Avaliação da expressão gênica de *MMPs* e *TIMPs* modulados por *RECK* e *SPARC* durante o desenvolvimento ovariano e a foliculogênese em ratas

NATHALI GUIMARAES NOBREGA

ORIENTADORA: Dra. MARI CLEIDE SOGAYAR

2010
Avaliação da expressão gênica de MMPs e TIMPs modulados por RECK e SPARC durante o desenvolvimento ovariano e a foliculogênese em ratas

Monografia da aluna Nathali Guimarães Nóbrega de conclusão do curso de Ciências Biológicas - Modalidade Bacharelado. 
Prof. Orientadora: Dra. Mari Cleide Sogayar

2010
“A ciência serve para o homem entender que não pode entender a ciência.”

Nathali Guimarães Nóbrega
Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus a proteção, o caminho, o amor e a vida, porque sem Ele nada disso seria possível.

Agradeço aos meus pais e irmã o apoio incondicional, demonstrado em forma de incentivo, compreensão e sacrifícios. À minha filha, Livie, por ser a razão da minha vida.

Agradeço à Dra. Mari Cleide Sogayar pela oportunidade e apoio científico necessário para a realização deste trabalho.

À Dra. Ana Claudia Oliveira Carreira pelo trabalho físico e mental, dedicando-se em me ajudar em todas as partes do processo científico.

À amiga e doutoranda, Tatiane Maldonado Coelho, por simplesmente tudo: apoio, dedicação, amizade, compreensão e transformação do meu ser.

À colaboração intelectual e física dos doutorandos Marina Trombeta, Gustavo Gross e Mateus Aoki.

Às técnicas e amigas, Regina Machtura e Raquel S. da Cruz, assim como os demais técnicos do NUCEL, já que seus trabalhos são a base deste.

À técnica bioterista, Débora Mattos, e seus amigos roedores, por toda ajuda incondicional prestada, sem esta, o trabalho não seria possível.

Às Instituições UNESP e USP pela infra-estrutura disponibilizada e parceria, assim como, as agências financiadoras deste projeto.

E a todos os amigos que influenciaram o meu ser direta ou indiretamente, sem eles, não seria a pessoa que sou hoje.

Faço também um agradecimento especial aos animais e heróis usados neste trabalho, pois o sacrifício destes é a razão deste trabalho existir e poder ajudar outros animais posteriormente.
ÍNDICE

RESUMO ..................................................................................................................... 5

1. INTRODUÇÃO ...................................................................................................... 6
   Matriz Extracelular e remodelamento ......................................................... 6
   Tissue Inhibitors of Metalloproteinases – TIMPs.............................. 8
   Basigin, BSG, gene indutor de MMPs ............................................. 10
   Gene RECK, regulador de metaloproteinases de matriz ............... 11
   SPARC, outro possível regulador de MMPs................................. 13
   Ovário – constante remodelamento tecidual............................... 14

2. OBJETIVO ........................................................................................................... 18
   Objetivo Geral ......................................................................................... 18
   Objetivos Específicos ........................................................................ 18

3. MATERIAIS E MÉTODOS ............................................................................... 19
   (1) Avaliação da expressão gênica dos genes alvos durante o ciclo estral natural
      (A) Modelo Animal ........................................................................... 19
      (B) Extração de RNA total ............................................................. 25
      (C) Geração de cDNA ..................................................................... 26
      (D) qRT-PCR .................................................................................... 27
      (E) Analise Estatística ................................................................... 29
   (2) Avaliação da expressão gênica perante estímulo hormonal
      (A) Modelo Animal ........................................................................... 24
      (B) Extração de RNA total ............................................................. 25
      (C) Geração de cDNA ..................................................................... 26
      (D) qRT-PCR .................................................................................... 27
      (E) Analise Estatística ................................................................... 29

4. RESULTADOS ..................................................................................................... 32
   Experimento 1 ....................................................................................... 32
   Experimento 2 ....................................................................................... 38

5. DISCUSSÃO ........................................................................................................ 44

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .............................................................................. 55

7. PERSPECTIVAS ............................................................................................... 56

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .................................................................... 57
RESUMO

O remodelamento da matriz extracelular (MEC), um importante componente dos organismos multicelulares, relaciona-se diretamente com o desenvolvimento embrionário, a angiogênese, a morfogênese de órgãos e a formação de cartilagens. Especificamente nos ovários, este remodelamento permite a ocorrência dos diversos eventos observados no ciclo ovariano, a citar: o crescimento folicular, a ovulação e a formação e regressão do corpo lúteo. A reorganização tecidual advinda destes eventos é regulada, em parte, pela ação de enzimas proteolíticas conhecidas como metaloproteinases de matriz (MMPs) e de seus inibidores (TIMPs e RECK) (revisado por Curry et al., 2003). Atualmente, o remodelamento da MEC pelo sistema MMPs/TIMPs é fortemente correlacionado com a expressão de alguns genes, tais como o gene Basigin (BSG), que induz a expressão de MMPs durante o ciclo ovariano em ratos (Smedts et al., 2005), ou o gene SPARC, que modula a expressão do TGF-β, fator de crescimento este associado ao aumento da agressividade tumoral (Podhajcer et al., 2008). A expressão do gene RECK foi descrita em diversos processos de remodelamento tecidual fisiológicos. Porém, uma diminuição em sua expressão, juntamente com o aumento na expressão das MMPs, tem sido associada com tumores mais agressivos e metastáticos (Meng et al., 2008). No entanto, apesar de RECK e SPARC estarem amplamente associados com remodelamento tecidual em diversas patologias, ainda não foi descrita a associação destes com remodelamento tecidual promovido pelo sistema MMPs/TIMPs que ocorre naturalmente durante a dinâmica ovariana. Considerando este quadro, o trabalho aqui proposto tem por objetivo analisar a expressão gênica de algumas MMPs- (-2, -9, -13, -14 e -19), e alguns de seus inibidores (TIMPs -1, -2, e -3 e RECK) e correlacioná-la com a expressão de SPARC e BSG durante a foliculogênese ovariana de ratas ao longo do ciclo estral, visando verificar possíveis associações entre esses alvos e o remodelamento da MEC durante estes processos fisiológicos.
1. INTRODUÇÃO

_Matriz Extracelular e remodelamento_

A matriz extracelular (MEC) é um importante componente dos organismos multicelulares, sendo composta de colágeno, proteoglicanos, glicoproteínas e integrinas, e tendo papel essencial como fator de conexão entre as células e consequente formação de tecidos e órgãos (Ramirez e Rifkin, 2003).

O remodelamento da MEC está relacionado a diversos processos fisiológicos: o desenvolvimento embrionário, a angiogênese, a morfogênese de órgãos e o remodelamento de cartilagens. Especificamente no ovário, o remodelamento da MEC está envolvido nas diversas fases do ciclo estral/menstrual, tais como o crescimento folicular, a ovulação e a formação e regressão do corpo lúteo (revisado por Curry et al., 2001).

A reorganização da MEC é regulada, em parte, pela ação de enzimas proteolíticas conhecidas como metaloproteinases de matriz, as MMPs (Mott et al., 2004). Estas em conjunto com seus inibidores, _tissue inhibitors of metalloproteinases_ (TIMPs), formam o conhecido sistema de MMPs, que age no _turnover_ e remodelamento do tecido conectivo, tendo sua ação regulada por hormônios, fatores de crescimento e citocinas (revisado por Curry et al., 2003).

O remodelamento coordenado pelo sistema de MMPs, além de atuar nos processos biológicos básicos citados, também foi descrito em câncer (revisado por
Curry et al., 2001): o balanço entre a expressão de MMPs e TIMPs em um dado tecido relaciona-se com a capacidade de um tumor sofrer metástase, dinâmica esta, portanto, importante para a compreensão e tratamento da patologia.

