FORTUNE *et al*, 2004).

Em bovinos, o crescimento folicular e regressão estão mais associados a alterações nas concentrações de IGFBPs do que a mudanças nas concentrações de IGF-I, até mesmo porque não foram detectadas diferenças de IGF total no fluido folicular de folículos subordinados e folículo dominante (SPICER *et al*, 2001; FORTUNE *et al*, 2004). Em contraste, os níveis de IGFBP-2, 4 e 5 diminuem drasticamente no folículo selecionado para a dominância, o que leva a um aumento da biodisponibilidade do IGF-I nos folículos em crescimento, e tem sua expressão aumentada nos folículos subordinados (SPICER, 1995). *In vitro*, ARMSTRONG *et al*. (1998) demonstrou que o FSH é um forte inibidor da expressão de RNAm da IGFBP-2 nas CG de bovinos, sugerindo que a diminuição dos níveis desta IGFBP nos folículos preovulatórios é dependente do FSH.

Um outro fator que leva ao aumento da biodisponibilidade do IGF-I no fluído folicular é a expressão aumentada da proteína plasmática A associada à gravidez (PAPP-A), responsável pela degradação da IGFBP-4 nos folículos preovulatórios. A expressão de RNAm da PAPP-A está restrita às CG e está positivamente relacionada à expressão da aromatase e de receptores de LH (MAZERBOURG *et al*, 2001).

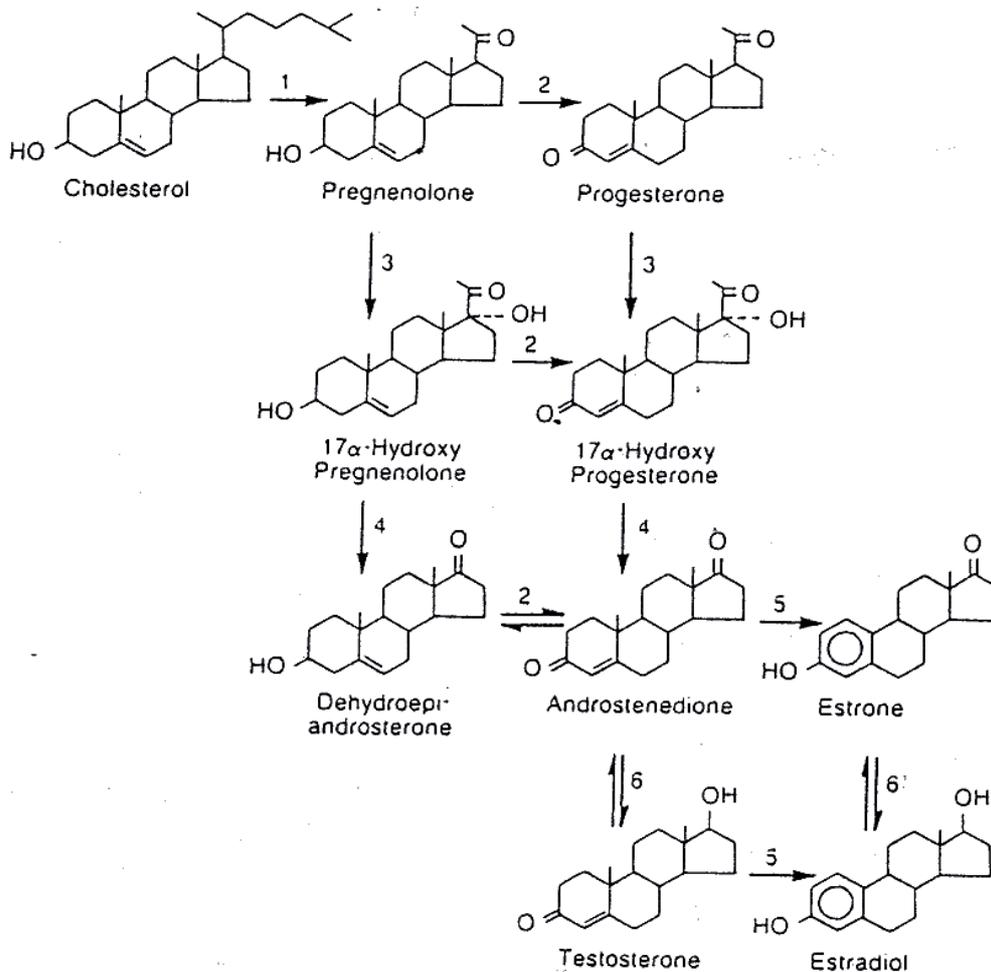
### 3.2 Esteroidogênese no Folículo Ovariano

Esteroidogênese é o nome dado à via biossintética na qual células especializadas sintetizam hormônios da classe dos terpenos conhecidos como esteróides (STOCCO, 2001) a partir de um precursor comum, a molécula de colesterol. Nos ovários essa via é constituída por dois grupos enzimáticos: Citocromos P450, representados pelo P450 side chain cleavage (P450scc), 17 $\alpha$  hidroxilase (P450c17) e P450 aromatase (P450arom); e os esteróides oxidorreduções, representados pela 3 $\beta$ -hidroxi-esteróide desidrogenase (3 $\beta$ -HSD) e 17 $\beta$ -hidroxi-esteróide desidrogenase (17 $\beta$ HSD).

O repertório de enzimas expressas nas células esteroidogênicas é compatível com a capacidade de síntese de um esteróide específico. Logo, a capacidade esteroidogênica é regulada principalmente pela quantidade e pelo nível de expressão gênica de enzimas específicas de um determinado tipo celular, e não pela ativação ou inativação seletiva das mesmas (HANUKOGLU, 1992).

A taxa de produção dos esteróides hormonais é determinada pela disponibilidade de colesterol, precursor de todos os hormônios esteróides, para as células, assim como do nível e da atividade de enzimas envolvidas na via biossintética da esteroidogênese.

Resumidamente, a esteroidogênese folicular é iniciada com o transporte do colesterol para o interior da membrana interna da mitocôndria pela Star, seguida da sua conversão em pregnenolona pela enzima citocromo P450 colesterol side-chain cleavage (P450scc), a qual é expressa nas CT e da granulosa. Como a esteroidogênese segue principalmente a via  $\Delta$ 5 em ruminantes, a pregnenolona é metabolizada até dehidroepiandrosterona pela enzima P450 17 $\alpha$ hidroxilase (P450c17) nas CT, e então em androstenediona pela 3 $\beta$ hidroxiesteróide desidrogenase (3 $\beta$ HSD). A androstenediona migra para as CG, onde é convertida em estrona pela enzima P450 aromatase (P450arom) e em seguida convertida em estradiol pela 17 $\beta$ hidroxiesteróide desidrogenase (17 $\beta$ HSD). As CG não expressam a P450c17 e por isso não podem converter progesterona em andrógenos (SAHMI, *et al*, 2004).



1. P450scc; 2. 3 $\beta$ -HSD; 3. 17 $\alpha$ -hidroxilase; 4. 17,20-liase; 5. P450arom; 6. 17 $\beta$ -HSD.

**Esquema 2** - Biossíntese de esteróides no folículo ovariano. (Textbook of Endocrine Physiology, 1996).

A esteroidogênese folicular envolve os dois tipos de células somáticas da parede do folículo, as CG e as CT, as quais apresentam funções e capacidades esteroidogênicas distintas resultantes da expressão diferenciada de receptores hormonais nas suas membranas celulares e das enzimas da esteroidogênese.

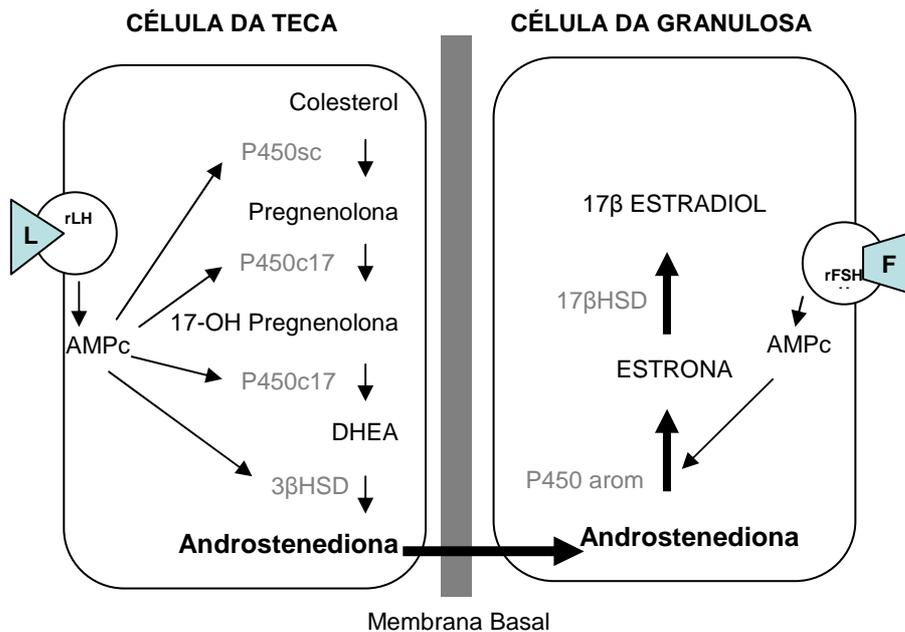
A atividade esteroidogênica das CG e das CT responde principalmente aos hormônios gonadotróficos, hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH), respectivamente. Esses hormônios exercem seus efeitos nas células-alvo através da ativação da adenilato ciclase, levando ao aumento intracelular do AMPc, o qual muitas vezes age como segundo mensageiro intracelular, induzindo a expressão das enzimas da esteroidogênese nestas células (STRAUSS & HSUEH, 2001).

As ações do FSH estão restritas às CG, as quais expressão o receptor de FSH em qualquer estágio do desenvolvimento folicular; enquanto o LH exerce efeito tanto sobre as CT quanto sobre as CG. No entanto, as CT adquirem o receptor de LH logo no início do desenvolvimento folicular, enquanto as CG só começam a expressar o receptor de LH após a seleção do folículo para a dominância e sob influência do FSH e do estradiol.

O FSH age nas CG induzindo a proliferação celular e a expressão das enzimas da esteroidogênese P450 aromatase, aumentando conseqüentemente a síntese de estradiol, além de aumentar a habilidade das CG em sintetizar progestágenos por estimular a expressão das enzimas P450scc e 3 $\beta$ -HSD sem induzir a luteinização (OJEDA, 1996).

O LH aumenta a secreção de andrógenos pelas CT por estimular a expressão das enzimas P450scc e 17 $\alpha$  hidroxila. As CT desempenham papel importante na síntese dos estrógenos por ser responsável pela síntese dos andrógenos, que são utilizados como substrato da P450aromatase na biossíntese de estradiol pelas CG.

Isso porque as CG não possuem a enzima 17 $\alpha$ hidroxilase, não sendo capazes de sintetizar os andrógenos, precursores dos estrógenos. A produção de 17 $\beta$ estradiol pelas células foliculares ocorre graças a um mecanismo de cooperação endócrina entre as CG e as CT conhecido como "modelo Duas células- Duas gonadotrofinas". Nesse modelo, a célula da teca, sob influência do LH, produz andrógenos que após a difusão para o outro compartimento folicular, as CG, são convertidos em estrógenos via reação de aromatização induzida e suportada pelo FSH (WILLIAMS & LARSEN, 2003).



**Esquema 3** - Modelo Duas células- Duas gonadotrofinas. (Adaptado do Textbook of Endocrine Physiology, 1996).

### 3.2.1 Aquisição do colesterol

A síntese dos hormônios esteróides no ovário é dependente da disponibilidade de colesterol livre no interior das células esteroidogênicas. Estas células podem utilizar colesterol obtido a partir da síntese de colesterol “de novo” via a enzima 3-hidroxi 3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA), do colesterol pré formado estocado no interior das células ou do colesterol livre constituinte das membranas plasmáticas. No entanto, muitos estudos indicam que maior parte do colesterol utilizado é adquirido a partir das lipoproteínas plasmáticas de alta densidade (HDL) e baixa densidade (LDL) (GARMEY *et al*, 2000). Logo, a quantidade de colesterol circulante é importante para a atividade esteroidogênica e desordens que levam à diminuição de LDL ou do HDL plasmático estão associadas à redução na produção de progesterona.

A captura das LDLs pelas células esteroidogênicas ocorre por ligação da apoproteína da lipoproteína a um receptor específico na superfície de membrana, seguido da internalização do complexo, formando uma estrutura denominada endossomo, localizada no citoplasma celular. À medida que o endossomo se funde com o lisossoma, há a degradação das lipoproteínas por esterases lisossomais e disponibilização de colesterol livre, o qual pode ser então utilizado pelas enzimas da esteroidogênese (ARMSTRONG *et al*, 1994; BERTAN *et al*, 2006). Já as moléculas

de HDL se ligam a um receptor específico e de alta afinidade “scavenger”, classe B e do tipo I conhecido como SR-BI (LANDSCHLZ *et al*, 1996) que reconhece tanto a apolipoproteína HDL quanto lipídios.

O equilíbrio entre os ésteres de colesterol provenientes das lipoproteínas, aqueles armazenados na forma de gotículas no citoplasma e o colesterol livre é mantido pelo balanço de duas enzimas: a acilcoenzima A colesterol aciltransferase (ACAT), também conhecida como colesterol éster sintetase e a esterol éster hidrolase (esterase). Enquanto uma promove o armazenamento na sua forma esterificada, a outra catalisa o éster de colesterol, gerando colesterol livre (ARMSTRONG *et al*, 1994).

Um dos mecanismos pelos quais hormônios gonadotróficos estimulam a esteroidogênese é aumentando a expressão de receptores de LDL (low density lipoprotein) na membrana dessas células, otimizando a endocitose e a conseqüente degradação das apolipoproteínas e hidrólise dos ésteres de colesterol pela lipase ácida.

### 3.2.2 *StAR e Enzimas da Esteroidogênese folicular*

#### 3.2.2.1 *Proteína de Regulação aguda da Esteroidogênese – StAR*

Assim como muitas vias biossintéticas, a esteroidogênese também possui um fator limitante, o qual por muito tempo se acreditou que fosse a ativação da enzima P450<sub>scc</sub>, responsável pela conversão do colesterol em pregnenolona (BAO *et al*, 1998). No entanto, estudos recentes demonstram que o ponto crítico na via é o transporte do substrato colesterol da membrana mitocondrial externa para a membrana mitocondrial interna, onde a enzima P450<sub>scc</sub> está localizada. Este ponto se torna limitante devido às propriedades hidrofóbicas que impossibilitam a passagem do colesterol por difusão simples através do espaço intramembranoso das mitocôndrias, que é aquoso, para ter acesso à P450<sub>scc</sub> (STOCCO, 2001).

A proteína de regulação aguda da esteroidogênese (StAR) é sintetizada no citoplasma como uma pré-proteína contendo uma seqüência N-terminal que direciona a proteína até a mitocôndria; onde esta seqüência finalizadora é clivada dando origem a sua forma madura com 30kDa. A StAR não tem papel significativo no transporte do colesterol através do citoplasma da célula até a membrana externa da mitocôndria, o grupo de proteínas descritas como de maior importância nesse

transporte intracelular são membros da família das StarD4, que são estruturalmente semelhantes à StAR (SOCCIO *et al*, 2003). A principal função da StAR é o transporte do colesterol livre da membrana externa para a membrana interna da mitocôndria. (STOCCO, 2001; MILLER, 2007). O mecanismo de ação da StAR proposto recentemente se refere a uma alteração da sua estrutura conformacional decorrente da sua interação com um fosfolípido protonado da membrana externa da mitocôndria, que resulta na abertura de um canal que permite a passagem do colesterol até a membrana interna da mitocôndria. Há evidências indicando que para exercer sua ação a StAR requer outras proteínas, uma delas é a PBR, receptor benzodiazepínico periférico, que tem papel chave na aquisição de colesterol pela mitocôndria de células esteroideogênicas (MILLER, 2007).

O RNAm da StAR é expresso preferencialmente, mas não exclusivamente, nas CT de folículos preovulatórios de suínos e bovinos (BAO *et al*, 1998, GARMEY *et al*, 2000). No entanto, há resultados divergentes quanto à expressão da StAR nas CG, que podem ser decorrentes dos diferentes graus de diferenciação das células utilizadas e/ou da sensibilidade do ensaio utilizado na detecção da proteína (GARMEY *et al*, 2000).