A família de metaloproteinases encontra-se dividida em quatro grandes classes distintas: colagenases, gelatinases, estromalísinas e metaloproteinase tipo membrana (MT-MMP) (Nagase et al., 1999). A Figura 1, a seguir (Smith et al., 2002), relaciona as MMPs quanto à sua nomenclatura e substratos de ação:

Figura 1. Relação das famílias de MMPs.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Family</th>
<th>Enzyme</th>
<th>MMP Number</th>
<th>Matrix substrates of functions</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Collagenases</td>
<td>Interstitial collagenase</td>
<td>MMP-1</td>
<td>Collagens I, II, III, VII, X, IGFBP-3</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Neutrophil</td>
<td>MMP-8</td>
<td>Collagens I, II, III</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Collagenase</td>
<td>MMP-13</td>
<td>Collagens I, II, III</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Collagenase-3</td>
<td>MMP-18</td>
<td>Collagen I</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Collagenase-4 (Xenopus)</td>
<td>MMP-18</td>
<td>Collagen I</td>
</tr>
<tr>
<td>Gelatinases</td>
<td>Gelatinase A</td>
<td>MMP-2</td>
<td>Gelatin, collagens IV, V, VII, X and XI, fibronectin, laminin, plasminogen</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Gelatinase B</td>
<td>MMP-9</td>
<td>Gelatin, collagens IV, V, XIV, fibronectin, plasminogen</td>
</tr>
<tr>
<td>Stromelysins</td>
<td>Stromelysin-1</td>
<td>MMP-3</td>
<td>Gelatin, fibronectin, laminin, collagen III, IV, IX, X, vitronectin, proteoglycan, ECAD, IGFBP-3, activates proMMP-1</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Stromelysin-2</td>
<td>MMP-10</td>
<td>Fibronectin, collagen IV</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Stromelysin-3</td>
<td>MMP-11</td>
<td>Fibronectin, laminin, collagen IV, gelatin</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Enamelysin</td>
<td>MMP-20</td>
<td>Amelogenin</td>
</tr>
<tr>
<td>Membrane-type</td>
<td>MT1-MMP</td>
<td>MMP-14</td>
<td>Collagens I, II, III, fibronectin, laminin, vitronectin: activates proMMP-2 and proMMP-13</td>
</tr>
<tr>
<td>MMPs</td>
<td>MT2-MMP</td>
<td>MMP-15</td>
<td>Gelatin, fibronectin, laminin: activates proMMP-2, collagen I, III, nidogen, tenasin, aggrecan, perelean</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>MT3-MMP</td>
<td>MMP-16</td>
<td>Collagen III, fibronectin, gelatin, activates proMMP-2</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>MT4-MMP</td>
<td>MMP-17</td>
<td>Gelatin, proMMP-2, proTACE-substrate</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>MT5-MMP</td>
<td>MMP-24</td>
<td>ProMMP-2</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>MTMMP-6 (Leukolysin)</td>
<td>MMP-24</td>
<td>Collagen IV, gelatin, fibronectin, fibrin</td>
</tr>
<tr>
<td>Others</td>
<td>Matrilysin</td>
<td>MMP-7</td>
<td>Fibronectin, laminin, gelatin, collagen IV, plasminogen, proteoglycan</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Metalloelastase</td>
<td>MMP-12</td>
<td>Elastin, plasminogen</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Unnamed</td>
<td>MMP-19</td>
<td>Not known</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>xMMP</td>
<td>MMP-21</td>
<td>Not known</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>cMMP</td>
<td>MMP-22</td>
<td>Casein</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Unnamed</td>
<td>MMP-23</td>
<td>Not known</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Matrilysin 2 (Endometase)</td>
<td>MMP-26</td>
<td>Fibrinogen, fibronectin, vitronectin, gelatin, collagen I, IV, proMMP-9</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Eplysin</td>
<td>MMP-28</td>
<td>Casein</td>
</tr>
</tbody>
</table>
ligação para zinco e um domínio com afinidade por hemopexina (revisado por Curry et al., 2003).

As MMPs formam um complexo e dinâmico processo de interação e degradação da MEC. As quatro classes atuam em diferentes componentes da MEC, porém membros de uma mesma classe têm afinidades diferentes por um mesmo elemento (Borkakoti N., 2000). Além disto, as MMPs podem atuar em conjunto como, por exemplo, na clivagem de colágeno fibrilar e não-fibrilar realizada por colagenases, resultando na desnaturação destes em gelatina, que por sua vez está susceptível à ação das gelatinases e estromalisinas (revisado por Curry and Osteen, 2003). Estas proteinases também possuem a capacidade de degradar componentes da membrana basal, sendo que a classe composta por estromalisinas também atua na modulação do crescimento celular (Sternlicht et al., 2001).

Dada a importância e complexidade do processo de remodelamento da MEC e atividade das MMPs, a regulação destas enzimas torna-se fundamental na homeostase tecidual.

_Tissue Inhibitors of Metalloproteinases – TIMPs_

Para que o remodelamento da MEC ocorra de forma dinâmica e eficiente é necessária a ação dos inibidores teciduais de MMPs, também chamados de TIMPs (Smith et al., 1999). As TIMPs, _tissue inhibitors of metalloproteinases_, além de estarem envolvidas no equilíbrio e no _turnover_ da matriz extracelular, estão relacionadas com diversos outros processo: ao desenvolvimento embrionário (Satoh et
al., 1994), possuem ação anti-angiogênica (Johnson et al., 1994), correlacionam-se com a indução do ciclo celular e apoptose (Talhouk et al., 1992) e com a dinâmica do sistema reprodutivo (revisado por Curry et al., 2003).

Existem quatro diferentes inibidores TIMPs descritos: TIMP -1, 2, 3 e 4, sendo que estas apresentam diferentes afinidades e ações sobre cada MMP (revisado por Curry et al., 2001).

A primeira TIMP descrita, a TIMP1, com peso molecular de 29kDa, possui afinidade por colagenases e MMP9, e induz a produção de estradiol pelas células granulosas do foliculo ovariano (Li et al., 2009). A TIMP2, com peso molecular de 23kDa, tem sua regulação e secreção diferenciada das demais TIMPs, se liga preferencialmente em MMP2 (Leco et al., 1992) e está relacionada à ativação da mesma (revisado por Curry et al., 2001). Já a TIMP3 está relacionada obrigatoriamente à matriz extracelular, controlando a atividade de enzimas proteolíticas e o crescimento celular (Li et al., 2009). A TIMP4, último inibidor identificado, tem atividade semelhante à TIMP2 (Leco et al., 1997).

A inibição das metaloproteinases ocorre devido à ligação da porção N-terminal das TIMPs ao domínio catalítico das MMPs, ou devido à ligação da porção C-terminal da molécula ao domínio hemopexinas das metaloproteinases.

O esquema apresentado a seguir (Figura 2) resume a ação das metaloproteinases e a regulação das TIMPs no Sistema de MMPs. Pode-se observar que quando um estímulo externo, como por exemplo, um hormônio se liga a seu receptor, difunde um sinal que inicia uma cascata de reações que, por sua vez, resulta na expressão gênica das
MMPs. As proteínas pro-MMPs, agora presentes no citoplasma, estão expostas à ativação, bem como à inibição pelas TIMPs (revisado por Curry et al., 2001).

Figura 2. Esquema de regulação da expressão, secreção e ativação das metaloproteinases de matriz.

**Basigin, BSG, gene indutor de MMPs**

As metaloproteinases de matriz são responsáveis, em parte, pelo remodelamento da matriz extracelular de tecidos. Esse evento possibilita a ocorrência de processos fisiológicos naturais, tais como a ovulação e a reprodução, mas também o desenvolvimento de patologias, como na metástase tumoral.

A regulação das MMPs é, portanto, um fator importante para a manutenção e homeostase sistêmica. O gene Basigin (*transmembrane glycoprotein of the*
imunoglobulin superfamily, BSG ou CD147) é considerado um fator indutor de MMPs (Smedts et al., 2005).

BSG está relacionado à metástase tumoral, sinalização nervosa e infertilidade (Murametsu et al., 2003), sendo expresso por células nervosas (Fan et al., 1998), no sistema imune, no sistema reprodutivo e em células cancerígenas (Biswas et al., 1995).

No sistema reprodutivo, Camundongos knockout BSG apresentaram espermatogênese defeituosa e problemas na implantação embrionária. Entretanto, não houve alteração na ovulação e morfologia ovariana (Igakura et al., 1998). Smedts et al. descreveu a expressão de Basigin por células do fóliculo ovariano em resposta ao hormônio hCG durante o ciclo estral natural e induzido de ratas. O aumento da expressão de BSG foi capaz de induzir a expressão de MMPs durante a foliculogênese e luteinização.

Gene RECK, regulador de metaloproteinases de matriz

A progressão tumoral, processo que envolve a invasão e metástase de células malignas, está fortemente relacionada à ação das metaloproteinases de matriz, que coordenam o remodelamento da matriz tecidual, possibilitando não somente a metástase tumoral em câncer, mas a eventos fisiológicos normais, como o remodelamento ovariano durante o ciclo reprodutivo feminino (revisado por Meng et al., 2008).

O gene supressor de tumor, RECK (Reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs), é reconhecido como um inibidor de MMPs. Este regulador, que se apresenta ancorado à membrana e possui um domínio rico em cisteínas, influencia
negativamente a invasão, metástase e angiogênese tumoral (revisado por Meng et al., 2008). *RECK* tem ação sobre a atividade proteolítica e liberação celular de MMPs, além de poder facilitar o sequestro das mesmas do meio (Welm et al., 2002).

Figura 3. Regulação de MMPs pelo gene *RECK*.

De acordo com a Figura 3 (revisão de Meng et al., 2008), RECK inibe a secreção de pró-MMP9, a maturação de MMP2 e a participação de MT1-MMP (MMP14) na ativação da proteína MMP2. Assim, a expressão de MMP2 e MMP9 é menor frente a alta expressão de *RECK* (Masui et al., 2003).

Diante da relação inibitória de RECK sobre as metaloproteinases de matriz em metástase tumoral e ao alto remodelamento tecidual promovido pelo sistema
MMPs/TIMPs no trato reprodutivo como um todo, foi proposta pelo nosso grupo a correlação da expressão, nunca antes descrita, do gene \textit{RECK} no ovário durante os processos de foliculogênese, ovulação e luteinização, bem como sua relação na regulação do balanço MMPs/TIMPs nestes processos.

\textit{SPARC, outro possível regulador de MMPs}

Diferente do gene \textit{RECK}, a expressão do gene \textit{SPARC (Secreted protein acidic and rich in cysteine)} está relacionado a tumores mais agressivos e metastásicos (revisado por Podhajcer \textit{et al.}, 2008), além de ter sido correlacionado a processos inflamatórios e cicatriciais e angiogênese embrionária (Porter \textit{et al.}, 1995).

Alguns estudos relatam um aumento na produção de colagenases por fibroblastos (Tremble \textit{et al.}, 1993) e monócitos (Shankava \textit{et al.}, 1997) na presença de SPARC. Shankava \textit{et al.} ainda verificou o aumento da expressão das MMPs -1 e -9 diante a presença da proteína SPARC.

A estimulação de MMPs por SPARC ocorre pela via PGE2-cAMP-dependente, sendo que SPARC ou lipopolisacarídeos estimulam o início da cascata. O estímulo sensibiliza as células, devido À ligação do mesmo a PGE2, com subsequente aumento de cAMP, que por sua vez induz PGHS2 e MMPs. O aumento de PGHS2 aumenta os níveis de PGE2, que por sua vez induz mais cAMP, e consequentemente maior produção de MMPs (Shankava \textit{et al.}, 1997). Ford \textit{et al.} (1993)demonstrou a correlação de SPARC e TGF-\(\beta\) ao observar a indução de TGF-\(\beta\) por SPARC, e vice-versa.
Em trabalhos de invasão em glioma, foi identificada a regulação positiva de SPARC sobre a MT1-MMP, com consequente ativação da MMP2 (McClung et al., 2007). Em gliomas, SPARC está relacionado também ao aumento da expressão das MMPs -2, -3 e -9 (Rich et al., 2003).

**Ovário – constante remodelamento tecidual**

O ciclo reprodutivo feminino compreende diversos processos, dentre eles, a foliculogênese. Esta fase ovariana envolve a proliferação de células da granulosa, diferenciação das células da teca e aumento do estroma folicular. Este processo transforma um fóliculo primário em um fóliculo de Graaf, que por sua vez, libertará o óvulo maduro para fecundação (Greenwald et al., 1994). Outro processo compreendido no ciclo reprodutivo feminino é a ovulação. Esta fase inicia-se por um pico do hormônio LH e consiste da ruptura da parede folicular e liberação do óvulo para fecundação (Espey et al., 1994). A última fase compreende a luteinização, que é caracterizada pela formação, manutenção e regressão do corpo lúteo, tecido de cicatrização ovariano que se forma devido à ovulação (Smith et al., 1994).

Em *Rattus norvergicus*, o ciclo estral das fêmeas possui quatro fases: proestro, estro, metaestro e diestro, com duração média de quatro a cinco dias. Cada fase tem a duração de aproximadamente um dia. O proestro compreende a foliculogênese; o estro, a ovulação; e metaestro e diestro, a formação e regressão, respectivamente, do corpo lúteo.
Toda esta dinâmica ovariana somente é possível devido ao remodelamento da matriz extracelular, que possibilita a foliculogênese, ovulação e a formação e regressão do corpo lúteo. As metaloproteinases de matriz e seus reguladores são responsáveis, em parte, por este remodelamento tecidual.

A Figura 4 (revisada por Curry et al., 2001, resume a expressão, descrita na literatura, das diferentes MMPs e seus inibidores teciduais, TIMPs, durante o ciclo menstrual, em primatas e durante o ciclo estral, em ratas.

Figura 4. Resumo da expressão do Sistema MMP nas diferentes fases do ciclo menstrual em primatas e do ciclo estral em ratas. O nível de expressão gênica na fase determinada está representada por: alta expressão (↑), baixa expressão (↓) e sem alteração (−) detectada na expressão do gene.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Follicular development</th>
<th>Ovulation</th>
<th>Luteal formation</th>
<th>Luteal regression</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Primate</td>
<td>↑ MMP-1, ↑ MMP-2, ↑ MMP-9</td>
<td>↓ MMP-1, ↓ MMP-2, ↓ MMP-9</td>
<td>↑ MMP-2, ↑ MMP-9, ↓ TIMP-1, ↓ TIMP-2</td>
</tr>
<tr>
<td>Rat</td>
<td>↑ MMP-2, ↑ TIMP-1, ↑ TIMP-2</td>
<td>↑ MMP-2, ↑ TIMP-3, ↑ TIMP-3</td>
<td>↑ TIMP-1, ↓ TIMP-2, ↑ TIMP-3</td>
</tr>
<tr>
<td>Primates</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Rat</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>

De acordo com a Figura 5, abaixo, o hormônio foliculo-estimulante (FSH) ou a ação similar promovida pela gonadotrofina coriônica equina (eCG) (a) comandam o crescimento folicular e (b) estimulam diretamente as células da granulosa a produzirem MMPs, (c) o que facilita (d) o remodelamento folicular, e concomitantemente, (e) a expressão de TIMP pelas células da granulosa e da teca, (f) o que regula as metaloproteinases expressas, bem como (g) o crescimento folicular. Durante a
foliculogênese, as MMPs expressas podem também se ligar a IGFBP e, consequentemente, interferir no crescimento do fóliculo (revisado por Curry et al., 2003).

Figura 5. Ação do Sistema de MMPs durante a foliculogênese.

De acordo com a Figura 6 abaixo, durante o processo ovulatório, (a) o pico do hormônio luteinizante (LH), inicia uma cascata de reações, que (b) estimula a produção de progesterona e citocinas, que por sua vez, (c) agem sobre as células da granulosa e da teca, estimulando (d) a expressão de MMPs e (f) TIMPs. Enquanto (e) as MMPs agem na ruptura do fóliculo para liberação do oócito, (g) as TIMPs inibem e controlam as MMPs, além de estarem (i, h) envolvidos em processos pós-ovulatórios (revisado por Curry et al., 2003).
Figura 6. Ação do Sistema MMPs durante o processo ovulatório.
2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Este trabalho tem por objetivo analisar a expressão gênica de MMPs- (-2, -9, -13, -14 e -19), TIMPs- (-1, -2, e -3), RECK, SPARC e BSG durante a foliculogênese ovariana de ratas ao longo de diferentes períodos do ciclo estral natural e induzido pelo tratamento hormonal com ECG e hCG, visando verificar possíveis associações entre a expressão dos reguladores SPARC e RECK e o remodelamento da MEC durante estes processos.