### 3.2.2.2 Reação “side chain cleavage”

Em todos os tecidos com atividade esteroideogênica, o primeiro passo na via biosintética é a conversão do colesterol no primeiro hormônio esteróide, pregnenolona (STOCCO, 2001). Esta conversão ocorre com quebra da molécula de colesterol (C27) entre os carbonos C22 e C20 pela ação catalítica da enzima citocromo P450 side-chain cleavage (P450<sub>sc</sub>), que tem como doador de elétrons o NADPH e como sistema transportador uma flavoproteína - adrenodoxina redutase (HANUKOGLU *et al*, 1993) e está localizada na membrana interna da mitocôndria.

### 3.2.2.3 3 $\beta$ -Hidroxiesteróide desidrogenase $\Delta$ 5- $\Delta$ 4 isomerase

O complexo enzimático 3 $\beta$ -HSD é uma proteína microsomal que utiliza a forma oxidada do dinucleotídeo adenina nicotinamida (NADPH) como cofator (GORE-LANGTON & ARMSTRONG, 1993) e catalisa a conversão de esteróides 5-ene-3 $\beta$ -hidroxiesteróides, conhecidos como pregnenolona, 17-OH pregnenolona, dehidroepiandrosterona (DHEA) em seus correspondentes compostos 4-ene-

3cetoesteroides, progesterona, 17-OH progesterona, androstenediona, respectivamente (SIMARD *et al*, 1995).

A pregnenolona é um intermediário comum de todas as classes de hormônios esteróides produzidos pelo folículo, ela é sintetizada na mitocôndria sob ação da enzima P450<sub>scc</sub> sobre o colesterol, e em seguida migra para o retículo endoplasmático onde pode seguir duas vias,  $\Delta 4$  ou  $\Delta 5$ . Na via  $\Delta 4$  a pregnenolona é convertida em progesterona pela 3 $\beta$ HSD nas CT ou granulosa, enquanto que na via  $\Delta 5$  ela é convertida em dehidroepiandrosterona (DHEA) pela P450 17 $\alpha$ hidroxilase, só então o DHEA é convertido em androstenediona pela 3 $\beta$ HSD nas CT. Esta é a via preferencial dos folículos bovinos (BAO *et al*, 1997b).

A 3 $\beta$ HSD é encontrada não apenas em tecidos conhecidamente envolvidos com a esteroidogênese como o córtex da adrenal, ovários e testículos, mas também em tecidos periféricos como pele, tecido adiposo, fígado, rim, cérebro. Esta ampla distribuição da expressão da enzima indica seu importante papel na formação de esteróides sexuais em tecidos alvo (SIMARD *et al*, 1995).

Estudos *in vitro* realizados em bovinos indicam que somente CG provenientes de folículos selecionados para a dominância expressam 3 $\beta$ HSD, podendo ser mais importante na regulação da secreção de progesterona do que a P450<sub>scc</sub> neste estágio de desenvolvimento (BAO *et al*, 1997b; SAHMI *et al*, 2004); enquanto que a sua expressão é amplamente encontrada em CT de folículos em qualquer fase do desenvolvimento (BAO *et al*, 1997a, b).

#### 3.2.2.4 17 $\alpha$ Hidroxilase/ 17,20 desmolase / P450<sub>c17</sub>

A 17 $\alpha$ hidroxilase/17,20desmolase é um complexo enzimático ancorado na membrana do retículo endoplasmático (microsomas) cuja atividade é limitante na biossíntese dos andrógenos (C19) no folículo ovariano. Este sistema enzimático é um citocromo P450 que desempenha mista função oxidase, requerendo como cofator oxigênio molecular e NADPH, para catalisar duas reações: A hidroxilação da pregnenolona e da progesterona no carbono 17 e a clivagem na ligação C17,20. Sendo que o intermediário 17 $\alpha$ hidroxil permanece ligado ao complexo enzimático, não aparecendo na forma livre (GORE-LANGTON & ARMSTRONG, 1993).

A expressão do RNAm para a 17 $\alpha$ hidroxilase foi encontrada exclusivamente nas CT. A capacidade de iniciar expressão desta enzima surge

primeiramente em células próximas à membrana basal e pertencentes a folículos no estágio pré-antral e esta capacidade aumenta com o crescimento progressivo do folículo e diferenciação das CT. Tanto a expressão da enzima quanto a sua atividade são reguladas pelo hormônio luteinizante (LH) (BRAW-TAL *et al*, 2005).

#### 3.2.2.5 P450 aromatase

A P450 aromatase é um complexo enzimático localizado na membrana do retículo endoplasmático, principalmente das CG, que utiliza andrógenos provenientes das CT como substrato para a síntese de estrógenos. Para que esta reação ocorra, a aromatase catalisa três hidroxilações sucessivas no andrógeno (hormônio esteróide com 19 moléculas de carbono), usando 3 mol de NADPH e 3 mol de oxigênio molecular para produzir o estrógeno, caracterizado por ser um hormônio esteróide com 18 moléculas de carbono e um anel aromático-A. Esta reação é acompanhada pela eliminação de um grupo metil na forma de ácido fórmico (GORE-LANGTON & ARMSTRONG, 1993).

Em bovinos, a expressão do RNAm da P450 aromatase foi amplamente detectada especificamente em CG de folículos saudáveis com diâmetro de 4 a 6mm. Essa expressão aumenta ao longo do desenvolvimento folicular e diminui drasticamente em folículos atrésicos (BAO *et al*, 1997a). Estudos *in vitro* com CG de bovinos cultivadas em meio livre de soro demonstram a capacidade do FSH em aumentar tanto a produção de estradiol quanto a expressão do RNAm da P450 aromatase (SILVA e PRICE *et al*, 2000), e esse efeito é amplificado na presença concomitante do IGF-I e da insulina (GUTIÉRREZ *et al*, 1997a; SILVA e PRICE *et al*, 2002;).

Agindo de maneira contrária ao FSH, o pico do LH diminui rapidamente a expressão do RNAm da P450 aromatase em CG de folículos preovulatórios, por aumentar a degradação e inibir a transcrição da aromatase e, conseqüentemente, direcionando a expressão gênica da célula para produtos relacionados com a ovulação e luteinização (FITZPATRICK *et al*, 1997).

#### 3.2.2.6 P450 17 $\beta$ Hidroxiesteroide desidrogenase (17 $\beta$ HSD)

A enzima 17 $\beta$ HSD catalisa o último passo do processo de síntese dos esteróides sexuais e o primeiro passo na sua degradação. Sua atividade principal é como 17 $\beta$ hidroxiesteroide desidrogenase (17 $\beta$ HSD) e consiste na interconversão de

17 $\beta$ cetoesteróides como a dehidroepiandrosterona, androstenediona e estrona, nos seus correspondentes 17 $\beta$ hidroxiesteróides, androstenediol, testosterona e 17 $\beta$ estradiol. Mas também pode ter atividade cetoesteróide redutase (KSR) e inativar esteróides sexuais potentes, convertendo-os em sua forma de pouco ou nenhuma atividade biológica (LIN *et al*, 2006).

Esse papel importante da 17 $\beta$ HSD na síntese e degradação dos esteróides se deve ao fato de poder ser expressa na forma de cinco isoenzimas que apresentam uma localização celular, substratos, mecanismos de regulação e atividade catalítica oxidase ou redutase diferentes. A isoenzima tipo 1 foi a primeira a ser determinada e catalisa a formação de 17 $\beta$ estradiol a partir da estrona. A isoenzima tipo 2 degrada 17 $\beta$ estradiol em estrona e testosterona em androstenediona, enquanto que a isoenzima tipo 4 degrada 17 $\beta$ estradiol em estrona e androstenediol em dehidroepiandrosterona. As enzimas 17 $\beta$ HSD tipo 3 e 5 catalisam a formação da testosterona a partir da androstenediona nos testículos e tecidos periféricos, respectivamente (LABRIE *et al*, 1997).

Apesar da sua importância na síntese de 17 $\beta$ estradiol, pouco é conhecido sobre a expressão da enzima 17 $\beta$ HSD no ovário de ruminantes. No entanto, estudos recentes mostraram que a isoenzima tipo 1 é a isoforma predominante nos ovários de ruminantes (LUU-THE *et al*, 2001), e a expressão do RNAm em CG cultivadas em meio definido aumenta ao longo do desenvolvimento do folículo, sendo amplamente expresso em células provenientes de folículos com alta atividade estrogênica (>8mm), o que sugere que a expressão da 17 $\beta$ HSD aumente drasticamente com o início da dominância folicular. Assim como a expressão da P450 aromatase, a expressão do RNAm da 17 $\beta$ HSD tipo 1 é regulada pelo FSH de maneira dose-dependente (SAHMI, *et al*, 2004).

### 3.3 Expressão da Conexina 43 em células foliculares

As junções comunicantes, também conhecidas como junções gap, são descritas como agregados de canais intercelulares, compostos pela proteína conexina localizada entre células adjacentes. As proteínas conexas se oligomerizam formando conexons que se inserem na membrana plasmática de cada célula originando um “hemicanal”. Após a formação dos conexons das células adjacentes, estes têm de se reconhecer e se alinhar corretamente para a formação de um canal intercelular completo e funcional (Paul, 1995).

O canal formado permite comunicação e sinalização intercelular rápida, com movimentos de íons, metabólitos e moléculas de baixo peso molecular (SIMON *et al.*, 1997).

O ovário bovino expressa as conexas Cx26, Cx32, Cx37 e Cx43. As CG de folículos atrésicos expressão a Cx32. A Cx26 foi detectada em oócitos de folículos em estágio inicial do desenvolvimento e em CG e teca de folículo antral. A expressão da Cx37 ocorre no oócito e CG de folículo pré-antral, e sua expressão diminui com a formação do antro (JOHNSON *et al.*, 2002, 1999). A Cx43 está localizada nas CG de folículos primários e sua expressão aumenta com o desenvolvimento folicular e formação do antro em folículos saudáveis (GERSHON *et al.*, 2008). Enquanto que a expressão do RNAm da proteína é dramaticamente reduzida em folículos atrésicos (MELTON *et al.*, 2001).

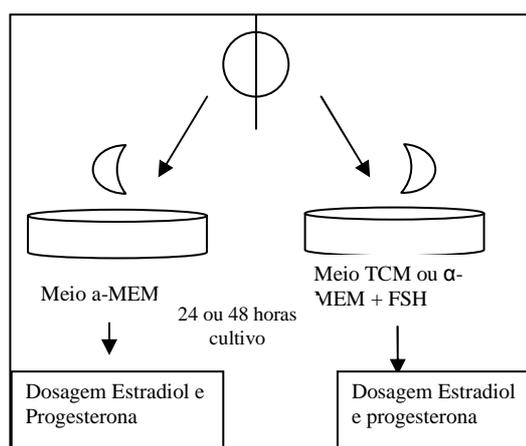
JUNEJA *et al.*, (1999) sugerem que a Cx43 exerce papel crítico na ativação da foliculogênese, uma vez que camundongos deficientes em Cx43 tiveram o início do desenvolvimento folicular interrompido. Em folículos antrais a expressão da Cx43 é regulada principalmente pelos hormônios gonadotróficos. O FSH estimula a expressão da Cx43 no ovário, enquanto o LH reduz (YOGO *et al.*, 2002).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento Experimental

#### 4.1.1 EXPERIMENTO 1 – Determinação da concentração dos hormônios estradiol (E<sub>2</sub>) e progesterona (P<sub>4</sub>) nos meios de cultura.

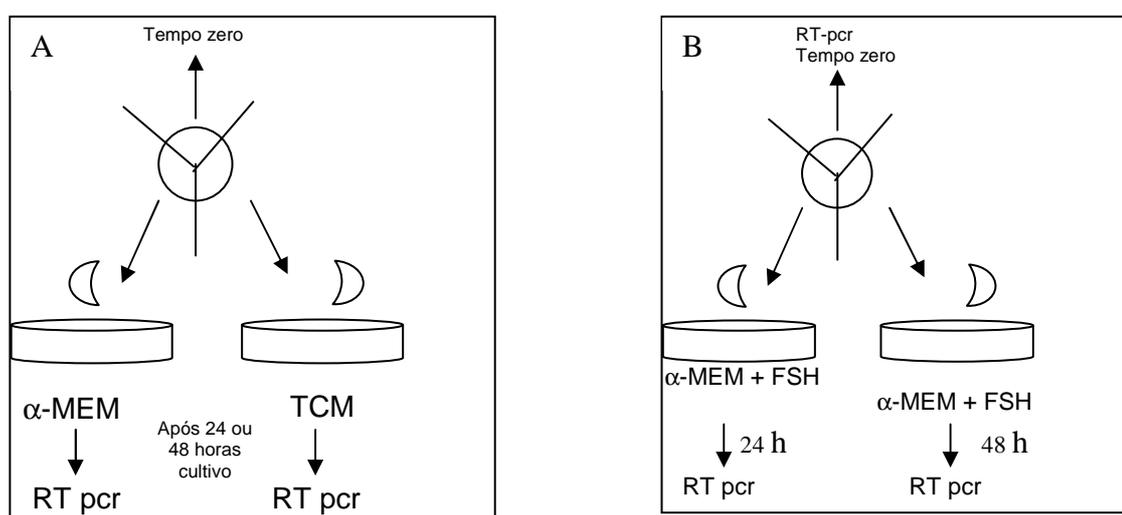
Folículos de 5mm diâmetro foram seccionados ao meio para obtenção das hemisseções. Foram feitos dois grupos, em um grupo, enquanto uma hemisseção foi cultivada em 100μl de meio TCM a outra foi cultivada em 100μl de meio α-MEM, no outro grupo, uma HS foi cultivada em 100μl meio α-MEM e a outra em 100μl meio α-MEM + FSH (10ng/ml). As hemisseções foliculares permaneceram em cultivo por 24 ou 48 horas.



**Esquema 4** - cultivo das hemisseções em meio α-MEM e TCM.

4.1.2 EXPERIMENTO 2 – Verificação da expressão da proteína StAR, das enzimas da esteroidogênese e do receptor de FSH (rFSH) pelas células somáticas do folículo ovariano bovino quando cultivado em três meios de cultura distintos.

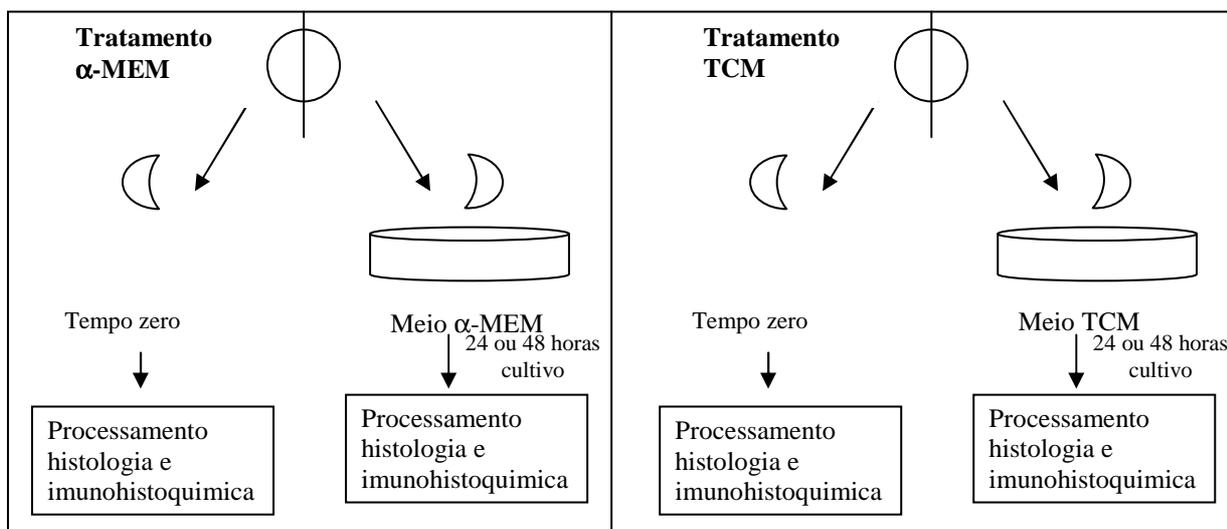
Os folículos obtidos foram seccionados em três partes e foram feitos dois grupos experimentais. No primeiro grupo a primeira parte da parede folicular foi imediatamente encaminhada para fazer RT PCR e representa o tempo zero, enquanto as demais foram colocadas em cultivo, uma no meio TCM a outra no  $\alpha$ -MEM. No outro grupo, uma parte da parede folicular foi imediatamente processada, enquanto as demais foram cultivadas em meio  $\alpha$ -MEM+FSH por 24 ou 48 horas.