Objetivos específicos

- Determinar o ciclo estral de ratas, através de lavado vaginal, para análise comparativa de expressão dos genes MMP- 2, -9, -13, -14, -19, TIMP- 1, -2, -3, RECK, SPARC e BSG.
- Super-estimular a foliculogênese e induzir ovulação em ratas pré-púberes viaando uma análise comparativa da expressão gênica proposta entre o ciclo estral natural e no induzido sob influência de hormônios.
- Extrair RNA total das amostras de tecido ovariano obtidas em cada condição experimental.
- Sintetizar cDNA a partir do RNA extraído.
- Avaliar a expressão relativa das MMPs e TIMPs, bem como de RECK, SPARC e BSG.
- Analisar a expressão dos genes RECK, SPARC e BSG quanto ao perfil de expressão do Sistema MMPs/TMIPs já descrito em literatura, através dos dados obtidos por qRT-PCR.
3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto de Química (CEUA) da Universidade de São Paulo, de acordo com as normas éticas de uso de animais em experimentação científica.

O trabalho é subdividido em dois conjuntos de experimentos:

1. Avaliação da expressão gênica dos genes alvos durante o ciclo estral natural;
2. Avaliação da expressão gênica no ciclo estral induzido por estímulo hormonal.

(I) Avaliação da expressão gênica dos genes alvos durante o ciclo estral natural

(A) Modelo Animal

Ratas Sprague-Dawley sexualmente maduras com, aproximadamente, 3 meses de idade, foram submetidas diariamente à análise do seu lavado vaginal. O procedimento foi realizado com o uso de 10 µl de PBSA (Tampão Fosfato Salina) contendo 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,0 mM Na₂HPO₄; 1,4 mM KH₂PO₄, ao longo de 15 dias, para determinação do ciclo estral, de acordo com Marcondes et al., 2002.

O fluido vaginal foi coletado com o auxílio de uma micropipeta utilizando uma ponteira (volume 10 µl) contendo a solução PBSA (Figura 7 e 8). Amostra foi colocada
sobre láminas de vidro para microscopia, e coberta por lamínula para análise perfil de células vaginal, através de microscopia óptica.

Três tipos celulares e suas disposições foram observados nos lavados vaginais: 1- células epiteliais, células grandes e nucleadas; 2- células cornificadas, irregulares e sem núcleo, que formam placas; 3- leucócitos, que são pequenos e possuem citoplasma granular. A proporção de cada tipo celular presente no lavado vaginal foi usada para determinação da fase estral (Marcondes et al., 2002).

Figura 7: Contenção dos animais para o procedimento de lavagem vaginal com o auxílio de micropipeta.
Depois de analisado e determinado três ciclos estrais completos consecutivos de cada rata, visando verificar a regularidade do ciclo das fêmeas, três animais foram sacrificados para cada fase do ciclo estral (proestro, estro, metaestro ou diestro), em câmara de CO₂.

O padrão celular observado ao microscópio óptico (aumento de 40X), para caracterização de cada fase estral, está exposto nas Figuras 9, 10, 11 e 12.

Os ovários e o útero foram coletados, colocados em RNAholder (BioAgency Laboratórios) e armazenados a -80 °C para preservação da integridade dos RNAs de cada amostra, da qual foi extraído o RNA total.
Figura 9: Fase do Ciclo Estral: Proestro. Predominância de células epiteliais nucleadas no esfregaço (aumento 40x).

Figura 10: Fase do Ciclo Estral: Estro. Esfregaço consiste principalmente de células cornificadas anucleadas no esfregaço (aumento 40x).
Figura 11: Fase do Ciclo Estral: Metaestro. O esfregaço é composto células epiteliais, células cornificadas e leucócitos na mesma proporção (aumento 40x).

Figura 12: Fase do Ciclo Estral: Diestro. Presença predominante de leucócitos no esfregaço (aumento 40x).
(2) Avaliação da expressão gênica perante estímulo hormonal

(A) Modelo Animal

Ratas Sprague-Dawley pré-puberes (21 dias de idade) foram induzidas à foliculgênese através da injeção por via subcutânea de 10UI de gonadotrofina coriônica equina – eCG (Folligon® - Intervet), que possui atividade FSH. A luteólise foi induzida através da administração por via injeção subcutânea, de 10UI de gonadotrofina coriônica humana - hCG (Choragon® - Ferring) 48h após a injeção de eCG em alguns dos grupos experimentais (Tabela 1). De acordo com Jo et al. (2004), a injeção de eCG estimula o desenvolvimento folicular e a posterior administração de hCG induz a ovulação e formação do corpo lúteo. Para a análise do padrão de expressão dos genes de interesse durante o crescimento folicular e ovulação induzidos, os animais foram sacrificados após 0, 24 ou 48 horas após a administração de eCG, e após 12, 24, 48 horas ou 4, 8 e 14 dias pós- administração de hCG (N=3 animais por grupo por experimental), de acordo com a Tabela 1.
### Tabela 1. Grupos experimentais e tratamentos realizados. N=3

<table>
<thead>
<tr>
<th>Grupo</th>
<th>10 UI eCG</th>
<th>10 UI hCG</th>
<th>Fase</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>G1</td>
<td>0h</td>
<td>–</td>
<td>Controle</td>
</tr>
<tr>
<td>G2</td>
<td>24h</td>
<td>–</td>
<td>Foliculogênese</td>
</tr>
<tr>
<td>G3</td>
<td>48h</td>
<td>–</td>
<td>Ovulação</td>
</tr>
<tr>
<td>G4</td>
<td>48h</td>
<td>12h</td>
<td>Transição: ovulação-luteinização</td>
</tr>
<tr>
<td>G5</td>
<td>48h</td>
<td>24h</td>
<td>Formação do corpo</td>
</tr>
<tr>
<td>G6</td>
<td>48h</td>
<td>48h</td>
<td>Transição: ovulação-luteinização</td>
</tr>
<tr>
<td>G7</td>
<td>48h</td>
<td>4 dias</td>
<td>Manutenção do corpo lúteo</td>
</tr>
<tr>
<td>G8</td>
<td>48h</td>
<td>8 dias</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>G9</td>
<td>48h</td>
<td>14 dias</td>
<td>Regressão do corpo lúteo</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Ovários e útero foram coletados em solução RNAholder (BioAgency Laboratórios) e, posteriormente, congelados e armazenado a –80°C, para a extração de RNA total.

**1 e 2 – B) Extração de RNA total**

RNA total das amostras foi extraído usando o reagente Trizol (Invitrogen/Life Technologies). Os tecidos armazenados em RNA holder foram macerados utilizando cadinho e pistilo, em nitrogênio líquido. O macerado foi colocado em 500 μl de Trizol e congelado a -80°C. A temperatura ambiente, as amostras foram descongeladas e 100 μl de clorofórmio adicionados, com posterior, agitação e incubação por 3 min. Depois
disto, uma sequência de etapas foram realizadas: (1) centrifugação das amostras a 12.000g por 15 min a 4ºC; (2) transferência da fase aquosa superior formada a novos tubos; (3) adição de 500 μl de álcool isopropílico a cada amostra e incubação das mesmas por 10 min a temperatura ambiente; e (4) Centrifugação a 12.000g por 10 min a 4ºC e remoção do sobrenadante.

A lavagem do RNA extraído foi feita com 500 μl de etanol 75% e centrifugação a 7.500g por 5 min a 4 ºC. Depois de retirado o sobrenadante, as amostras de RNA foram ressuspensidas em 50 μl de H₂O Milli-Q.

As extrações foram quantificadas utilizando o espectrofotômetro, NanoDrop ND-1000 (Nanodrop®), na faixa de absorção de 260nm para a obtenção da concentração de RNA total extraído (ng/μl). Para avaliar a qualidade do mesmo, foi realizada a análise da relação A260/A280, e somente RNAs com razão acima de 1,8 foram utilizados para síntese de cDNA.

**(1 e 2–C) Geração de cDNA**

A partir de 2μg de RNA total extraído de cada condição experimental foram sintetizados DNAs complementares (cDNA) pela reação de transcrição reversa, utilizando a enzima *ImpromII Reverse Transcriptase* (Promega©) com primer Oligo (dT) (Promega©), onde inicialmente, as alíquotas de RNA foram submetidas a tratamento prévio com 2 μl de DNase I (1U/μl, Fermentas) em solução contendo 2 μl de MgCl₂ (25 mM) e 0,5 μl de RNase OUT (40U/μl, Invitrogen). O tratamento ocorreu
através de incubação por 10 min a 37ºC e 75ºC por 5 min. Em seguida, para inativação da enzima, a amostra foi incubada a 65ºC por 10 min, com 1,0 µl de Oligo dT (500 µl/ml, Invitrogen), 1,0 µl de dNTP (10 mM, Invitrogen) e 1,0 µl de H₂O Milli-Q.

Para a reação da transcriptase reversa e síntese de cDNA, a cada amostra foram adicionados: 4 µl de tampão 5X (Promega); 1 µl de DTT (0,1 M, Invitrogen); 0,5 µl de RNase OUT (40U/µl, Invitrogen); 1,0 µl da Enzima Improm II (Promega); e 0,5 µl de H₂O Milli-Q. Depois da adição destes reagentes, as amostras foram colocadas a 25ºC por 10 min, para anelamento dos primers, a 42ºC por 2 h, onde ocorreu a reação de transcrição reversa, e em seguida, para a inativação das enzimas houve a incubação a 75ºC por 15 min.

Visando degradar o RNA, foi adicionado 1 µl de RNase H (5U/µl, Fermentas) em cada tubo, sendo que estes, foram incubados a 37ºC por 30 min, seguidos de uma etapa de 72ºC por 10 min.

Ao final, as amostras foram diluídas em 1:3 com a adição de 40 µl de H₂O Milli-Q, e guardadas em temperatura -20ºC.

(1 e 2 – D) qRT-PCR

A reação de qRT-PCR foi feita com cDNA total de cada condição. As sequências dos primers murinos (Tabela 2) foram desenhados com auxílio do programa Primer Express, Applied Biosystems®.
Tabela 2. Sequência e concentração dos *primers* utilizados no qRT-PCR.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Primer</th>
<th>Concentração utilizada</th>
<th>Forward Sequence</th>
<th>Reverse Sequence</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>MMP 2</td>
<td>200 nM</td>
<td>CGATGTCTCCCCCAAAACAG</td>
<td>GCAGCCATAGAAAGTGTCAGGTA</td>
</tr>
<tr>
<td>MMP 9</td>
<td>400 nM</td>
<td>CGACATAAAAGGCATCCAGCAT</td>
<td>GGAGCCCTTGGGTCAGGTT</td>
</tr>
<tr>
<td>MMP 13</td>
<td>200 nM</td>
<td>GGGACGCCCATTTTGTAG</td>
<td>TGGGCAGCACAATAATAAAGTTG</td>
</tr>
<tr>
<td>MMP 14</td>
<td>200 nM</td>
<td>CAAAGGTCTATGGTCTTACAAGTGACA</td>
<td>CGCCTCATAGCCTTCATCGT</td>
</tr>
<tr>
<td>MMP 19</td>
<td>200 nM</td>
<td>GGAGCTGATGACTTCAGGCTAGA</td>
<td>CAGTTCCAGATGCTTCTTGGAAA</td>
</tr>
<tr>
<td>TIMP 1</td>
<td>100 nM</td>
<td>ACCCACCACAGACAGCTTT</td>
<td>GGAACCCATGAATTTAGCCCTTA</td>
</tr>
<tr>
<td>TIMP 2</td>
<td>100 nM</td>
<td>CAGGCGTTTGCAATGCA</td>
<td>CCTCTTTTCGTCCTACACTGCT</td>
</tr>
<tr>
<td>TIMP 3</td>
<td>200 nM</td>
<td>CAGGAATGCTTTCTGCAACT</td>
<td>GCTTCTTTCCACCACCTTTGG</td>
</tr>
<tr>
<td>BSG</td>
<td>200 nM</td>
<td>GCGGCGGGCACCAT</td>
<td>AAGCAGGTAAGCTGTCCTTGGGA</td>
</tr>
<tr>
<td>RECK</td>
<td>400 nM</td>
<td>AAAGTGTGCCAGGAAAGATAGAAGAC</td>
<td>CACACCGAGCCCATTTCCATT</td>
</tr>
<tr>
<td>SPARC</td>
<td>400 nM</td>
<td>CCTGGATCTCTTCTTCTCTTTGC</td>
<td>TTTCTCCGCCCACCATCT</td>
</tr>
<tr>
<td>Actina</td>
<td>100 nM</td>
<td>ACCCGCGAGTACAAACCTTCTT</td>
<td>TATCGTCATCCATGGCGAACT</td>
</tr>
<tr>
<td>HPRT</td>
<td>200 nM</td>
<td>CCGACCGTTCTGTGTCATGTC</td>
<td>CATACCGTGGTCCATCATCAACTAATCA</td>
</tr>
<tr>
<td>Tubulina</td>
<td>100 nM</td>
<td>CATTGGGACCATTCAAAAAAGATT</td>
<td>GCTCAGGCTTCCTGTCGTAAGTA</td>
</tr>
</tbody>
</table>

As reações foram feitas em triplicata amostral. Para a reação foi utilizado o reagente *Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* (Fermentas). Em cada reação foram adicionados 3μl de cDNA; 3μl de primer; e 6μl de *Maxima® SYBR Green/ROX qPCR Master Mix*.

A amplificação foi feita no equipamento *7300 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems), nas condições: 50 °C por 2 min; 95 °C por 10 min; 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto.
(1 e 2 – E) Análise estatística

Diferentes concentrações de *primers* foram testadas: 100, 200, 400 e 600 nM com as misturas de cDNAs diluídas em 1:30. Desta forma pode-se determinar a concentração ótima de *primers*, determinada como a menor concentração na qual o Ct (*Cycle Threshold*, definido como o número de ciclos requeridos para o sinal fluorescente cortar o *threshold*, isto é, o *background*) não apresente grandes variações em relação às maiores concentrações com uma menor formação de dímeros de primers, se estes estão presente. Após selecionadas as melhores concentrações dos *primers*, foi determinada a análise da concentração de cDNA nas seguintes diluições: 1:30, 1:60, 1:120, 1:240. A análise de regressão linear dos valores de Cts em função do logaritmo da respectiva diluição fornece o coeficiente angular da reta (a, em y=ax+b) que é utilizado para cálculo da eficiência de amplificação do produto pelos *primers*, na seguinte fórmula:

\[ Ef = 10^{-\frac{1}{\text{coeficiente angular}}} \]

\[ Ef \ (\%) = \left( Ef - 1 \right) \times 100 \]

O parâmetro Ct foi determinado com a média dos Cts das triplicatas amostrais que obtiveram curvas de amplificação não tardias e semelhantes entre si, assim como,
curvas de dissociação referentes ao primer utilizado. A expressão do gene alvo foi determinada em relação à expressão dos genes controles, os genes constitutivos. As análises foram realizadas de acordo com a análise descrita por Pfaffl et al., 2001.

Após a obtenção dos Cts de cada amostra, foi calculada a média dos Cts das réplicas técnicas. Dado que a expressão do gene é analisada em relação a uma amostra que é tomada como referência, calculou-se então a diferença entre a média dos Cts da amostra referência e a média dos Cts da amostra estudada. Essa diferença é definida como o \( \Delta C_P \). O cálculo do \( \Delta C_P \) é realizado para os dados do gene alvo e para os dados do gene de expressão constitutiva. A fórmula final para o cálculo da diferença de expressão dos genes entre as amostras analisadas, que considera que não há um ganho de duas vezes do produto amplificado a cada ciclo, dado que a eficiência de amplificação dos primers utilizados não é de 100%, é dada por:

\[
\text{ratio} = \frac{E_f^{\Delta C_P_{\text{gene alvo}}}}{E_f^{\Delta C_P_{\text{controle endógeno}}}}
\]
Os resultados foram normalizados contra a expressão dos *primers* endógenos β-Actina e Tubulina utilizando o fator de normalização obtido no programa *geNorm* (Vandesompele *et al.*, 2002).