**Esquema 5** – figura A – representa a obtenção das partes da parede do folículo ovariano que foram submetidas ao RT PCR, em tempo zero, e após cultivo nos meios  $\alpha$ -MEM e TCM. Figura B – representa a obtenção das partes da parede do folículo ovariano que foram submetidas ao RT PCR, em tempo zero, e após cultivo nos meios  $\alpha$ -MEM + FSH por 24 e 48 horas.

4.1.3 EXPERIMENTO 3 – Análise das características morfológicas e imunolocalização da conexina 43 nas células da HS folicular antes e após serem cultivadas em três meios de cultura distintos.

Os folículos ovarianos foram seccionados ao meio, originando duas hemisseções. Enquanto uma hemisseção foi imediatamente fixada e direcionada para processamento histológico e imunoistoquímico e representa o tempo zero, a outra, foi cultivada em meio TCM ou meio  $\alpha$ -MEM. Foram feitos cultivos por 24 e 48 horas.



**Esquema 6** - Experimento para obtenção das hemisseções em tempo zero e após cultivo nos meios  $\alpha$ -MEM e TCM para serem submetidas à histologia e imunohistoquímica.

#### 4.2 Coleta dos ovários e obtenção e cultivo das hemisseções (HS) foliculares para estudos *in vitro*

Os ovários foram obtidos de vacas, em diferentes momentos do ciclo reprodutivo, abatidas nas unidades da rede de Frigoríficos FRIBOI de Formosa-GO e Planaltina-DF, ou do Frigorífico Raça no Paranoá-DF, situados a aproximadamente uma hora do Laboratório para Estudo da Reprodução - UnB. Imediatamente após o abate, os ovários foram removidos das vísceras e imersos em solução fisiológica aquecida a 35-38°C, acrescida de estreptomina 100mg/ml (Estreptomax, Ourofino Ltda.) (Sirard, 1992). Em seguida, foram transportados até o laboratório, lavados em solução fisiológica pré-aquecida na temperatura de 35°C e mantidos nessa mesma solução em banho-maria até o momento da dissecação dos mesmos.

Os folículos ovarianos foram selecionados mediante observações visuais, de modo a utilizar aqueles com diâmetro em torno de 4-5 mm, com formato esférico, boa vascularização e parede translúcida (Sirard, 1993). Após serem selecionados, os folículos foram cuidadosamente dissecados com o auxílio de tesouras e bisturi, em placas de petri e ambiente estéril, sendo retirado o máximo de tecido conectivo possível (estroma) e em seguida mantidos em PBS aquecido até serem divididos ao meio com auxílio de bisturi para então obter as hemisseções.



**Imagem 1** - Folículo ovariano dissecado (seta vermelha).

As hemisseções de cada folículo tiveram destinos diferentes, enquanto uma foi direcionada para ser analisada no tempo zero (To) a outra hemisseção foi cultivada em 100µl de meio e incubada em estufa a 95% umidade, 5% de CO<sub>2</sub>, 38,5°C, por 24 e 48 horas. Foram utilizados três meios de cultivo, para comparação. Um meio complexo já amplamente utilizado para cultura de tecido, TCM 199+SFB; que leva em sua composição o meio TCM-199 com sais de Earle, L-glutamina e bicarbonato (Gibco), suplementado com soro fetal bovino (SFB), piruvato de sódio, FSH (200ng/ml), penicilina/estreptomicina; um meio quimicamente definido padronizado em nosso laboratório, α-MEM+PVA - α-MEM, com L-glutamina, ribonucleosídeos e desoxiribonucleosídeos (Gibco), suplementado com bicarbonato de sódio, Hepes, álcool povidônico – PVA, selenium, transferrina, androstenediona, IGF-1, insulina, aminoácidos não essenciais-NAAS, penicilina/estreptomicina, e este mesmo meio quimicamente definido acrescido de dose fisiológica (10 ηg/ml) do hormônio folículo estimulante (FSH), α-MEM+PVA+FSH.

### **4.3 Determinação do RNAm das Enzimas da Esteroidogênese na hemisseção folicular por RT-PCR.**

#### *4.3.1 Extração do RNAm*

Foram usados materiais, vidrarias e reagentes RNase-free. Para isso, toda a vidraria empregada no preparo de reagentes e na extração de RNA foi esterilizada a 180°C por 12 horas em estufa. Foi utilizada água altamente purificada (Sistema Milli-Q, Millipore) tratada com solução 0,1% de DEPC (dietilpirocarbonato) por 12 horas e autoclava antes do uso.

Foi feita a extração do RNAm total das partes do folículo ovariano, de modo que uma foi imediatamente processada, representando desta forma o tempo

zero, enquanto que as outras foram cultivadas em um dos meios previamente descritos nos tempos 24 e 48 horas.

As partes da parede do folículo ovariano (~7mg tecido) foram vigorosamente homogeneizadas com 1ml do Reagente Trizol (Invitrogen), com o auxílio de pistilo RNase free; foram então adicionados 200µl de clorofórmio e, após homogeneização por agitação durante 15 segundos, foram centrifugados a uma rotação de 12000x g a 4°C, durante quinze minutos. Após centrifugação, foram formadas três fases distintas: uma fase aquosa que corresponde ao RNA total do tecido triturado; uma fase branca intermediária que corresponde à proteína total; e uma fase cor-de-rosa que correspondente ao DNA total da amostra. A fase aquosa que continha o RNA total foi transferida para outro tubo Eppendorf, enquanto que o restante foi desprezado.

Ao RNA total obtido foram acrescentados 500µL de álcool isopropílico, após incubação de 10 minutos seguiu-se centrifugação de 12000 x g por 10 minutos a temperatura de 2 a 8°C. O sobrenadante foi desprezado, e o precipitado lavado com 1mL de etanol 75% e novamente centrifugado a 7500 x g por cinco minutos a 2 a 8°C. O sobrenadante foi descartado com o cuidado de preservar o pequeno pellet (corpo de fundo) no fundo do tubo. Finalmente, os tubos foram mantidos abertos e aguardou-se a secagem à temperatura ambiente. O precipitado foi então ressuscitado em 5µL de água altamente purificada e livre de RNases, e posteriormente estocado a -20°C até o momento de ser utilizado para o a reação de confecção da fita simples de cDNA (Transcriptase reversa).

O RNA total foi quantificado com o uso do GeneQuant pro UV/Vis Spectrophotometer RNA/DNA calculator, o aparelho é capaz de determinar tanto as concentrações de RNA, quanto de impurezas e contaminações na amostra. A partir da concentração de RNA total na amostra calculou-se o volume necessário para se obter 2µg de RNA a ser utilizado no RT-PCR.

#### *4.3.2 Transcrição Reversa - RT*

Para a confecção da fita simples de cDNA (DNA complementar), adicionaram-se os seguintes componentes ao tubo de microcentrífuga (eppendorf 0,5mL): 2µg do RNA total, 1µL de oligo(dT) 50µM, 1µL de 10mM do mix de dNTPs (10mM de dATP, dGTP, dCTP e dTTP em pH neutro) e 9µL de água livre de RNases. A mistura foi aquecida a 65°C por cinco minutos no termociclador, e

rapidamente resfriados no gelo. Após breve centrifugação, foi adicionado 4 $\mu$ L do 5x tampão da primeira fita, 1 $\mu$ L de DTT 0,1M, 1 $\mu$ L do inibidor de RNase, 1 $\mu$ L da enzima Transcriptase reversa SuperScript III (Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA) e cuidadosamente homogeneizado para então ser incubado no termociclador à 50°C por 60 minutos. Para inativar a enzima, a reação foi finalizada mantendo os tubos a 70°C por quinze minutos. Os cDNAs obtidos foram armazenados em freezer a -20°C até o uso na reação de PCR.

#### 4.3.3 Oligonucleotídeos Iniciadores (primers)

Foram usados os oligonucleotídeos iniciadores que se liga a regiões altamente conservadas, desenhados pelo Prof. Dr. Fernando Araripe Torres (Laboratório de Biologia Molecular – UnB) a partir das seqüências obtidas no GenBank para a espécie *bos taurus*, sendo as seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores senso (forward) e anti-senso (reverse) localizadas em diferentes exons.

Os iniciadores desenhados foram os seguintes:

**Tabela 1.** Seqüência dos primers específicos das enzimas da esteroidogênese de bovinos (*bos taurus*)

nucleodídeo iniciador	Enzima	Seqüência	Tamanho do amplicon
GAPD	GAPDH	“F”5’-CATTGACCTTCACTACATGGT “R”5’-ACCCTTCAAGTGAGCCCCAG	230pb
STAR	StAR	“F” 5’CTACAGACATGTGCGCAGCATG “R”5’CATGCGCTCCACAAGCTCTTC	384pb
CYP11A1	P450scc	“F”5’-CAATGGCTGGCTTAACCTCTAC “R”5’-TGGATTCAGCAGTGGGATGAAG	352pb
CYP17	17 $\beta$ HSD	“F”5’-TTCGTTTGGGTTCCAAGACGAC “R”5’-GAAGTTGAAGCAGATAAAGCTG	363pb
CYP19	P450 arom	“F”5’-GAGGACACATCCTCAATACCAG “R”5’-CTTGGTGATGGAATCAGCACAG	387pb
3BHSD	3 $\beta$ HSD	“F”5’-CAACGGCATCCTGACCAATCAC “R” 5’-CACGCTGTTGGAAGAAGTCAC	354PB
rFSH	rFSH	“F” 5’ –GACCCTGATGCCTTCCAGAAC “R” 5’ –CTTGGCCCGCAGCTTCTTAAG	212pb

#### 4.3.4 Reação de Polimerase em Cadeia- PCR

Para cada reação de amplificação, os seguintes reagentes foram adicionados a um tubo de 0,5mL: 2µg do cDNA, 1µL de iniciadores senso e anti-senso específico, 1µL de dNTP, 5µL de tampão 10X para PCR (Invitrogen), 2,5µL de MgCl 50mM, enzima Taq polimerase (GE) e 41µL de água ultrapura. Cada reação de amplificação foi realizada com o uso de soluções "MIX" (com o intuito de padronizar a pipetagem) contendo todos os reagentes, exceto o cDNA. A reação foi realizada no termociclador, sendo que as condições de reação foram uma desnaturação inicial de dois minutos a 94°C, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 53°C por 1 minuto e 30 segundos para anelamento, 72 °C por 2 minutos e 30 segundos para síntese, seguidos por uma extensão final de 10 minutos à 72°C, sendo então as amostras mantidas a 4°C.

Os resultados das reações foram avaliados em gel de agarose a 1,5%, contendo brometo de etídio e visualizado sob luz UV. O resultado em gel foi documentado fotograficamente com câmara e posteriormente digitalizadas.

#### 4.4 Dosagem Hormonal

Ao final do tempo de cultura da hemisseção por 24 ou 48 horas, a mesma foi coletada e processada de acordo com a análise para a qual seria direcionada, enquanto que o meio de cultura foi coletado e armazenado a – 20°C, para subsequente dosagem dos hormônios esteróides: estradiol e progesterona.

As dosagens dos hormônios nos meios de cultura foram realizadas no Laboratório de Farmacologia Molecular da Faculdade de Saúde da UnB, usando um kit comercial de radioimunoensaio (RIE) de fase sólida Coat-A-Count, proveniente da Diagnostic Products (DPC-MedLab, Diagnostic Products).

No radioimunoensaio em fase sólida, a quantificação do antígeno é feita pela competição de formas radioativas e não radioativas de cada hormônio. Estes vão competir entre si pelos sítios de ligação livres no anticorpo específico. Neste sistema o anticorpo está ligado à parte interna dos tubos de polipropileno. O complexo antígeno-anticorpo permanece ligado à parede do tubo, e o antígeno livre é decantado ou evaporado. Os tubos são levados a um contador Gamma para determinação da quantidade de antígeno <sup>125</sup>I ligado ao anticorpo. A quantidade de

radiação detectada é inversamente proporcional à concentração do hormônio, que é por sua vez determinada através de curva padrão fornecida com o Kit comercial.

As concentrações de estradiol (foi feita diluição de duas vezes utilizando o calibrador A do Kit de RIE) e progesterona( foi feita diluição de 10 vezes utilizando o calibrador A do Kit de RIE) nos meios de cultura foram determinados seguindo as recomendações do manual de instruções do fabricante. O limite de detecção do kit RIE para o estradiol é de 10pg/ml, e o coeficiente de variação intra-ensaio e inter-ensaio foi 7% e 8,1%, respectivamente. O limite de detecção do kit RIE para progesterona é de 0,03 ng/mL, e o coeficiente de variação intra-ensaio e inter-ensaio foi 13,2% e 14,8% respectivamente.

#### **4.5 Histologia e Imunohistoquímica para Conexina 43**

As HS da parede folicular foram imersas em solução fixadora de paraformaldeído 4%, onde permaneceram por 4 horas e, ao final deste período, foram transferidas para solução alcoólica 70% até o momento de serem emblocadas em parafina. Este procedimento foi realizado tanto com as HS referentes ao tempo de zero, como aquelas obtidas ao final do tempo de cultura de 24 e 48 horas, dos tratamentos com os meios complexo TCM, e definido  $\alpha$ -MEM e  $\alpha$ -MEM + FSH.

A inclusão em parafina foi realizada em equipamento automático, marca Leica, pertencente ao Laboratório de Patologia LIB, no qual o material foi submetido à seqüência tradicional de desidratação, iniciando no álcool 90%, diafanização, xilóis e imersão em parafina.

As hemisseções foram emblocadas em parafina e os cortes, realizados em micrótomo convencional com espessura de 5 a 6  $\mu$ m, aderidos às lâminas com silano. Para cada hemisseção foram feitos duas lâminas, com três cortes em cada, uma foi destinada para coloração com hematoxilina e eosina, enquanto a outra foi destinada a realização dos testes de imuno-histoquímica para conexina 43.

Para que haja comparação entre a ocorrência de Cx43 no material coletado as hemisseções são submetidas ao processamento histológico tradicional, para produção de lâminas que foram incubadas anti-Cx43 (Zymed) nas diluições 0,31; 0,62; 1,25 e 2,5 $\mu$ g/ml.

Para as reações de imuno-histoquímica a técnica utilizada foi a de imunoperoxidase para a identificação das moléculas-alvo.

As lâminas foram incubadas em peróxido de hidrogênio (Merck) a 3% em metanol (Vetec), por 17 minutos, para o bloqueio da peroxidase endógena. Após lavagem com água destilada, as lâminas foram incubadas em tampão citrato (Sigma), pH=6.2 e aquecidas a uma temperatura de 120°C sob pressão por 1 minuto e 30 segundos. Em seguida as lâminas permaneceram no tampão citrato por 30 minutos, à temperatura ambiente e posteriormente incubada com soro de leite a 3% em PBS por 30 minutos, a fim de se obter o bloqueio das ligações protéicas inespecíficas. As lâminas foram então secas e incubadas com os anticorpos primários anti-Cx 43 (Zimed) na concentração de 0,62µg/ml durante 18 horas e mantidas na temperatura de 4°C. As Lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Mayer por 10 minutos.

Os cortes histológicos após o processamento imunohistoquímico foram analisados em microscopia óptica e fotografados pelo Axiophot.

Foram analisados três hemisseções para cada tempo de cada tratamento, com três cortes seqüenciais de cada hemisseção por lâmina. As lâminas foram examinadas sempre ao mesmo microscópio e com a mesma intensidade de luz, utilizando-se objetiva de 40x. A intensidade da imunocoloração foi classificada como ausente, predominantemente negativa, predominantemente positiva ou sempre positiva. Os controles negativos foram utilizados para, comparativamente, detectar se houve coloração inespecífica.

#### **4.6 Análise Estatística**

Foram analisados o efeito de três meios de cultura diferentes,  $\alpha$ -MEM,  $\alpha$ -MEM+FSH e TCM, sobre a hemisseção folicular com relação à concentração dos hormônios estradiol e progesterona produzido ao longo do tempo de cultura, 24 e 48 horas. Foram realizados 21 repetições em três dias distintos de experimentos.

Para a análise estatística de comparação das médias das concentrações hormonais obtidas, foi aplicado o teste *t-Student* devido a esta ser uma pesquisa experimental envolvendo variáveis numéricas contínuas; ao nível de significância de 5%. As concentração são expressas como média  $\pm$ EPM (erro padrão da média).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Determinação da concentração de $17\beta$ estradiol (E2) e progesterona (P4) nos meios TCM e $\alpha$ -MEM após cultivo da hemisseção por 24 e 48 horas.

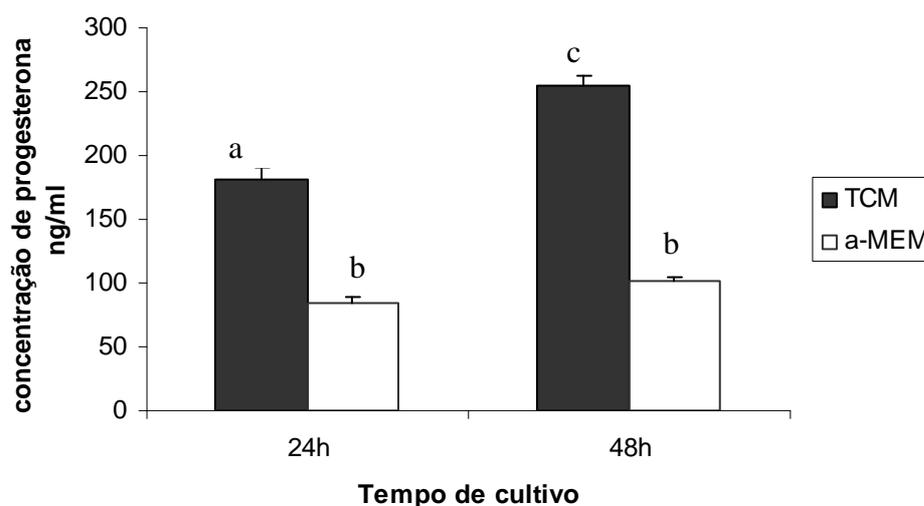
#### Experimento 1 - Comparação entre $\alpha$ -MEM e TCM

O meio de cultura coletado ao final de cada tempo de cultivo (24 ou 48 horas) foi analisado para determinação da concentração dos hormônios esteróides progesterona (P4) e estradiol (E2).

A figura 1 mostra as concentrações médias  $\pm$  EPM (erro padrão da média) de progesterona secretada pelas células da hemisseção de folículo ovariano bovino após serem cultivadas em meio definido  $\alpha$ -MEM ou indefinido TCM, nos tempos de 24 e 48 horas.

Estes resultados demonstram que há diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre os tratamentos com os meios  $\alpha$ -MEM e TCM com relação à produção média do hormônio progesterona pelas hemisseções foliculares. A concentração de progesterona é maior em meio de cultura TCM do que em meio  $\alpha$ -MEM ( $p < 0,05$ ).

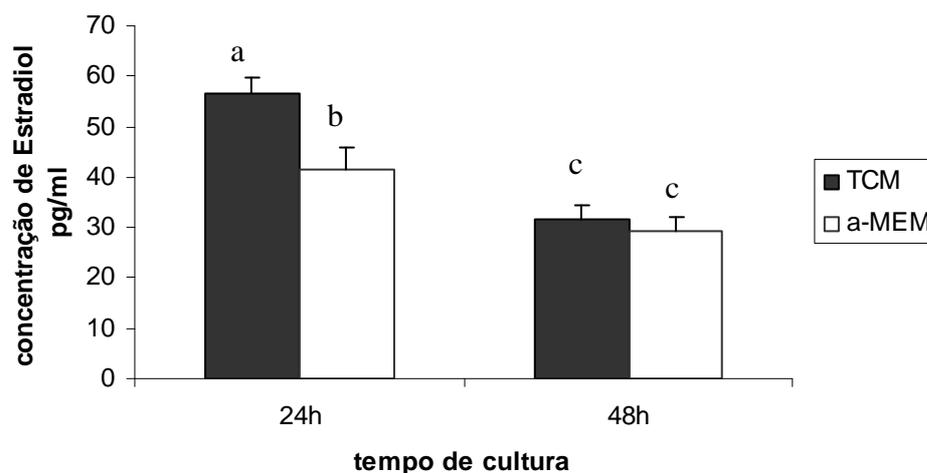
No meio de cultura TCM a concentração de progesterona é crescente ao longo das 48 horas de cultivo ( $p < 0,05$ ), enquanto que a secreção deste hormônio por hemisseções cultivadas no meio  $\alpha$ -MEM se mantém semelhante nos tempos de 24 e 48 horas de cultivo ( $p > 0,05$ ).



**Figura 1** - Concentração média de P4 (ng/ml), produzida pela hemisseção, nos meios de cultura  $\alpha$ -MEM e TCM após 24 e 48 horas de cultivo. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (n=84). Letras diferentes sobrescritas representam diferença estatística (teste t;  $P < 0.05$ ).

A concentração média  $\pm$  EPM de estradiol secretado pelas hemisseções foliculares após serem cultivadas no meio TCM ou  $\alpha$ -MEM nos tempos de 24 ou 48 horas está representada na figura 2.

A concentração média de estradiol é maior nos sistemas de cultivo com o meio TCM do que com o meio  $\alpha$ -MEM após 24 horas de cultura ( $p < 0.05$ ). No entanto, a concentração média de estradiol diminui pela metade ( $p < 0.05$ ) nos sistemas de cultivo com o meio TCM por 48 horas, enquanto que a concentração de estradiol diminui ( $p < 0.05$ ) em  $\frac{1}{4}$  nos sistemas com o meio  $\alpha$ -MEM, em cultivos por 48 horas. Com 48 horas de cultivo as concentrações médias do hormônio estradiol são semelhantes nos dois sistemas de cultura, definido  $\alpha$ -MEM e indefinido TCM ( $p = 0.53$ ).



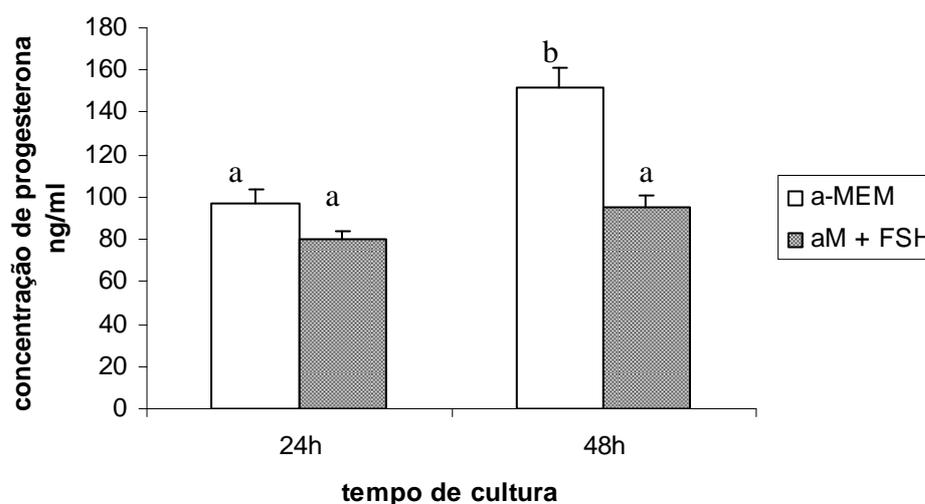
**Figura 2** - Concentração média de E2 (pg/ml), produzida pela hemisseção, nos meios de cultura  $\alpha$ -MEM e TCM após 24 e 48 horas de cultivo. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (n=84). Letras diferentes sobrescritas representam diferença estatística (teste t;  $P < 0.05$ ).

#### Experimento 1 - Comparação entre $\alpha$ -MEM e $\alpha$ -MEM+FSH

A figura 3 mostra a concentração média de progesterona pelas hemisseções foliculares após serem cultivadas em meio  $\alpha$ -MEM ou meio  $\alpha$ -MEM acrescido de FSH, por tempos de cultivo de 24 e 48 horas.

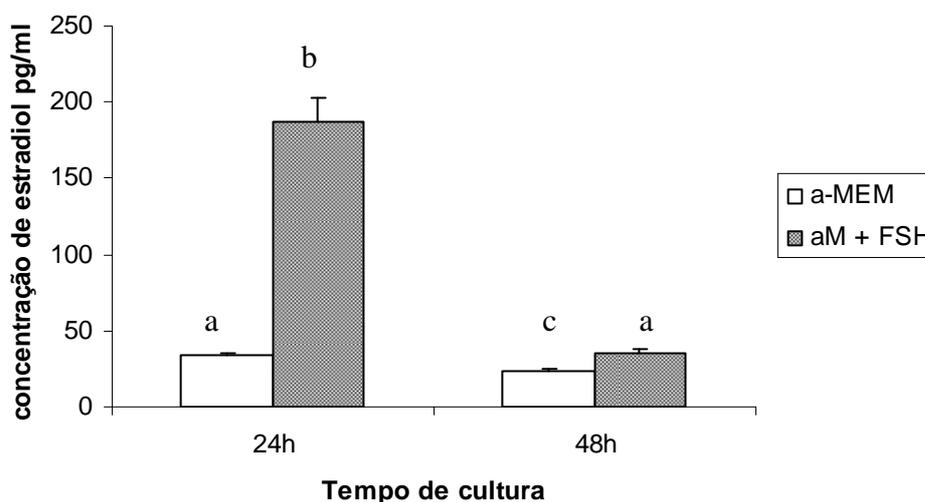
Não foi encontrada diferença estatística entre a concentração de progesterona produzida pelas hemisseções cultivadas por 24 horas em meios  $\alpha$ -MEM ou  $\alpha$ -MEM+FSH ( $p=0.16$ ). No entanto, a concentração média de progesterona é maior no meio  $\alpha$ -MEM do que no  $\alpha$ -MEM acrescido de FSH após 48 horas de cultivo ( $p < 0.05$ ).

No meio  $\alpha$ -MEM a concentração de progesterona é crescente ao longo do tempo de cultura ( $p < 0,05$ ), enquanto que no meio  $\alpha$ -MEM+FSH essa produção se mantém semelhante entre os tempos 24 e 48 horas ( $p > 0,05$ ).



**Figura 3** - Concentração média de P4 (ng/ml) produzida pela hemisseção cultivada nos meios de cultura  $\alpha$ -MEM e  $\alpha$ -MEM+FSH após 24 e 48 horas de cultivo. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (n=40). Letras diferentes sobrescritas representam diferença estatística (teste t; P < 0.05).

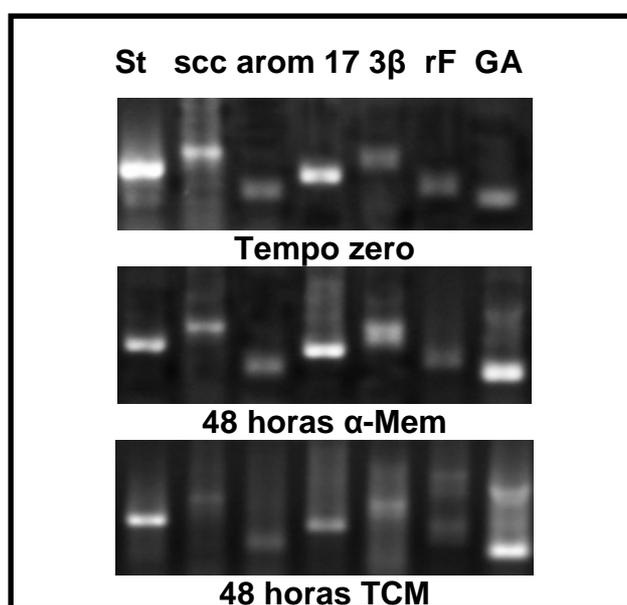
A produção média de estradiol pelas hemisseções foliculares cultivadas em meio  $\alpha$ -MEM+FSH foi estatisticamente maior do que àquelas cultivadas em meio  $\alpha$ -MEM, tanto nos tempos de 24 quanto de 48 horas (p < 0,05), como podemos observar na figura 4.



**Figura 4** - Concentração média de E2 (pg/ml) produzida pela hemisseção cultivada nos meios de cultura  $\alpha$ -MEM e  $\alpha$ -MEM+FSH após 24 e 48 horas de cultivo. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (n=40). Letras diferentes sobrescritas representam diferença estatística (teste t; P < 0.05).

## 5.2 Expressão do RNAm da proteína StAR, das enzimas da Esteroidogênese, e do rFSH.

A figura 5 mostra o resultado do RT-PCR para a expressão da proteína StAR (St), das enzimas da esteroidogênese P450scc (scc), P450 aromatase (arom), 17 $\beta$ hidroxidesidrogenase (17) e 3 $\beta$  hidroxidesidrogenase (3 $\beta$ ), e do receptor de FSH (rFSH) nas HS foliculares antes (tempo zero) e após cultivo de 48 horas, tanto para o meio de cultura definido  $\alpha$ -MEM, quanto naquelas cultivadas no meio indefinido TCM.



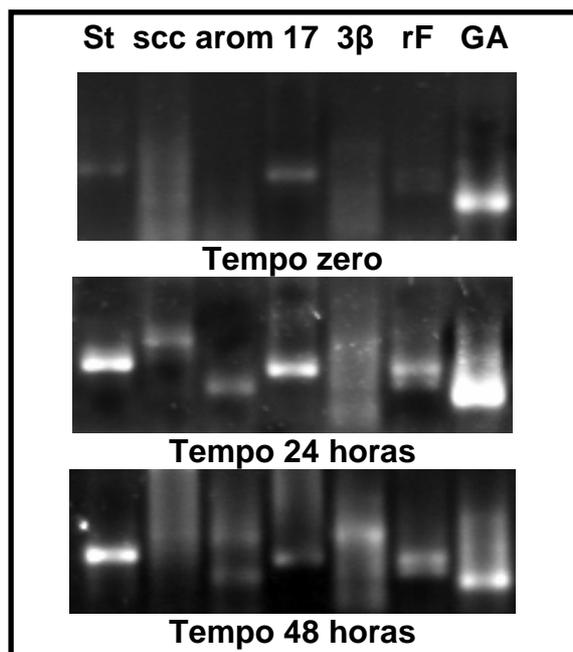
**Figura 5** - Expressão das enzimas da esteroidogênese e receptor de FSH pelas hemisseções foliculares no tempo zero, e após serem cultivadas por 48 horas no meio  $\alpha$ -MEM e TCM. St = Star, scc = P450scc, arom = P450aromatase, 17 = 17 $\beta$ HSD, 3 $\beta$  = 3 $\beta$ HSD, rFSH = receptor de FSH, GA = GAPD.

No tempo zero, ou seja, antes do cultivo é possível observar a expressão do RNAm de todas as enzimas analisadas, no entanto a luminosidade das bandas referentes às enzimas StAR, P450scc e 17 $\beta$ HSD são bem mais intensas que as demais.

Após 48 de cultivo da hemisseção no meio  $\alpha$ -MEM nota-se a manutenção da expressão das enzimas da esteroidogênese, de modo que enquanto o meio definido  $\alpha$ -MEM oferece condições para a manutenção da expressão enzimática, estas sofrem uma regulação para baixo naquelas hemisseções cultivados no meio complexo TCM.

É possível observar que após 48 horas de cultivo das hemissecções no meio  $\alpha$ -MEM há uma expressão maior das enzimas P450<sub>scc</sub>, P450<sub>arom</sub>, 17 $\beta$ HSD e 3 $\beta$ HSD.

O resultado do RT-PCR que mostra a expressão das enzimas da esteroidogênese e do receptor do FSH nas hemissecções foliculares cultivadas em meio  $\alpha$ -MEM+FSH por 24 e 48 horas, está expresso na figura 6.



**Figura 6** - Expressão das enzimas da esteroidogênese e receptor de FSH pelas hemissecções foliculares no tempo zero, e após serem cultivadas por 24 e 48 horas no meio  $\alpha$ -MEM+FSH. St = Star, scc = P450<sub>scc</sub>, arom = P450<sub>aromatase</sub>, 17 = 17 $\beta$ HSD, 3 $\beta$  = 3 $\beta$ HSD, rFSH = receptor de FSH, GA = GAPD.

A adição de concentração fisiológica do FSH ao meio definido  $\alpha$ -MEM torna nítido a intensidade da luminosidade das bandas representativas das enzimas StAR, P450<sub>scc</sub>, P450<sub>arom</sub>, 17 $\beta$ HSD, 3 $\beta$ HSD e do receptor de FSH, após 24 horas de cultivo, mesmo quando a expressão destas enzimas na hemissecção no tempo zero está diminuída. Após 48 horas de cultivo a expressão das enzimas da esteroidogênese e do rFSH é mantida.