Estes dados foram plotados em gráficos, utilizando-se o programa *GraphPrisma* e posteriormente analisados de acordo com dados descritos na literatura.
4. RESULTADOS

Os dados obtidos a partir das análises realizadas possibilitaram a geração de tabelas e gráficos, onde é possível comparar a expressão dos genes de interesse - *MMP* - 2, -9, -13, -14 e -19, *TIMP* -1, -2 e -3, *RECK*, *SPARC* e *BSG*, em cada condição experimental.

*Experimento 1 - Avaliação da expressão gênica dos genes alvos durante o ciclo estral natural em ratas púberes*

A partir das análises da expressão dos genes de interesse, obtidos através do qRT-PCR, é possível obter a expressão relativa, normalizadas de acordo com a expressão de genes endógenos, de cada gene questionado.

Neste experimento 1, a fase proestro foi estabelecida como referência, de modo que a expressão dos genes-alvo das demais fases estrais foram relativas a esta fase.

Os dados obtidos foram colocados na Tabela 3 de acordo com a fase estral e gene a que se referem.

Tabela 3. Quantificação das expressões gênicas dos genes-alvo relativas à fase de proestro do experimento 1.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Condições Experimentais</th>
<th>MMP2</th>
<th>MMP9</th>
<th>MMP13</th>
<th>MMP14</th>
<th>MMP19</th>
<th>TIMP1</th>
<th>TIMP2</th>
<th>TIMP3</th>
<th>RECK</th>
<th>SPARC</th>
<th>BSG</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Proestro</td>
<td>1.000</td>
<td>1.000</td>
<td>1.000</td>
<td>1.000</td>
<td>1.000</td>
<td>1.000</td>
<td>1.000</td>
<td>1.000</td>
<td>1.000</td>
<td>1.000</td>
<td>1.000</td>
</tr>
<tr>
<td>Estro</td>
<td>0.232</td>
<td>3.413</td>
<td>0.002</td>
<td>0.021</td>
<td>0.058</td>
<td>0.150</td>
<td>0.018</td>
<td>0.006</td>
<td>0.021</td>
<td>0.021</td>
<td>0.061</td>
</tr>
<tr>
<td>Metaestro</td>
<td>0.099</td>
<td>107.619</td>
<td>0.003</td>
<td>0.039</td>
<td>0.044</td>
<td>0.020</td>
<td>0.025</td>
<td>0.012</td>
<td>0.038</td>
<td>0.021</td>
<td>0.043</td>
</tr>
<tr>
<td>Diestro</td>
<td>0.118</td>
<td>37.172</td>
<td>0.011</td>
<td>0.022</td>
<td>0.024</td>
<td>0.021</td>
<td>0.009</td>
<td>0.006</td>
<td>0.015</td>
<td>0.011</td>
<td>0.025</td>
</tr>
</tbody>
</table>
Expressão de *MMPs*

De acordo com a Tabela 3, um mesmo padrão de expressão pode ser observado para todas as MMPs: a expressão dos genes *MMP-2, -13, -14 e -19* é maior na fase proestro em relação às demais fases.

Os genes *MMP-2 e -19* apresentam uma expressão decrescente com a progressão do ciclo (Figura 13-A e E). O gene *MMP13* teve uma expressão relativa menor no estro, com tendência crescente a partir do metaestro, alcançando um pico de expressão no proestro, conforme observado na Figura 13-C. O gene *MMP14* teve a maior expressão detectada na fase proestro e expressão semelhantemente baixa nas demais fases, ressalvo na fase metaestro, onde a expressão foi ligeiramente maior (Figura 13-D). Porém, apenas a expressão do gene *MMP-9* difere-se das demais metaloproteinases. Conforme observado na Figura 13-B, a maior expressão do gene foi observada na fase metaestro, seguida decrescentemente pelas fases diestro, estro e proestro, fase esta que mostrou baixíssima expressão em relação às demais fases do ciclo estral.

Expressão de *TIMPs*

A expressão relativa dos genes *TIMPs* também teve maior relevância na fase proestro (Figura 14). No caso do *TIMP-1*, a fase proestro apresentou maior expressão, sendo que o estro obteve expressão 75% reduzida em relação a proestro, de acordo com a Tabela 3. Ainda no mesmo gene, as fases metaestro e diestro apresentaram semelhante nível de expressão (Figura 14-A). Os perfis de expressão gênica de *TIMP2* e *TIMP3*
estão semelhantes, com expressões baixas nas fases estro, metaestro e diestro em relação à fase proestro (Figura 14-B e C).

Figura 13 – Expressão relativa de MMPs em ovários de ratas púberes nas diversas fases do ciclo estral.
Figura 14 – Expressão relativa de TIMPs em ovários de ratas púberes nas diversas fases do ciclo estral.
Expressão de *RECK*, *SPARC* e *BSG*

O gene *RECK* apresentou expressões semelhantes e significativamente diminuídas nas fases estro, metaestro e diestro comparadas à fase proestro, conforme representado na Figura 15-A.

*SPARC*, representado na Figura 15-B, também teve expressão menor nas fases estro, metaestro e diestro em relação a proestro, sendo que as fases estro e metaestro apresentam expressão semelhante do gene, enquanto que em diestro é observada a menor expressão comparada às outras três fases.

Na Figura 15-C pode-se observar os valores decrescentes de expressão gênica de *BSG* apresentados nas fases proestro, estro, metaestro e diestro, respectivamente.
Figura 15 – Expressão relativa de *RECK*, *SPARC* e *BSG* em ovários de ratas púberes nas diversas fases do ciclo estral.

**Expressão Relativa de *RECK*, *SPARC* e *BSG* em Ovários Experimento 1**

A

![Bar Chart A](image1)

- **RECK**
- **Proestro**
- **Estro**
- **Metaestro**
- **Diestro**

B

![Bar Chart B](image2)

- **SPARC**
- **Proestro**
- **Estro**
- **Metaestro**
- **Diestro**

C

![Bar Chart C](image3)

- **BSG**
- **Proestro**
- **Estro**
- **Metaestro**
- **Diestro**
Experimento 2 - Avaliação da expressão gênica dos genes-alvo perante estímulo hormonal em ratas impúberes

A Tabela 4 resume o perfil de expressão gênica das MMPs -2, -9, -13, -14 e -19, TIMPs -1, -2 e -3, RECK, SPARC e BSG em ratas pré-púberes perante estímulo foliculogênico e ovulatório, desencadeados após o tratamento induzido por eCG e/ou hCG, respectivamente.


<table>
<thead>
<tr>
<th>Condições Experimentais</th>
<th>MMP2</th>
<th>MMP9</th>
<th>MMP13</th>
<th>MMP14</th>
<th>MMP19</th>
<th>TIMP1</th>
<th>TIMP2</th>
<th>TIMP3</th>
<th>RECK</th>
<th>SPARC</th>
<th>BSG</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Controle</td>
<td>1.000</td>
<td>1.000</td>
<td>1.000</td>
<td>1.000</td>
<td>1.000</td>
<td>1.000</td>
<td>1.000</td>
<td>1.000</td>
<td>1.000</td>
<td>1.000</td>
<td>1.000</td>
</tr>
<tr>
<td>G1</td>
<td>0.371</td>
<td>4.376</td>
<td>53.302</td>
<td>1.358</td>
<td>4.300</td>
<td>1.048</td>
<td>1.197</td>
<td>1.208</td>
<td>2.716</td>
<td>0.931</td>
<td>1.297</td>
</tr>
<tr>
<td>G2</td>
<td>2.023</td>
<td>0.134</td>
<td>187.589</td>
<td>1.194</td>
<td>9.282</td>
<td>5.346</td>
<td>3.985</td>
<td>0.350</td>
<td>4.952</td>
<td>1.484</td>
<td>0.536</td>
</tr>
<tr>
<td>G3</td>
<td>0.387</td>
<td>7.978</td>
<td>323.541</td>
<td>1.448</td>
<td>1.911</td>
<td>0.716</td>
<td>0.573</td>
<td>0.378</td>
<td>0.598</td>
<td>0.624</td>
<td>0.338</td>
</tr>
<tr>
<td>G4</td>
<td>1.001</td>
<td>1.185</td>
<td>255.566</td>
<td>1.048</td>
<td>6.245</td>
<td>6.391</td>
<td>0.594</td>
<td>0.225</td>
<td>0.414</td>
<td>0.578</td>
<td>0.274</td>
</tr>
<tr>
<td>G5</td>
<td>2.783</td>
<td>3052.597</td>
<td>417.945</td>
<td>0.950</td>
<td>7.969</td>
<td>4.892</td>
<td>0.726</td>
<td>0.314</td>
<td>0.551</td>
<td>0.966</td>
<td>0.413</td>
</tr>
<tr>
<td>G6</td>
<td>0.687</td>
<td>764.704</td>
<td>1641.505</td>
<td>1.321</td>
<td>3.328</td>
<td>1.130</td>
<td>0.477</td>
<td>0.946</td>
<td>0.313</td>
<td>1.649</td>
<td>0.425</td>
</tr>
<tr>
<td>G7</td>
<td>0.264</td>
<td>8.967</td>
<td>2898.465</td>
<td>1.266</td>
<td>3.489</td>
<td>0.502</td>
<td>0.309</td>
<td>0.667</td>
<td>0.771</td>
<td>1.035</td>
<td>0.610</td>
</tr>
<tr>
<td>G8</td>
<td>0.132</td>
<td>2.994</td>
<td>13196.918</td>
<td>1.698</td>
<td>10.781</td>
<td>1.156</td>
<td>1.279</td>
<td>1.563</td>
<td>1.602</td>
<td>1.346</td>
<td>3.743</td>
</tr>
<tr>
<td>G9</td>
<td>0.107</td>
<td>18.766</td>
<td>12647.554</td>
<td>0.939</td>
<td>10.400</td>
<td>1.272</td>
<td>0.743</td>
<td>0.961</td>
<td>0.598</td>
<td>1.031</td>
<td>1.035</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Expressão de MMPs

Os resultados obtidos mostram que a expressão de MMP-14, durante o experimento 2, não obteve variação nos grupos experimentais em relação ao grupo controle (Tabela 4 e Figura 16-D). Já na expressão do gene MMP-13 foi observado um aumento crescente da sua expressão, de G1 até G9, comparados ao grupo controle, consecutivamente (Figura 16-C).
Figura 16 – Expressão relativa das MMPs em ovários de ratas impúberes submetidas a estimulo hormonal.
Já o perfil de expressão do gene *MMP-2* no experimento 2 mostra os grupos G6, G1, G3, G7, G8 e G9 com menor expressão do gene, em ordem decrescente nesta lista de genes. Nos grupos 2 e 5, o gene MMP2 apresenta maior expressão que o controle. No grupo G4 não houve alteração detectada, como pode ser visto na Figura 16-A.

Para o gene *MMP-19*, observou-se aumento da expressão em todos os grupos experimentais em relação ao controle. Porém, os grupos G3, G6 e G7 demonstraram menor aumento da expressão em relação aos demais grupos (Figura 16-E).

Na Figura 16-B, pode-se observar ampla variabilidade na expressão do gene *MMP-9* ao longo dos grupos. Os grupos G5 e G6 tiveram um aumento expressivo de até 3.000 vezes em relação ao controle. O grupo G2 que apresentou a menor expressão. Os demais grupos apresentaram expressão semelhante ou pouca diferença com relação ao controle.

**Expressão de TIMPs**

Os resultados para *TIMP-1* mostraram que o os grupos G2, G4 e G5 têm uma expressão de quatro a sete vezes maior deste gene, enquanto o grupo G7 possui a menor expressão em relação ao controle (Figura 17-A), assim como as expressões relativas de *TIMP-2* e *TIMP-3*, que formaram vales de sub-expressão em seus gráficos nos mesmos tempos experimentais (Figura 17-B e C), sendo que em *TIMP-2* a menor expressão se dá em G7 e a maior expressão foi detectada em G2, enquanto em *TIMP-3*, em G4 e G8, respectivamente.
Figura 17 – Expressão relativa das *TIMPs* em ovários de ratas impúberes submetidas a estimulo hormonal.

**Expressão Relativa de *TIMPs* em Ovários Experimento 2**

### A

Grupos Experimentais

### B

Grupos Experimentais

### C

Grupos Experimentais
Expressão de *RECK, SPARC* e *BSG*

Ao longo do Experimento 2, a expressão de *SPARC* não obteve variação significativa, quando comparada ao grupo controle (Figura 18-B).

Os genes *RECK* e *BSG*, porém, obtiveram padrões similares de expressão, com expressão relativa em G3, G4, G5 e G7 correspondendo à metade da expressão do grupo controle. No entanto, para o gene *RECK*, os grupos G1, G2 e G8 apresentaram-se consideravelmente mais expressos, enquanto que para *BSG*, o grupo G8 apresentou a maior expressão gênica, como pode ser observados na Figura 18-A e C.
Figura 18 – Expressão relativa de RECK, SPARC e BSG em ovários de ratas impúberes submetidas a estímulo hormonal.
5. DISCUSSÃO

Perfil de expressão gênica do Sistema MMPs

Para que o crescimento folicular, ovulação e formação do corpo lúteo ocorram é necessário o remodelamento da matriz extracelular do órgão. O crescimento e a ruptura da parede folicular são processos que ocorrem naturalmente durante o ciclo ovariano e, por sua vez, induzem a reestruturação do tecido ovariano (Smith et al., 1999). O Sistema MMPs é responsável, em parte, por esse remodelamento e pelas mudanças observadas na estrutura extracelular (Sternlicht e Werb, 2001).

As alterações na expressão gênica das MMPs, bem como de seus inibidores teciduais, TIMPs, podem ser observadas no decorrer do ciclo ovariano, possibilitando as mudanças estruturas fisiológicas sofridas pelo ovário (revisado por Curry et al., 2003). Com base nos resultados obtidos, foi possível verificar alterações significativas nas expressões das diferentes MMPs e TIMPs durante o ciclo ovariano.

De acordo com a Figura 4 (Curry et al., 2001), as MMP-2 e -9 estão superexpressas durante o desenvolvimento folicular, o que é corroborado pelos dados obtidos representados na Figura 13-A, referente ao perfil do gene MMP2 durante o ciclo natural, na qual foi observada uma maior expressão de MMP2 na fase proestro (foliculogênese) em relação às demais fases. Porém, a expressão do gene MMP-9 nesta fase foi a menor detectada, comparativamente com as demais fases (Figura 13-B).

No experimento 2, onde há indução hormonal do crescimento folicular, também observamos aumento de expressão de MMP-2 depois de 24h da administração do
hormônio eCG, fase esta onde os ovários encontram-se em crescimento folicular, com leve decréscimo expressivo da mesma MMP nas fases mais tardias da foliculogênese (G3). Porém, a expressão de MMP-9 mostrou-se menor no G2, com 24h de tratamento com eCG e maior no G3, com 48h de tratamento de eCG, compreendendo fases tardias do crescimento folicular. Estes dados refletem a fisiologia do processo e mostram que este hormônio aumenta a expressão de mRNAs de MMPs ao decorrer do desenvolvimento folicular (Bagavandoss P., 1998). Estas relações, também descritas por Huet et al. (1998), mostram que as MMPs-2 e -9 estão envolvidas no processo de atresia folicular.

Também podemos observar um crescimento gradual da expressão da MMP-13 nos pontos 0 e 48h após a administração de eCG. No ciclo natural (experimento 1), há diminuição da expressão gene nas demais fases do ciclo estral quando comparadas com o proestro, conforme mencionado por Cooke et al. (1999).

De acordo com Jô et al. (2002), a expressão de MMP-14 (no experimento 2) não apresenta alteração durante o crescimento folicular, como analisado na fase folicular induzida. Porém, o proestro do ciclo natural foi a fase que apresentou a maior expressão deste gene. Como a MMP-14 é necessária para o complexo de ativação do pró-MMP2 (revisado por Curry et al., 2003), e esta MMP apresenta maior expressão no proestro, entende-se que a expressão de MMP-14 tenha um padrão parecido com a expressão da MMP2.