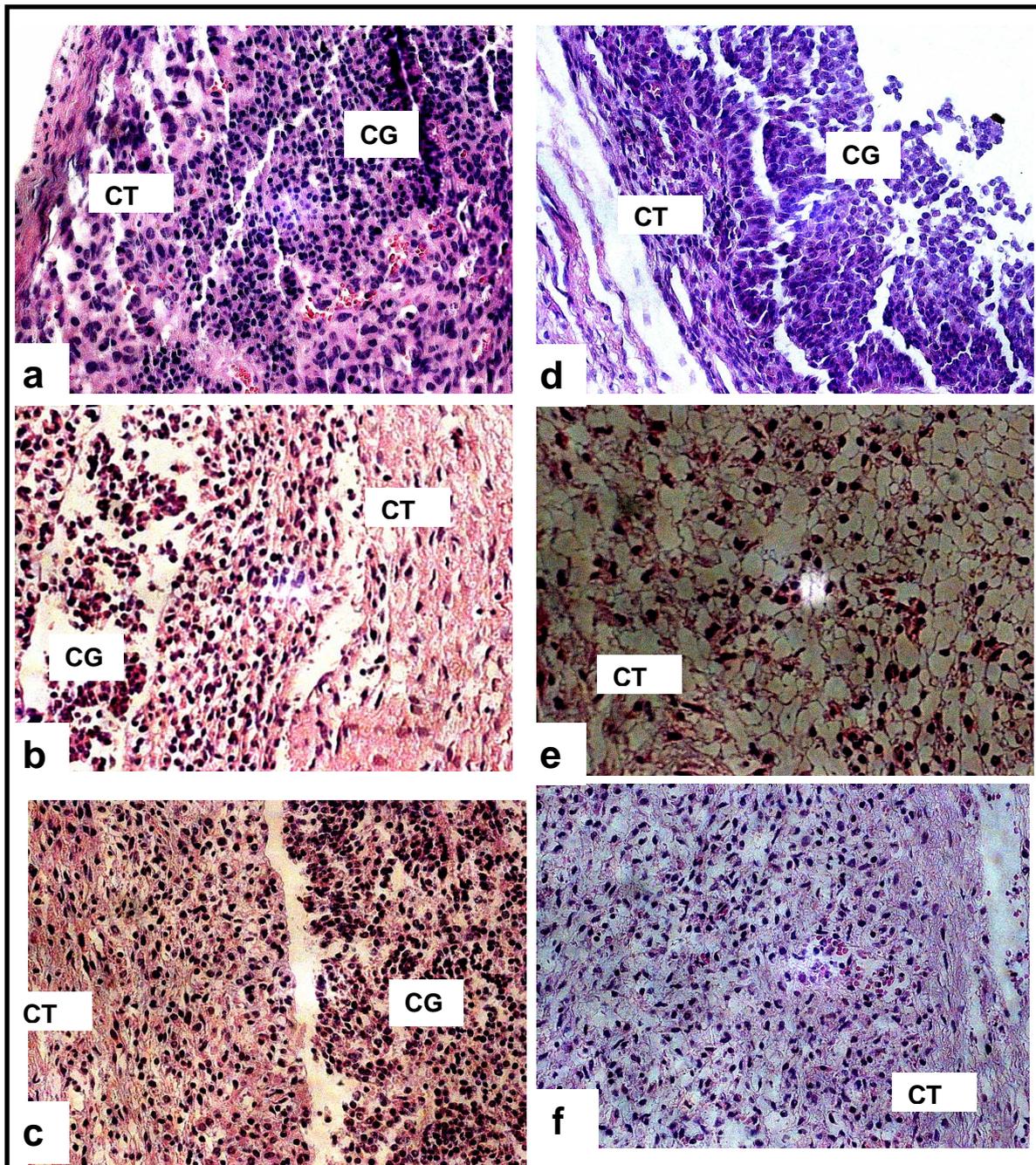
### **5.3 Aspecto morfológico das células foliculares da hemisseção de folículo ovariano bovino após cultivo em meio complexo TCM e meio definido $\alpha$ -MEM.**

A hemisseção da parede do folículo ovariano constitui a porção somática do folículo, na qual se observa CG estratificadas sobre uma lâmina basal e posteriormente uma porção altamente vascularizada formada por camadas de CT interna e externa.

As hemisseções de folículo ovariano obtidas no tempo zero (figura 1 a - d) e cultivado no meio  $\alpha$ -MEM por 24 e 48 horas (figura 7 b - c) apresentam CG em camadas distintas de células colunares e arredondadas, e às vezes achatadas; forma poliédrica, com baixa razão citoplasma/núcleo. As CT interna estão logo abaixo à membrana basal, possuem formato arredondado, enquanto que as CT externa assemelham-se a fibroblastos. A manutenção dessa morfologia celular está intrinsecamente relacionada com a capacidade esteroidogênica das células.

Já nos cortes histológicos de hemisseções de folículo ovariano obtidas após cultivo no meio complexo TCM por 24 e 48 horas não foi possível a identificação e a distinção entre as CG e as CT interna (figura 7 e - f). Foi observada uma drástica alteração na morfologia destas células, as quais deixaram de ser poliédricas e adquiriram forma irregular e alongada, semelhante às células fibroblásticas.

Apesar da não identificação ou distinção morfológica das CG, a sua presença é confirmada pela detecção por RT-PCR da enzima P450 aromatase nas hemisseções cultivadas em meio TCM.



**Figura 7** – Coloração com HE de hemisseção de folículo ovariano bovino. CG= CG; CT= CT. **a – d.** Hemisseções no tempo zero. **b – c.** Hemisseções após cultivo no meio  $\alpha$ -MEM nos tempos 24 e 48 horas, respectivamente. **e – f.** Hemisseções após cultivo no meio TCM nos tempos 24 e 48 horas, respectivamente.

#### 5.4 Expressão e localização da proteína Cx43 em hemissecção de folículo ovariano bovino após cultivo em meio complexo TCM e meio definido $\alpha$ -MEM.

A localização imunohistoquímica usando anticorpo para Cx43 revelou o padrão de expressão dessas junções comunicantes nas hemissecções de folículo ovariano bovino, antes e após o cultivo nos seguintes meios: TCM e  $\alpha$ -MEM; nos tempos 24 e 48 horas.

A Cx43 é detectada como marcação de coloração marrom escuro.

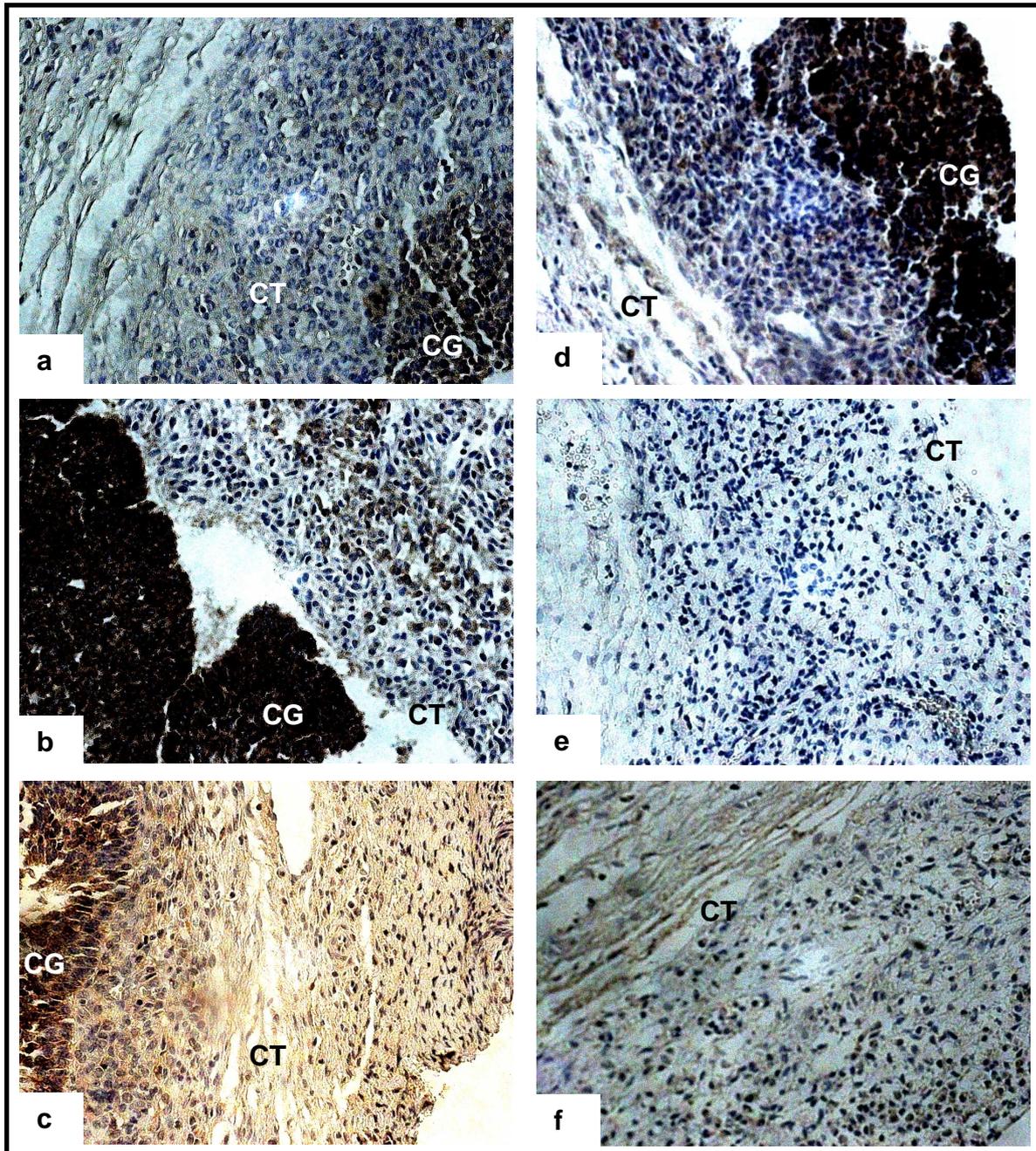
A imunorreatividade para Cx43 ocorreu principalmente nas CG das hemissecções foliculares obtidas no tempo zero (figura 8 a) e após cultivo em meio definido  $\alpha$ -MEM (figura 8 b, c), com aumento progressivo na intensidade da coloração ao longo do tempo de cultivo, a qual variou de predominantemente positiva no tempo zero para positiva após ser cultivada. No entanto, as hemissecções cultivadas no meio complexo TCM, embora apresentassem as CG marcadas para Cx43 no tempo zero (figura 8 d), a expressão da proteína nestas células diminuiu abruptamente já com 24 horas de cultivo (figura 2 e, f).

A imunomarcação para Cx43 nas CT interna e externa foi predominantemente negativa no tempo zero (figura 8 a, d). Após o cultivo das hemissecções, a intensidade de coloração varia de predominantemente negativa para predominantemente positiva nas CT de hemissecções cultivadas no meio de cultura definido  $\alpha$ -MEM (figura 8 b, c). Já as CT de hemissecções cultivadas no meio complexo TCM permanecem com marcação predominantemente negativa ou negativa (figura 8 e, f).

**Tabela 2** Sumário da imunolocalização da proteína Cx43 na hemissecção de folículo ovariano bovino antes e após cultivo nos meios TCM e  $\alpha$ -MEM.

<b>Tratamento – tipo celular</b>	<b>Tempo zero</b>	<b>Tempo 24 horas</b>	<b>Tempo 48 horas</b>
TCM - CG	++/-	-	-
TCM – CT	--/+	-	--/+
$\alpha$ -MEM – CG	++/-	+++	+++
$\alpha$ -MEM – CT	+/--	++/-	++/-

A intensidade da imunocoloração foi classificada como ausente (-), predominantemente negativa (+/--), predominantemente positiva (++/-) ou sempre positiva (+++).



**Figura 8** – Expressão imuno-histoquímica da proteína Cx43 na hemisseção de folículo ovariano bovino. CG=célula da granulosa; CT= célula da teca. **a** e **d**. hemisseções no tempo zero. **b** - **c**. hemisseção após 24 e 48 horas de cultivo no meio  $\alpha$ -MEM, respectivamente. **e** - **f**. hemisseção após 24 e 48 horas de cultivo no meio TCM.

## 6. DISCUSSÃO

### **Concentração dos hormônios estradiol e progesterona produzidos pelas hemisseções foliculares e expressão das enzimas da via da esteroidogênese após o cultivo em meio $\alpha$ -MEM e TCM.**

O propósito de padronizar um modelo experimental que tivesse em sua composição todas as células do folículo ovariano para estudo da sua função é proveniente da necessidade de compreender melhor as interações envolvidas na atividade esteroidogênica folicular em um sistema isolado. A função *in vitro* das CG e da teca podem variar de acordo com as condições de cultura, estágio do desenvolvimento do folículo e localização das células dentro do mesmo (ROBERTS e ECHTERNENKAMP, 1994; ALLEGRUCCI, *et al.*; 2003). Assim, neste trabalho foi padronizado um sistema de cultivo das células somáticas (HS) da parede do folículo ovariano bovino em um meio definido desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisadores e que fornece condições para que as células comportem se semelhante àquelas de folículos em desenvolvimento.

Esse sistema de cultivo foi baseado na cultura de CG proposta por Campbell (1996), Gutiérrez (1997 a, b) e Colaboradores, porém substituímos o BSA pelo PVA, dentre outras modificações. A fim de estabelecer critérios para validar o sistema de cultivo em questão, consideramos relatos da literatura que indicam a determinação das concentrações dos hormônios estradiol e progesterona, e a expressão das enzimas envolvidas na via da esteroidogênese como marcadores do destino do folículo. Além dos hormônios e expressão do RNAm das enzimas da esteroidogênese, outros fatores são importantes como a caracterização do aspecto morfológico das células somáticas da parede folicular e imunolocalização da Cx43, responsável por manter a interação entre as células, já que sistemas de cultura que

falham em preservar a morfologia normal das CG, assim como a sua intercomunicação, possuem importância fisiológica limitada (GUTTIERREZ, *et al.*; 1997b).

O modelo experimental *in vitro*, aqui apresentado, para estudo da foliculogênese e esteroidogênese foi padronizado em meio de cultura que pode ser perfeitamente considerado como quimicamente definido, já que utiliza PVA para ajuste de osmolaridade ao invés de soro fetal ou mesmo BSA, proteínas que sabidamente carregam fatores de crescimento, hormônios e esteróides em concentrações desconhecidas (MINGOTI, *et al.*; 2002).

Os folículos utilizados tinham entre 4 e 6 mm de diâmetro e faziam parte do coorte de folículos ovarianos que podem ser considerados saudáveis tendo em vista a concentração de hormônios e a expressão das enzimas da esteroidogênese, e que foram recrutados para o crescimento e que poderiam ser selecionados e vir a tornarem-se dominantes. O folículo dominante surge com tamanho maior que os demais (dominância morfológica), que é precedido por alterações intrafoliculares anteriores ao seu crescimento proeminente (dominância bioquímica) (FORTUNE, 2004). Uma das características bioquímicas encontrada em um folículo selecionado para a dominância é a manutenção da elevada concentração de estradiol, a qual está intimamente relacionado às condições que o folículo ovariano é submetido; já que quando se desenvolve durante a fase folicular ele pode se diferenciar em folículo pré-ovulatório e ovular (BRIDGES e FORTUNE, 2003; ADAMS, *et al.*; 2008). Vários estudos com o cultivo de CG falharam em tentar mimetizar as condições representativas da fase folicular, uma vez que ao terem soro fetal em sua composição resultaram na diferenciação dessas células em células lúteas e um ambiente representativo da fase lútea do ciclo estral com altas concentrações do hormônio progesterona e diminuição vertiginosa da concentração de estradiol (BRIDGES e FORTUNE, 2003; ADAMS, *et al.*; 2008).

O sistema de cultivo desenvolvido neste trabalho que tem em sua composição  $\alpha$ -MEM+PVA procura fornecer condições que permitam as células da hemisseção da parede do folículo recrutado se comportem como células de folículo selecionado para adquirir dominância ao longo do tempo de cultura.

Uma das características avaliadas para comparar a hemisseção cultivada em  $\alpha$ -MEM ou TCM com o folículo em desenvolvimento é a atividade esteroidogênica e expressão das enzimas desta via, uma vez que a característica

proeminente do folículo dominante é a sua habilidade em produzir grande quantidade de estradiol (FORTUNE, 2001; BRIDGES e FORTUNE, 2003). O estradiol é sintetizado nas CG a partir da androstenediona proveniente das CT, sob ação da enzima P450 aromatase, a qual é regulada pelo LH e FSH (WEBB e ARMSTRONG, 1997).

A concentração do hormônio progesterona produzido pelas células da hemisseção cultivada no meio TCM é aproximadamente duas vezes maior do que a concentração encontrada no meio  $\alpha$ -MEM após 24 horas de cultura, e se mantém crescente ao longo das 48 horas seguintes, enquanto que a produção de progesterona pelas hemisseções cultivadas no meio  $\alpha$ -MEM não se altera. Já a concentração de estradiol produzido pelas hemisseções cultivadas no meio TCM apesar de ser maior do a produzida no meio  $\alpha$ -MEM nas primeiras 24, ela sofre um drástico decréscimo nas 24 horas seguintes, tendo produção semelhante à obtida pelas hemisseções cultivadas no meio  $\alpha$ -MEM. De forma que a relação estradiol/progesterona diminui ao longo do cultivo em meio TCM, e aumenta no sistema de cultivo com  $\alpha$ -MEM.

A elevada concentração de progesterona acompanhada de decréscimo acentuado na concentração do hormônio estradiol ao longo do tempo de cultura no meio TCM é condizente com resultados de outros estudos *in vitro*, onde foi observada perda da habilidade de síntese do estradiol e expressão da P450 aromatase (ROBERTS e ECHTERNKAMP, 1994; BERNDTSON *et al.*, 1995; BERNDTSON *et al.*, 1996) e luteinização espontânea das células e limitavam o uso desse sistema para estudo da fisiologia ovariana. A presença de soro fetal e concentrações suprafisiológicas de FSH no meio TCM podem ser os fatores responsáveis pela luteinização dessas células, uma vez que concentrações de FSH superiores a 200ng/ml além de falhar em estimular a atividade da enzima aromatase (BHATIA, *et al.*; 2001), está associado com decréscimo na expressão do RNAm da P450arom e regulação para baixo dos receptores de FSH (ZHANG e ROY, 2004).

As hemisseções cultivadas no meio  $\alpha$ -MEM apresentaram baixa produção de progesterona quando comparado com aquela obtida no meio TCM, a produção de estradiol, diferentemente das cultivadas em TCM, pouco se altera com o tempo de cultivo, demonstrando uma habilidade deste meio em manter a produção deste hormônio pelas células da hemisseção, resultado compatível com

o obtido em outros sistemas de cultura livres de soro (CAMPBELL *et al.*; 1996; GUTIÉRREZ, *et al.*; 1997a). O meio  $\alpha$ -MEM, é um meio definido, que leva em sua composição concentrações fisiológicas hormônios importantes para a esteroidogênese e foliculogênese, como Insulina e o IGF-I. Tanto a insulina como o IGF-1 exerce papel benéfico ao cultivo dessas células por suprimir apoptose, estimular a proliferação, diferenciação e a esteroidogênese (MONGET, *et al.*; 2002; YU, *et al.*; 2003) nas CG dependendo do estágio do desenvolvimento do folículo (MARSTERS, *et al.*; 2003). O acréscimo de concentrações fisiológicas do FSH ao meio  $\alpha$ -MEM foi favorável a um aumento pronunciado na produção do hormônio estradiol, que pode ser decorrente da habilidade que esta gonadotropina têm em estimular a secreção de estradiol, aumentar a expressão de P450 arom (SILVA e PRICE, 2002), P450scc (SILVA e PRICE, 2000), rFSH (MINEGISHI, *et al.*; 2000), aumentar a biodisponibilidade do IGF-1, via aumento da expressão do PAPP-A (Proteína-A plasmática associada a gravidez) (SUDO, *et al.*, 2007; RIVERA e FORTUNE, 2003), ser um fator importante na sobrevivência celular, inibindo a apoptose por diferentes vias (CHUN, *et al.*; 1996; CAO, *et al.*; 2006)

A expressão do RNAm para P450scc, P450c17 e rLH podem estar envolvidos no processo de recrutamento e seleção do folículo dominante (TIAN, *et al.*, 1995), os quais são observados nas células das hemisseções antes e após 48 horas de cultivo no meio  $\alpha$ -MEM, porém estão aparentemente diminuídos nas hemisseções cultivadas no meio TCM. Há evidências que a síntese de andrógenos pelas CT é crítico para a continuidade do crescimento do folículo dominante até pré-ovulatório, principalmente a androstenediona, uma vez que além de servir como substrato para a produção de estradiol pelas CG ele também é capaz de aumentar a expressão da P450 aromatase nessas células (TIAN, *et al.*, 1995; HAMEL, *et al.*; 2005), de modo que a presença deste no meio  $\alpha$ -MEM é um fator favorável à manutenção da atividade esteroidogênica observada nas células das hemisseções cultivadas neste meio.

Bao e colaboradores (1997a, b) investigaram a expressão das proteínas e RNAm dos receptores de gonadotrofinas e enzimas da esteroidogênese em células de folículos ovarianos bovinos e sua correlação com o recrutamento, seleção e dominância folicular e verificou que o recrutamento está associado com a expressão simultânea do RNAm da P450scc e P450 arom, e que a continuidade da sua expressão por tempo superior a 24 horas após início da onda folicular só é

observada em folículos saudáveis que continuaram a crescer. Já a seleção do folículo dominante parece ocorrer entre 36-48 horas após início da onda folicular e está associada com a expressão do rLH e da enzima  $3\beta$  hidroxidesidrogenase nas CG e só ocorre em folículos com alta expressão da P450scc e P450 aromatase. O folículo dominante mantém alta expressão do RNAm de rLH e P450scc nas CT e rFSH e P450 aromatase nas CG.

Tendo em vista este padrão de expressão das enzimas da esteroidogênese ao longo da dinâmica folicular, o nosso trabalho procura verificar a continuidade da expressão dessas enzimas nas hemisseções foliculares após cultivo em meio definido e livre de soro,  $\alpha$ -MEM e em meio complexo acrescido de soro, TCM. Ao verificar que as hemisseções cultivadas no meio  $\alpha$ -MEM mantiveram a expressão das enzimas da esteroidogênese ao longo das 48 horas de cultivo, ao contrário das hemisseções cultivadas no meio TCM, onde a expressão parece diminuir ao longo do tempo, sugerimos que o meio  $\alpha$ -MEM oferece condições favoráveis à continuidade da diferenciação dessas células em direção à seleção e estabelecimento da dominância folicular, podendo simular um ambiente semelhante à fase folicular do ciclo.

A expressão das enzimas da via esteroidogênese é compatível com a concentração dos hormônios estradiol e progesterona produzidos pelas hemisseções após cultivo nos meios  $\alpha$ -MEM e TCM por até 48 horas.

#### **Aspectos morfológicos das células da hemisseção após cultivo em meio $\alpha$ -MEM e TCM.**

Este trabalho compara as características morfológicas das células de hemisseções de folículo ovariano bovino cultivadas em meios de cultura distintos, em condições nas quais as funções celulares normais são mantidas em um meio e perdidas em outro.

As células das hemisseções cultivadas no meio definido e livre de soro, aqui denominado como  $\alpha$ -MEM, mantiveram a morfologia das CG semelhantes àquela das células *in vivo*; apresentando-se arredondadas e com núcleo ocupando grande área, o que garante baixa razão citoplasma:núcleo (GUTIERREZ, *et al.*; 1997b), estes resultados são condizentes com aqueles encontrados na monocultura de CG em meio  $\alpha$ -MEM em trabalho desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa (PICCINATO, 2002).

Além de oferecer condições que favorecem a manutenção da morfologia das células semelhante às CG de folículos antrais, após o cultivo, este sistema também permitiu uma ampla expressão de junções comunicantes e manutenção da produção de estradiol ao longo do tempo de cultura, semelhantemente aos resultados encontrados para cultura isolada de CG de folículo ovariano bovino desenvolvido por Gutierrez *et al.*, (1997b), no qual puderam observar que as células se organizavam em clusters e a interação célula-célula mediada por junções comunicantes estava envolvida com a prevenção da luteinização, provavelmente por favorecer a manutenção da atividade da enzima aromatase e consequentemente da produção de estradiol ao longo do tempo de cultura.

Em contraste, as células das hemisseções cultivadas no meio complexo TCM, adquiriram forma alongada e aspecto semelhante a fibroblastos, características que junto ao declínio na produção de estradiol e aumento expressivo da síntese de progesterona ao longo do tempo de cultura está associado à presença do soro fetal e ao acréscimo de grande quantidade do hormônio FSH neste meio de cultura e são compatíveis com o processo de luteinização (GONG, *et al.*, 1994).

As CG ao serem cultivadas em meio acrescido de soro ou quantidades supra fisiológica de FSH adquirem morfologia e organização distinta da observada *in vivo* e formam uma monocamada de células alongadas aderidas à placa de cultura. Essa alteração na morfologia e interação celular envolve uma reorganização da actina que constitui o citoesqueleto em resposta a vários sinais extracelulares (GRIESHABER, *et al.*; 2000). Trabalhos demonstram que o FSH é capaz de causar um desarranjo na organização das fibras de actina, ocasionando um colapso nessa rede e induzindo a formação de lamelipodia (protrusão em forma de escamas) e filopodia (projeções afinadas), o que resulta em drástica alteração da morfologia e interação célula-célula, via ativação da adenilato ciclase e aumento do AMPc intracelular, o qual ativa a PKA (fosfoquinase A) que fosforila proteínas estruturais, enzimas e fatores de transcrição (GRIESHABER, *et al.*; 2000; BEN-ZE'EV AND AMSTERDAM, 1987).

Já é bem caracterizado o efeito da elevação da produção do AMPc sobre a expressão fenotípica e diferenciação das CG em células lúteas (KNECHTT, *et al.*; 1981) no entanto os mecanismos pelos quais o AMPc influencia a diferenciação celular ainda são pouco conhecidos e carecem de mais investigações.

### **Expressão da conexina 43 na hemisseção folicular após cultivo em meio $\alpha$ -MEM e TCM.**

Utilizando a hemisseção de folículo ovariano bovino foram testados dois meios de cultura distintos quanto a sua capacidade de manter a expressão da proteína conexina 43 nas células somáticas do folículo. Após o cultivo das hemisseções foliculares em meio definido  $\alpha$ -MEM ou meio complexo TCM ficou nítida a regulação diferenciada da expressão da Cx 43 por estes meios. Enquanto o meio definido propiciou condições favoráveis ao aumento da imunomarcação da proteína nas CG ao longo do tempo de cultura, no meio complexo obteve-se o contrário, um drástico declínio da expressão Cx43, além da nítida alteração morfológica das células.

O aumento da expressão da Cx43 em CG de folículos primários está associado com a ativação deste folículo para o desenvolvimento e com os primeiros passos na diferenciação dessas células (MELTON, *et al.*, 2001). Um estudo de Juneja e colaboradores (1999) sugere que a Cx43 desempenha papel importante durante o desenvolvimento gonadal de camundongos. Camundongos transgênicos sem Cx43, apresentam ovários pequenos e deficientes em células germinativas, fato que pode ser decorrente da perda das junções comunicantes entre células somáticas e as células germinativas primordiais. Logo, a expressão da proteína Cx43 é requerida para se ter um desenvolvimento ótimo das células germinativas e formação do folículo primordial.

Em bovinos, é possível observar a expressão da Cx43 nas CG de folículos primordiais e essa expressão aumenta ao longo do desenvolvimento folicular e formação do antro (NUTTINCK, *et al.*; 2000).

Tanto bovinos quanto suínos e camundongos, seguem um padrão de expressão do RNAm para Cx43, a qual aumenta com a ativação do desenvolvimento folicular e diferenciação das células escamosas do folículo primordial em CG cuboidais dos folículos primários. Com a continuidade do desenvolvimento folicular, os folículos primários e secundários expressam RNAm da Cx43 e sua proteína nas camadas de CG, indicando que as junções comunicantes constituídas por Cx43 são formadas entre as CG de folículos preantrais em desenvolvimento (JONHSON, *et al.*; 1999; TEILMANN, 2005).

Até pouco tempo os mecanismos de desenvolvimento folicular permaneciam pouco compreendidos devido à ausência de um indicador confiável da sua iniciação. Esse processo é comumente monitorado pelas alterações morfológicas, como crescimento do ovócito e transição das CG escamosas para células cuboidais e proliferação celular (HIRSHFIELD, 1991). Recentemente, além desses indicadores morfológicos, outro aspecto da diferenciação das CG está sendo utilizado como marcador da ativação do desenvolvimento folicular: o aumento da transcrição do gene e da expressão de Cx43 nas CG. Trabalhos realizados com suínos demonstram que CG e CT de folículos antrais expressam quantidades abundantes do RNAm e da proteína Cx43 (ITAHANA, *et al.*; 1996), o que sugere que a comunicação entre CG e da teca em folículos antrais é parcialmente mediado pela junção comunicante constituída por Cx43.

A expressão das proteínas conexinas é regulada tanto pelas gonadotropinas quanto por hormônios esteróides, e essa regulação ocorre de maneira diferente dependendo do tipo celular e do tipo de conexina expressa; ou seja, um hormônio pode ter diferentes efeitos sobre o mesmo tipo de conexina em diferentes tipos celulares. Agentes que elevam a concentração intracelular de AMPc podem levar à ativação da fosfoquinase A (PKA) as quais possuem potencial para aumentar a fosforilação das Cx43, o tamanho e número de junções comunicantes, decorrentes de aumento na síntese e transporte dos conexons até a membrana plasmática (LAMPE e LAU, 2004). O FSH, por exemplo, tem seu efeito bem estabelecido na literatura como estimulador da expressão do RNAm e da proteína Cx43 nas CG de mamíferos, além de ter ação hiperfosforilação da Cx43, por estimulação de PKA dependentes de AMPc, correlacionado com o acúmulo de junções comunicantes e aumento de eficiência da comunicação celular (YOGO, *et al.*; 2002).

O estradiol constitui um outro fator capaz de estimular a expressão da Cx43 nas CG (SCHREIBER, *et al.*; 1993). Sullivan *et al.*(1993) identificaram um sítio de iniciação transcricional da Cx43 em genes de camundongos, e mostraram que este sítio é regulado por um elemento responsivo ao estrógeno (CRE) (SÁEZ, *et al.*; 2003). Há a hipótese que o efeito estimulador do estrógeno ocorra indiretamente através da produção de *c-fos*, o qual interagem com o sítio AP-1 (proteína-1 ativadora) adjacente ao CRE ativando o promotor (PIERSANTI, *et al.*; 1995).

Enquanto o FSH e o estradiol estimulam a expressão de RNAm e da proteína Cx43, o LH e a progesterona tem efeito inibidor nas CG. O efeito inibitório do LH sobre a expressão da Cx43 fica evidente com a drástica redução da proteína nas CG de folículo preovulatório após o pico de LH.

Estudos de Kalma e colaboradores (2004), sugerem que o LH regule para cima a expressão do gene que codifica uma proteína que se liga ao RNAm da Cx43, impedindo a sua tradução. A via adenil ciclase/AMPC/PKA é aceita como a principal sinalizadora da cascada através do qual o LH exerce sua ação. Através da interação do LH com seu receptor acoplado à proteína-G há aumento do AMPC seguido da ativação do PKA. Além da via do PKA, uma outra via bem estabelecida como mediadora da sinalização de gonadotropinas nos ovários são os membros da família das MAPK como as ERK 1/2. A ativação da MAPK, ERK1/2, é independente da via PKA, e provavelmente ambas são ativadas paralelamente na mediação dos efeitos do LH sobre a inibição da tradução da proteína Cx43 (PROCHÁZKA, *et al.*, 2007). Já a progesterona suprime parcialmente o efeito estimular que o estradiol exerce sobre a expressão da Cx43 nas CG, e esse efeito pode ser mediado tanto via receptores de progesterona quanto via receptores de glicocorticóides (RISEK, *et al.*; 1995).

Já é bem demonstrada em diferentes tipos celulares de vários organismos que as junções comunicantes exercem efeito negativo sobre a apoptose, e especificamente a expressão da Cx43 está inversamente correlacionada, agindo de fato como um fator de sobrevivência para as células (GERSHON, *et al.*, 2008). Sasson e Amsterdam (2003) observaram que a dexametasona, um glicocorticóide, previne a apoptose em CG de camundongos e aumenta o número de Cx43. Assim, o processo de atresia é um fator que altera a comunicação célula-célula via junções comunicantes, já que RNAm da Cx43 não é detectada em folículos atrésicos (NUTTINCK, *et al.*, 2000), o que pode estar relacionado com baixa relação estradiol – progesterona (WIESEN and MIDGLEY, 1993), sugerindo que a Cx43 exerce papel importante na sobrevivência das CG (KRYSKO, 2004). A integridade da comunicação intracelular desempenha papel protetor contra o processo de apoptose mediado pela ativação da caspase-3, clivagem e ativação de via modulada pela granzime B (SASSON and AMSTERDAM, 2003), e sobre o efeito lesivo decorrente da oxidação provocada pelo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (GIARDINA, *et al.*; 2007).

O presente estudo demonstra que a expressão da proteína Cx43 na hemissecção de folículos antrais saudáveis, 5mm diâmetro, pode ser regulada e alterada de acordo com o meio no qual é cultivada.

No meio definido, desenvolvido por nosso laboratório, e denominado  $\alpha$ -MEM foi possível observar aumento progressivo da imunomarcção para Cx43 nas CG de hemissecções foliculares cultivadas no meio definido; essa manutenção da expressão da Cx43 nas CG pode ter sido decorrente da regulação sobre a via da esteroidogênese que este meio exerce sobre as CG, induzindo-as a manter uma relação estradiol-progesterona (E2/P4) mais elevada quando comparado ao meio complexo. A manutenção da expressão da Cx43 pelas CG das hemissecções cultivadas no meio  $\alpha$ -MEM, também nos leva a sugerir que este meio é capaz não só de manter a sobrevivência celular como neste sistema de cultivo a hemissecção expressa características representativas de folículo em desenvolvimento.

Já, a deficiente expressão da Cx43 nas hemissecções foliculares cultivadas no meio complexo TCM, pode ser decorrente da elevada produção de progesterona detectada neste meio, que pode ser explicada pela luteinização destas células.

## 7. CONCLUSÃO

Os Sistemas de cultura com meio TCM apresentaram elevada concentração de P4 com 24 horas, e aumento progressivo da secreção deste hormônio no cultivo com 48 horas, redução da luminosidade das bandas das enzimas da esteroidogênese ( P450scc, arom, 17bHSD, 3bHSD) e do receptor do FSH após cultivo de 48 horas, além de alteração da morfologia celular a qual adquire forma semelhante a fibroblastos e perda da comunicação célula-célula evidenciada pela ausência da imunomarcagem para Cx43 nas células foliculares; resultados que indicam luteinização celular, que podem ser decorrentes do uso do soro fetal bovino e elevadas concentração de FSH utilizado neste meio.

Os sistemas de cultura que utilizaram o meio definido a-MEM puro ou acrescido de FSH em concentração fisiológica, mostra habilidade deste meio em manter atividade esteroidogênica ao longo do tempo de cultura, com menor secreção de P4 do que a obtida no meio indefinido, que não se altera ao longo da cultura, manutenção da expressão das enzimas da esteroidogênese após 48 horas de cultivo, além de conservar a característica morfológica das células semelhantes às obtidas *in vivo* e elevada expressão da proteína Cx43, resultados semelhantes àqueles obtidos com outros sistemas de cultivo livre de soro, e deixa evidente a capacidade do meio em manter as células foliculares *in vitro* com comportamento semelhante àquele de células de folículos saudáveis e em desenvolvimento. No meio a-MEM acrescido com FSH foi evidente o efeito estimulante sobre atividade esteroidogênica das células somáticas quando utilizado em dose fisiológica, por estimular a P450 aromatase e prevenir morte celular.

## 8 REFERÊNCIAS

ADAMS, G.P.; JAISWAL, B.; SINGH, J.; MALHI, P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, vol. 69, n. 1, p. 72- 80, 2008.

ALLEGRUCCI, C.; HUNTER, M.G.; WEBB, R.; LUCK, M.R. Interaction of bovine granulosa and theca cells in a novel serum-free co-culture system. **Reproduction**, vol. 126, p. 527-538, 2003.

ARMSTRONG, D.G; WEBB, R. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. **Reviews of Reproduction**, vol. 2, p. 139-146, 1997.

ARMSTRONG DG, BAXTER G, GUTIERREZ CG, HOGG CO, GLAZYRIN AL, CAMPBELL BK, BRAMLEY TA, WEBB R. Insulin-like growth factor binding protein - 2 and -4 messenger ribonucleic acid expression in bovine ovarian follicles: effect of gonadotropins and developmental status. **Endocrinology**, vol. 139, p.2146–2154, 1998.

BAO, B., GARVERICK, H.A, SMITH, G.W., SMITH, M.F., SALFEN, B.E.; YOUNGQUIST, R.S. 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** vol.56, p. 1158-1168, 1997.

BAO, B; GARVERICK, SMITH, G.W; H.A; SMITH, M.F; BRENT, E.; SALFEN, B.E; YOUNGQUIST, R.S. Expression of Messenger Ribonucleic Acid (mRNA) Encoding 3,-Hydroxysteroid Dehydrogenase A 4,A 5 Isomerase (3HSD) during Recruitment and Selection of Bovine Ovarian Follicles: Identification of Dominant Follicles by Expression of 3P-HSD mRNA within the Granulosa Cell Layer. **Biology of Reproduction**, vol. 56, p.1466-1473, 1997.

BAO, B; CALDER, M.D; XIE, S.; SMITH, M.F; SALFEN, B.E; YOUNGQUIST, R.S; GARVERICK, H.A. Expression of Steroidogenic Acute Regulatory Protein Messenger Ribonucleic Acid Is Limited to Theca of Healthy Bovine Follicles Collected during Recruitment, Selection, and Dominance of Follicles of the First Follicular Wave1. **Biology of Reproduction**, vol. 59, p. 953-959, 1998.

BHATIA, B.; PRICE, C.A. Insulin alters the effects of follicle stimulating hormone in bovine granulosa cells in vitro. **Steroids**, vol. 66, p. 511-519, 2001.

BEG, M.A.; GINTHER, O.J.; Follicle selection in catthe and horses: role of intrafollicular factors. **Reproduction Review**, vol. 132, p. 365-377, 2006.

BEN-ZE'EV, A.; AMSTERDAM, A. In vitro regulation of granulosa cell differentiation: involvement of cytoskeletal protein expression. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 262, n. 11, p. 5366-5376, 1987.

BERNDTSON, A.K., VINCENT, S.E., FORTUNE, J.E. Low and high concentrations of gonadotropins differentially regulate hormone production by theca interna and granulosa cells from bovine preovulatory follicles. **Biology of Reproduction**, vol. 52, p. 1334–1342, 1995.

BERNDTSON, A.K., WEAVER, C.J., FORTUNE, J.E. Differential effects of oxytocin on steroid production by bovine granulosa cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, vol. 116, p. 191–198, 1996.

BERTAN; C.M; BINELLI, M; MADUREIRA, E. H; TRALDI, A.S. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise Revisão de literatura. **Brazilian Journal of veterinary animal Science**, vol.43, n.6, p. 824-840, 2006.

BIGGERS, JD; SUMEMERS, MC; MCGINNIS, LK. Polyvinil alcohol and aminoacids as substitutes for bovine serum albumin in culture media for mouse preimplantation embryos. **Human Reproductive Update**, vol. 3, p. 125-135, 1997.

BOSC M.J, AGNÉS NICOLLE. Steroid Productions by Co-cultures of Granulosa Cells with Inner and Outer Theca Cells in Preovulatory Follicles of Gonadotropin Stimulated Calves. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, vol.62,n.2/3,213-221, 1997.

BRAW-TAL, R. AND ROTH, Z. Gene expression for LH receptor, 17 $\alpha$ -hydroxylase and StAR in the theca interna of pré-antral and early antral follicles in the bovine ovary. **Reproduction**, vol.129, p. 453–461, 2005.

BRIDGES, P.J. AND J.E. FORTUNE. Characteristics of developing prolonged dominant follicles in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, vol. 25, p.199-214, 2003.

BURATINI, J.J. Controle endócrino e local da foliculogênese em bovinos. Endocrine and local control of folliculogenesis in cattle. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, vol. 31, n. 2, p.190-196, 2007.

CAMPBELL, B. K.; SCARAMUZZI, R.J.; WEBB, R. Induction and maintenance of oestradiol and immunoreactive inhibin production with FSH by ovine granulosa cells cultured in serum-free medium. **Journal of Reproduction and Fertility**, vol. 106, p.7-19, 1996.

CAO, M.; NICOLA, E.; PORTELA, V.M.; PRICE, C.A. Regulation of serine protease inhibitor-E2 and plasminogen activatorexpression and secretion by follicle stimulating hormone and growth factors in non-luteinizing bovine granulosa cells in vitro . **Matrix Biology**, vol. 25, p. 342 – 354,2006.

CHUN, S.Y.; EISENHAEUER, K.M.; MINAMI, S.; BILLIG, G.A.; PERLAS, E.; HSUEH, A.J.W. Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: Follicle-Stimulating

Hormone as a major survival factor. **Endocrinology**, vol.137, n. 4, p. 1447 – 1456, 1996.

COLLARES, C.V.A. ; ROSA E SILVA, A. A. M. . Granulosa cells culture in chemically defined medium: Is there mimicry between those cells and the cells of dominant follicle and/or preovulatory follicle. **Biology of Reproduction**, 68: 319-320, 2003.

CROWE, M.A. Gonadotrophic control of terminal follicular growth in catte. **Reproduction of Domestic Animal**, vol. 34, p. 157-166, 1999.

DORRINGTON JC, ARMSTRONG DT. Effects of FSH on gonadal functions. **Recent Progress in Hormone Research**, vol.35, p. 301-311, 1979.

EPPIG J.J. Oocyte-somatic cell communication in the ovarian follicles of mammals. **Seminars in Developmental Biology**, vol. 5, p. 51-59, 1994.

ERICKSON G.F, MAGOFFIN D.A, DYER C.A AND HOFEDITZ The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. **Endocrine reviews**, vol. 6, p.371-399, 1985.

FITZPATRICK, S.L; CARLONE, D.L.; ROBKER, R.L. RICHARDS, J.S. Expression of aromatase in the ovary: down regulation of mRNA by ovulatory luteinizing hormone surge. **Steroids**, vol. 62, n.1, p. 197-206, 1997.

FORTUNE J. E, Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, vol. 50, p. 225-232, 1994.

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G.M.; KOMAR, C.M. Selection and differentiation of dominant ovarian follicles in cattle. In: Rosa e Silva, A. A. M, BR **Monographs of Reproduction and Catalog group**, 1ªedição, São Paulo: Arte & Ciência, cap.1, p. 21-38, 2001.

FORTUNE, J E; RIVERA; YANG, MY. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**. Vol. 82-83: 109-126, 2004.

GARMEY, J. C., GUTHRIE H. D., GARRETT,W. M., STOLER, M. H.; VELDHUIS, J. D. Localization and expression of low-density lipoprotein receptor, steroidogenic acute regulatory protein, cytochrome P450 side-chain cleavage and P450 17- $\alpha$ -hydroxylase/C17–20 lyase in developing swine follicles: in situ molecular hybridization and immunocytochemical studies. **Molecular and Cellular Endocrinology**, vol. 170, Issues 1-2, p. 57-65, 2000.

GERSHON, E.; PLAKS, V.; DEKEL, N. Gap junctions in the ovary: Expression, localization an function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, vol. 282, p. 18-25, 2008.

GIARDINA, S.F.; MIKAMI, M.; GOUBAEVA, F.; YANG, J. Connexin 43 confers resistance to hydrogen peroxide-mediated apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 362, p. 747-752, 2007.

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R., KOT, K. Selection of the dominant follicle in Cattle: role of two-way functional coupling between follicle-stimulating hormone and the follicle. **Biology of Reproduction**, vol. 62, p. 920-927, 2000.

GINTHER, O.J., BERGFELT, D.R., BEG, M.A., MEIRA, C., KOT, K. In vivo effects of na intrafollicular injection of insulin-like growth factor 1 on the mechanism of follicle deviation in heifers and mares. **Biology of Reproction**. Vol. 70, p. 99-105, 2004.

GONG, JG; MCBRIDGE, D; BRAMLEY, TA; WEBB, R. Effects of recombinant bovine somatotrophin, Insulin like growth factor1 and insulin on bovine granulosa cells steroidogenesis *in vitro*. **Journal of Endocrinology**, vol.143, p. 157-164, 1994.

GORE-LANGON, R AND ARMSTRONG, D.T. Follicular Steroidogenesis and its control. In Knobil, E.; Neill, J.D, **The Fisiology of Reproduction**, 2<sup>o</sup> edição, New York: Raven Press, cap.11, pagina 571 – 627, 1993.

GUTIÉRREZ, CA; CAMPBELL, BK; WEBB, R. Development of a Long-Term bovine Granulosa Cell Culture System: Induction and Maintenance of Estradiol Production, Response to Follicle Stimulate Hormone, and Morphological Characteristics. **Biology of Reproduction**, vol. 56, p. 11-20, 1997.

GUTIÉRREZ, C.G; GLAZYRIN, A.L.; ROBERTSON, G.W.; CAMPBELL, B.K.; GON, J.G.; BRAMLEY, T.A.; WEBB, R. Ultra-structural characteristics of bovine granulose cells associated with maintenance of oestradiol production in vitro. **Molecular and cellular endocrinology**, vol. 134, p. 51-58, 1997.

GRIESHABER, N.A.; BOITANO, S.; JI, I.; MATHER, J.P.; JI, T.H. Differentiation of granulosa cellll line: follicle-stimulation hormone induces formation of lamellipodia and filopodia via the adenylyl cyclase/cyclic adenosine monophosphate signal. **Endocrinology**, vol. 141, n.9, 2000.

HAMEL, M., VANSELOW, J., NICOLA, S.S., PRICE, C.A. Androstenedione increases cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid transcripts in nonluteinizing bovine granulose cells. **Molecular Reproduction Development**, n. 70, p. 175 – 183, 2005.

HANUKOGLU, I.; RAPOPORT, R.; WEINER, L; SKLAN, D. Electron leakage from the mitochondrial NADPH- Adrenodoxin Reductase-Adrenodoxin-P450scc (Cholesterol Side Chain Cleavage) System. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol.305; n. 2, p. 489-498, 1993.

HANUKOGLU I. Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. **Journal of Steroid Biochemical Molecular Biology**, vol. 43, p. 779-804, 1992.

HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovary. **International Review of cytology**, vol. 124, p. 43-99, 1991.

HSUEH, A.J.W.; MCGEE, E.A.; HAYASHI, M.; HSU, S.Y. Hormonal regulation of early follicle development in the rat ovary. **Molecular and Cellular Endocrinology**, vol.163, p. 95 – 100, 2000.

ITAHANA, K.; MORIKAZU, Y.; TAKEYA, T. Differential expression of four connexin genes, Cx-26, Cx-30, Cx-32 and Cx – 43 in the porcine ovarian follicle. **Endocrinology**, vol. 137, p. 5036-5044, 1996.

JUNEJA, S.C., BARR, K.J., ENDERS, G.C., KIDDER, G.M. Defects in the germ line and gonads of mice lacking Cx43. **Biology of Reproduction**, vol. 60, p. 1263-1270, 1999.

JOHNSON, M.L., REDMER, D.A., REYNOLDS, L.P., GRAZUL-BILSKA, A.T. Expression of gap junctional proteins connexin 43, 32, and 26 throughout follicular development and atresia in cows. **Endocrine**, vol. 10, p. 43–51, 1999.

JOHNSON, M.L., REDMER, D.A., REYNOLDS, L.P., BILSKI, J.J., GRAZUL-BILSKA, A.T. Gap junctional intercellular communication of bovine granulosa and thecal cells from antral follicles: effects of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone. **Endocrine**, vol. 18, p. 261–270, 2002.

KALMA, Y.; GRANOT, I.; GALIANI, D.; BARASH, A.; DEKEL, N. Luteinizing hormone-induced connexin 43 down-regulation: Inhibition of translation. **Endocrinology**, vol. 145, n. 4, p. 1617-1624, 2004.

KNECHTT, M.; AMSTERDAM, A.; CATT, K. The regulation role of cyclic AMP in hormone induced of granulosa cell differentiation. **The Journal of Biological Chemistry**, vol.256, n. 20, p. 10628-10633, 1981.

KOTSUJI F, KAMITANI N, GOTO K, TOMINAGA T., Bovine theca and Granulosa Cell Interactions Modulate Their Growth, Morphology, and Function. **Biology of Reproduction**, vol. 43, p. 726-732, 1990.

KRYSKO, D.V.; MUSSCHE, S.; LEYBAERT, L.; D'HERDE, K. Gap junctional communication and connexin 43 expression in relation to apoptotic cell death and survival of granulosa cells. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, vol. 52, p. 1199-1207, 2004.

LABRIE F.; LUU-THE, V; LIN, S-X; LABRIE, C.; SIMARD, J; BRETON, R.; BRLANGER, A. The key role of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology. **Steroids**, vol.62, p.148-158, 1997.

LAMPE, P.D.; LAU, A.F. The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, vol. 36, p. 1171-1186, 2004.

LANDSCHULZ, K. T., PATHAK R K., RIGOTTI A, KRIEGER M, HOBBS H. H. Regulation of Scavenger Receptor, Class B, Type I, a High Density Lipoprotein Receptor, in Liver and Steroidogenic Tissues of the Rat. **Journal of Clinical Investigation**, vol. 98, n.4, p. 984-995, 1996.

LIN, S.X.; SHI, R.; QIU, W.; AZZI, A.; ZHU, D.W.; AI DABBAGH, H.; ZHOU, M. Structural basis of the multispecificity demonstrated by 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 5. **Molecular and Cellular Endocrinology**, vol. 248, p. 38 – 46, 2006.

LUU-THE, V. Analysis and characteristics of multiple types of human 17 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase. **Journal of Steroid Biochemical Molecular Biology**, vol. 76, p. 143–151, 2001.

LUSSIER J.G., MATTON P., DUFOUR J.J, Growth rates of follicles in the ovary of the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, vol. 81, p.1121-1128, 1987.

MARIANA J.C, MONNIAUX D, DRIANCOURT M.A, MAULÉON P.,Folliculogenesis. **Reproduction in Domestic Animals**, Chap.4, ed. P.T. Cupps. Academic Press, New York, p. 119-171, 1991.

MARTIN, T.L., FOGWELL, R.L., IRELAND, J.J. Concentrations of inhibins and steroids in follicular fluid during development of dominant follicles in heifers. **Biology of Reproduction**; vol. 44, p. 693-700, 1991.

MAZERBOURNG, S.; OVERGAARDM, M.T.; OXVIG, C.; CHRISTIANSEN, M.; CONOVER, C.A.; LAURENDEAU, I.; VIDAUD, M.; TOSSER-KLOPP, G.; ZAPF, J.; MONGET, P. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) in ovine, ovarian follicles: involvement in IGFBP-4 proteolytic degradation and mRNA expression during follicular development. **Endocrinology**, vol. 142, p. 5243 -5253, 2001.

MARSTERS, P.; KENDALL, N.R.; CAMPBELL, B.K. Temporal relationships between FSH receptor, type 1 insulin-like growth factor receptor, and aromatase expression during FSH-induced differentiation of bovine granulosa cells maintained in serum-free culture. **Molecular and Cellular Endocrinology**, vol. 203, p. 117-127, 2003.

MCGEE, E.A; HSUEH, A.J.W. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrine Reviews**, vol. 21, n. 2, p. 200-214, 2000.

MEDURI, G.; CHARNAUX, N.; DRIANCOURT, M.A.; COMBETTES, L.; GRANET, P.; VANNIER, B. Follicle Stimulating Hormone receptors in oocytes? **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, vol.97, p. 2266-2276, 2002.

MELTON, C.M.; ZAUNBRECHER, G.M.; YOSHIZAKI, G.; PATIÑO, R.; WHISNANT, S.; RENDON, A.; LEE, V.H. Expression of connexin 43 mRNA and protein in developing follicles of prepubertal porcine ovaries. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Vol. 130, n.1, p. 43 – 55, 2001.

MILLER, W. L. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. **Biochimica et Biophysica Acta** , vol. 1771, p. 663–676, 2007.

MINEGISHI, T.; HIRAKAWA, T.; KISHI, H.; ABE, K.; ABE, Y.; MIZUTANI, T.; MIYAMOTO, K. A Role of Insulin-Like Growth Factor I for Follicle-Stimulating

Hormone Receptor Expression in Rat Granulosa Cells. **Biology of Reproduction**, vol. 62, p. 325-333, 2000.

MINGOTI, G. Z. ; GARCIA, J. M. ; ROSA E SILVA, A. A. M. . Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus-oocyte-complexes matured in vitro with BSA and different concentrations of steroids. **Animal Reproduction Science**, 69: 175-186, 2002.

MONTREZOR, L.H. Esteroidogênese em ovários bovinos: Estudo in vitro dos efeitos da endotelina-1, angiotensina-II e peptídeo natriurético atrial na dominância e atresia de CG produtoras de estradiol. 2002. Tese - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

MONTREZER, L.H.; PICCINATO, CA.; ROSA E SILVA, AAM. Polyvinyl Alcohol is Effective in a Defined Media Long-Term Bovine Granulosa Cell Culture in the Maintenance of 17 $\beta$ -estradiol Production. **Biology of Reproduction**, vol.66, n.1, p. 211 (2002).

MONGET, P.; FABRE, S.; MULSANT, P.; LECERF, F.; ELSEN, J.; MAZERBOURN, S.; PISSELET, C.; MONNIAUX, D. Regulation of ovarian folliculogenesis is by IGF and BMP system in domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, vol.23, p. 139-154, 2002.

MUSIL, L.S.; GOODENOUGH, D.A. Biochemical analysis of connexin 43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. **The Journal of cell biology**, vol. 115, n. 5, p. 1357-1374, 1991.

NUTTINCK F.; PEYNOT N.; HUMBLLOT P.; MASSIP A.; DESSY F.; FLECHON J. E. Comparative immunohistochemical distribution of connexin 37 and connexin 43 throughout folliculogenesis in the bovine ovary. **Molecular reproduction and development** , vol. 57, n. 1, p. 60-66, 2000.

OJEDA, S.R. Female Reproductive Function. In: Griffin, J.E., Ojeda, S.R. (eds), **Textbook of Endocrine Physiology**, 3<sup>rd</sup> Edition. New York: Oxford University Press; p.165-200, 1996.

PARROTT J.A., SKINNER, M.K. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Endocrinology**, vol. 140, p. 4262-4271, 1999.

PIERSANT, M. AND LYE, S.J. Increase in messenger ribonucleic acid encoding the myometrial gap junction protein, connexin-43, requires protein synthesis and is associated with increased expression of the activator protein-1, c-fos. **Endocrinology**, vol.136, p. 3571-3578, 1995.

PAUL, D.L. New functions for gap junctions. **Current Opinion in Cell Biology**, vol. 7, n.5, p. 665-672, 1995.

PICCINATO, C.A. Efeito In Vitro de catecolaminas em CG de folículos ovarianos bovinos, produtoras de 17 $\beta$ -estradiol. 2002. Dissertação - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - UNESP.

PICTON, H.M. Activation of follicle development: The primordial follicle. **Theriogenology**, vol. 55, p. 1193-1210, 2001.

PROCHÁZKA, L.; TURÁNEK, J.; TESARÍK, R.; KNOTIGOVÁ, P.; POLÁSKOVÁ, P.; ANDRYSÍK, Z.; KOZUBÍK, A.; ZÁK, F.; SOVA, P.; NEUZIL, J.; MACHALA, M. Apoptosis and inhibition of gap-junctional intercellular communication induced by LA-12, a novel hydrophobic platinum (IV) complex. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol. 462, p. 54-61, 2007.

RIVERA, G.M.; FORTUNE, J.E. Selection of the Dominant Follicle and Insulin-Like Growth Factor (IGF)-Binding Proteins: Evidence that Pregnancy-Associated Plasma Protein A Contributes to Proteolysis of IGF-Binding Protein 5 in Bovine Follicular Fluid. **Endocrinology**, vol. 144, p. 437 – 446, 2003.

RISEK, B.; KLIER, G.; PHILLIPS, A.; HAHN, D.W.; GILULA, N.B. Gap junction regulation in the uterus and ovaries of immature rats by estrogen and progesterone. **Journal of cell Science**, vol. 108, p. 1017 – 1032, 1995.

ROBERTS, AJ; ECHTERNKAMP, SE. *In vitro* production of Estradiol by bovine granulosa cells evaluation of culture conditions, stage of follicular development, and location of cells within follicles. **Biology of Reproduction**, vol.51, p. 273-282, 1994.

ROULLIER, P; MATTON, P; DUFOUR, MP; SIRARD, MA; GUILBAULT, LA. Steroid production, cell proliferation, and apoptosis in culture bovine antral and granulosa cells: development of an *in vitro* model to study Estradiol production. **Molecular Reproduction and Development**, vol.50, p. 170-177, 1998.

ROSA E SILVA, A. A. M. ; PICCINATO, C. A. ; MONTREZOR, L. H. Polyvinyl alcohol is effective in a defined media long-term bovine granulosa cell culture in the maintenance of 17 beta-estradiol production. In: SSR Society for the Study of Reproduction, 2002, Baltimore, 2002.

SÁEZ, J.C.; BERTHOUD, V.M.; BRAÑES, M.C.; MARTÍNEZ, A.D.; BEYER, E. Plasma membrane channels formed by connexins: Their Regulation and functions. **Physiology review**, vol. 83, p. 1359-1400, 2003.

SASSON, R., AMSTERDAM, A. Pleiotropic anti-apoptotic activity of glucocorticoids in ovarian follicular cells. **Biochemical Pharmacology**, vol. 66, p. 1393–1401. 2003.

SAHMI, M.; NICOLA, E.S., SILVA, J.M.; PRICE C.A. Expression of 17 $\alpha$ - and 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenases and steroidogenic acute regulatory protein in non-luteinizing bovine granulosa cells in vitro. **Molecular and Cellular Endocrinology**, vol. 223, p. 43–54, 2004.

SALHA, O; ABUSHEIKA, N; SHARMA, V. Dynamics of human follicular growth and in vitro oocyte maturation. **Human Reproduction Update**, vol.4, p. 816-32, 1998.

SCHREIBER, J. R.; BECKMANN, M. W.; POLACEK, D.; DAVIES, P. F. Changes in Gap Junction Connexin-43 Messenger Ribonucleic Acid Levels Associated With Rat Ovarian Follicular Development as Demonstrated by In Situ Hybridization. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**. Vol. 168, n.4, p. 1094-1104, 1993.

SILVA, J.M.; PRICE, C.A. Effect of Follicle-Stimulating Hormone on Steroid Secretion and Messenger Ribonucleic Acids Encoding Cytochromes P450 Aromatase and Cholesterol side-chain Cleavage in Bovine Granulosa cells *in vitro*. **Biology of Reproduction**, vol. 62, p.186-191, 2000.

SILVA, J.M.; PRICE, C.A. Insulin and IGF-1 are necessary for FSH-induced cytochrome P450 aromatase but not cytochrome P450 side-chain cleavage gene expression in oestrogenic bovine granulosa cells *in vitro*. **Journal of Endocrinology**, vol. 174, p. 499-507, 2002.

SIMARD, J; RHEAUME, E.; MEBARKI, F; SANCHEZ, R.; NEW; M. I.; MOREL, Y.; LABRIE F. Molecular Basis of Human 3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Deficiency. **Journal of Steroid Biochemical and Molecular Biology**, Vol. 53, No. 1-6, p. 127-138, 1995.

SIMON, A.M., GOODENOUGH, D.A., LI, E., PAUL, D.L. Female infertility in mice lacking Cx37. **Nature**, vol. 385, p. 525-529, 1997.

SIRARD, MA., BILODEAU, S. Effects of granulosa cell co-culture on *in vitro* meiotic resumption of bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, vol. 89, n.20, p.459-465, 1990.

SIRARD, M.A., COENEN, K., BILODEAU, S. Effects of Fresh or Culture follicular fractions on meiotic resumption in bovine oocytes. **Theriogenology**, vol. 37,p. 39-57, 1992.

SIRARD, M.A., COENEN, K. The co-culture of cumulus-enclosed bovine oocyte and hemisections of follicles: Effects on meiotic resumption. **Theriogenology**, vol. 40, p. 933-942, 1993.

SIRARD MA., RICHARD FJ. Effects of Harvest Methods of Bovine Oocytes Co-Cultures with Follicular Hemisections im vitro on Nuclear Maturation. **Theriogenology**, vol. 46, p.1243-1250, 1996.

SOCCIO, R. E. AND BRESLOW, J. L. StAR-related Lipid Transfer (START) Proteins: Mediators of Intracellular Lipid Metabolism. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 278, n. 25, p. 22183 – 22186, 2003.

SPICER, L.J.; CHAMBERLAIN, C.S.; MORGAN, G.L. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins during preovulatory follicular development in cattle. **Domestic animal Endocrinology**, vol. 21, p. 1-15, 2001.

SPICER, L.J. ; ECHTERNKAMP, S.E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. **Domestic animal Endocrinology**, vol. 12, p. 223- 245, 1995.

STRAUSS J.F.; HSUEH A.J. Ovarian hormone synthesis. In: DeGroot LJ et al (editors). **Endocrinology**, 4th ed. Saunders, 2001.

STOCCO; M. D. Star protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. **Annual Review of Physiology**, vol. 63, p. 193-213, 2001.

STRAUSS, J.F., HSUEH, J.W. Ovarian Hormone Synthesis. In: DeGroot, L.J. **Endocrinology**, 4<sup>th</sup> Edition, vol. 3. Pennsylvania: W.B Saunders Company; p.2043-2052, 2001.

SULLIVAN, R.; RUANGVORAVAT, C.; JOO, D.; MORGAN, J.; WANG, B.L.; WANG, X.K.; LO, C.W. Structure, sequence and expression of the mouse Cx-43 gene encoding connexin 43. **Gene**, vol. 130, p. 191-199, 1993.

SUDO, N.; SHIMIZU, T.; KAWASHIMA, C.; KANEKO, E.; TETSUKA, M.; MIYAMOTO, A. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) system during follicle development in the bovine ovary: Relationship among IGF-1, type 1 IGF receptor and pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A). **Molecular and Cellular Endocrinology**, vol. 264, 197-203, 2007.

S.-X. LIN , R. SHI, W. QIU, A. AZZI, D.-W. ZHU, H. AL DABBAGH, M. ZHOU. Structural basis of the multispecificity demonstrated by 17 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 5. **Molecular and Cellular Endocrinology**, vol. 248, p. 38–46, 2006.

TEILMANN, S.C. Differential expression and localization of connexin-37 and connexin 43 in follicles of different stages in the 4-week-old mouse ovary. **Molecular and Cellular Endocrinology**, vol. 234, p. 27-35, 2005.

TIAN, X.C, BERNDTSON, A.K; FORTUNE, J.E. Differentiation of bovine pre-ovulatory follicles during the follicular phase is associated with increases in messenger ribonucleic acid for cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase, but not P450 aromatase. **Endocrinology**, n. 136, p. 5102 – 5110, 1995

THOMPSON, JG. Defining the requirement for bovine embryo culture. **Theriogenology**, vol.45, p. 27-40, 1996.

VAN DEN HURK, R; ABIR, R; TELFER, E.E, BEVERS, M.M. Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. **Human Reproduction Update**, vol. 6, p. 457-474, 2000.

VALDEZ, KE; TURZILLO, AM. Regulation of nuclear factor kB activity and apoptosis by Estradiol in bovine granulosa cells. **Molecular and cellular Endocrinology**, v.243, p. 66-73, 2005.

WEBB, R.; ARMSTRONG, D.G. Control of ovarian function, effect of local interactions and environmental influences on follicular turnover in cattle: a review. **Livestock Production Science**, n.53, p. 95-112, 1998.

WEBB, R.; GOSDEN, R.G; TELFER, E.E.; MOOR, R.M. Factor affecting folliculogenesis in ruminants. **Animal Science**, vol.68, p. 257-284, 1999.

WILLIAMS, R.H., LARSEN, P.R. **Textbook of Endocrinology**, 10<sup>th</sup> Edition. Philadelphia: Saunders Company; p.592-610, 2003.

WIESEN, J.F.; MIDGLEY, A.R. Changes in expression of connexin 43 gap junction messenger ribonucleic acid and protein during ovarian follicular growth. **Endocrinology**, vol. 133, n.2, 1993.

YOGO, K.; OGAWA, T.; AKIYAMA, M.; ISHIDA, N.; TAKEYA, T. Identification and functional analysis of novel phosphorylation sites in Cx43 in rat primary granulosa cells. **Federation of European Biochemical Societies**, vol. 531, p. 132-136, 2002.

YU, Y.; LI W.; HAN, Z.; LUO, M.; CHANG, Z.; TAN, J. The effect of follicle-stimulating hormone on follicular development, granulosa cell apoptosis and steroidogenesis and its mediation by insulin-like growth factor-1 in the goat ovary. **Theriogenology**, vol. 60, p. 1691-1704, 2003.

XU, Z, GARVERICK, H.A., SMITH, G.W., SMITH, M.F., HAMILTON, S.A., YOUNGQUIST, R.S. Expression of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biology of Reproduction**, vol. 53, p.951-957, 1995.

ZHANG, Y.M., AND ROY, S.K. Downregulation of Follicle-Stimulating Hormone (FSH)-Receptor Messenger RNA Levels in the Hamster Ovary: Effect of the Endogenous and Exogenous FSH. **Biology of Reproduction**, vol. 70, p. 1580 – 1588, 2004.