O aumento expressivo da expressão de MMP-19, observado na fase proestro, também foi afetado pelo tratamento com eCG, demonstrando que o gene é importante
no início do desenvolvimento folicular (de 0 a 24h após administração de eCG). Em contraste, paraas demais MMPs, que foram mais expressas na fase tardia da foliculogênese (48h após eCG) é sugerido que MMP-19 participa do remodelamento tecidual durante a primeira fase do ciclo ovariano (Jo e Curry, 2004).

As metaloproteinases, além de modularem o crescimento folicular, induzem a expressão de seus inibidores, TIMPs, e, conjuntamente, coordenam as fases do ciclo estral (revisado por Curry et al., 2001). TIMP-1 tem uma maior expressão durante o desenvolvimento folicular (Figuras 4, 14 e 17), enquanto a TIMP-3 evidencia diminuição em sua expressão nos grupos G2 e G3 do experimento 2.

Como as MMPs estão super-expressas nesta fase estral, é esperado que a expressão de seu inibidor tecidual, TIMP-3, esteja com a expressão diminuída diante deste perfil. Entretanto, TIMP-1 apresenta-se super-expresso, pois o estímulo presencial das MMPs no microambiente faz com que a expressão deste inibidor aumente, a fim de regular o sistema, o que é importante para a homeostase fisiológica tecidual (revisado por Curry et al., 2001). Sendo assim, a diminuição da expressão do gene MMP-9 observada no grupo G2(experimento 2) está associada a alta expressão inibitória de TIMP-1 (Li et al., 2009).

Todavia, apesar de Kennedy et al. (1996) afirmar em que não há mudanças significativas na expressão de TIMP-2 durante a foliculogênese, foi observado um aumento expressivo na expressão deste inibidor durante a fase folicular inicial (grupo G2, experimento 2), bem como no experimento do ciclo natural (experimento 1), no qual as demais fases estrais mostraram expressões relativas menores em comparação ao
proestro. Como a expressão de \textit{MMP-2}, no mesmo grupo G2 apresentou-se elevada, a expressão aumentada de \textit{TIMP-2} pode ser explicada pelo fato de que o gene seja essencial para a ativação do pró-MMP2 (Shofuda \textit{et al.}, 1998).

Durante a ovulação, representada pela fase estro do experimento 1 e pelo G4 do experimento 2, há um estímulo hormonal (pico do hormônio LH ou injeção de hCG), que estimula a expressão e a ação de MMPs. Esta atividade aumentada de MMPs resulta no rompimento da parede folicular e expulsão do oócito para a fecundação (revisado por Curry \textit{et al.}, 2003).

Este fato pode ser observado entre 12 e 24h após a administração de hCG (entre grupos 4 e 5 do experimento 2), onde as \textit{MMPs} -2, -9, -13 e -19 tiveram alta expressão detectada (de acordo com a Figura 4). Corroborando estas observações, Jo e Curry (2004), descreveram a influência do hormônio LH na alta expressão de mRNAs provenientes do gene \textit{MMP-19} em ovários de ratas. Entretanto, no experimento 1, envolvendo o ciclo ovariano induzido, apenas as \textit{MMPs} -2, -9 e -19 mostraram tendência uma aumento expressivo na fase estro em relação às demais fases. A expressão de \textit{MMP-13} durante a fase estro natural foi a menor em relação ao ciclo estral como um todo, dado que deve ser revisto através da futura duplicata experimental, já que a ação da colagenase 13 (\textit{MMP-13}) é importante para a ruptura da parede do folículo de Graaf (Curry \textit{et al.}, 1985). A expressão de \textit{MMP-14} não apresentou variação expressiva durante a fase estro do experimento 1, e nem durante a ovulação induzida no experimento 2 (Tabela 4).
A resposta esperada dos inibidores TIMPs frente ao pico hormonal e o início da ovulação é a de um aumento em sua expressão, como observado na Figura 4 e apresentado no esquema da ação do Sistema de MMPs descrito durante o processo de ovulação. Foi observado que na fase estro (experimento 1) e nos grupos G4 e G5 do experimento 2, a TIMP-1 tem maior expressão relativa em comparação aos demais grupos experimentais. Esta super expressão da TIMP-1 já havia sido descrita por Reich et al. (1991). As variações nas expressões relativas tanto de TIMP-2 quanto TIMP-3 durante a ovulação apresentam controvérsia na literatura (Curry et al., 2001). O perfil gênico da expressão destas TIMPs nos experimentos 1 e 2 mostraram que ambas apresentaram ligeira queda quando comparados aos seus respectivos controles. Para que alguma hipótese seja feita é preciso realizar novos experimentos para confirmação deste resultado.

A luteinização é a fase em que ocorre a formação do corpo lúteo no ovário, que pode ser definida como a cicatrização tecidual decorrente da ovulação. Esta fase compreende a formação, manutenção e regressão do corpo lúteo (CL).

O CL se forma logo após a expulsão do oócito do foliculo ovariano. Durante a fase fértil da fêmea, ou seja, quando o oócito encontra-se na tuba uterina para uma possível fecundação pelo gameta masculino, o corpo lúteo formado no ovário é mantido, secretando hormônios (progesterona) até a formação placentária, envolvendo uma possível concepção ou até a excreção do oócito não fecundado. Quando a placenta é formada e começa a liberar hormônios para a manutenção da gestação ou, então, quando o oócito não fecundado é expulso do trato reprodutivo, há a regressão do CL.
formado, e o crescimento folicular pode ter um novo começo no caso de não-fecundação.

O Sistema MMPs tem grande papel durante esta fase luteal, cicatrizando e remodelando o tecido ovariano, assim como na neovascularização desta área decorrente desta fase (Smith et al., 1994). Durante a luteinização, o remodelamento da matriz extracelular possibilita não apenas a formação do CL, mas também a infiltração de células do sistema imune, como leucócitos. Os leucócitos secretam alta quantidade de MMPs, que atuam no remodelamento tecidual desta fase. Todavia, em resposta ao aumento expressivo de metaloproteinases, o hormônio hCG induz a expressão de TIMPs pelas células foliculares regulando as respectivas MMPs (Fedorcsák et al., 2010).

A fase inicial de formação luteal(Figura 4) apresenta alta expressão das MMP-2 e -9, porém nenhuma mudança expressiva no gene MMP-13. As MMP-14 e MMP-19 também não apresentam variabilidade significativa durante esta fase inicial (revisado por Curry et al., 2003). Os inibidores TIMPs -1, -2 e -3 também se mostram mais expressos neste momento, de acordo com esta mesma revisão.

No experimento 1, a fase de formação do CL é representada pelo metaestro. Sendo assim, apenas a expressão de MMP-9 está de acordo com os dados de literatura, visto que o aumento em sua expressão nesta fase é representativo. Este resultado é corroborado pela evidência de que há acumulo gradual de MMP-9 pelas células luteínicas no ovário (Fedorcsák et al., 2010).
As demais MMPs, bem como, as TIMPs -1, -2 e -3 demonstraram expressões bem menores às esperadas, o que mostra que a repetição independente do experimento é necessária para que os dados sejam significativos e comprovados.

No experimento 2, a formação do corpo lúteo é observada de 24 a 48h após a administração de hCG (G5 e G6), com aumento expressivo na expressão das MMPs -2, -9, -13 e -19. A expressão das MMPs -2, -9 e -19 no grupo G6 (transição entre final da ovulação e início da formação do CL) foi menor comparado à do grupo G5. Este dado evidencia que a expressão de MMPs é aumentada devido à ovulação e ao estímulo de hCG, e apresenta uma leve queda durante a formação do CL, mas aumenta gradativamente durante a fase luteal, quando ocorre a secreção de MMPs pelos leucócitos (revisado por Curry et al., 2001). Já a expressão das TIMPs no início da fase luteal no ciclo induzido não apresentou mudanças expressivas em relação ao grupo controle.


A expressão das TIMPs pelas células foliculares deveria estar aumentada durante a regressão luteal, conforme descrito anteriormente,em resposta ao aumento de
MMPs decorrente dos leucócitos. No ciclo natural e induzido, a expressão das TIMPs -1, -2 e -3 apresentou um ligeiro aumento em relação às fases anteriores.

A expressão da MMP-13 segue a correlação com a literatura e apresenta-se maior nesta fase do ciclo estral (grupo G9 – 14 dias após da administração de hCG) em relação às demais. Sendo assim, é possível correlacionar a expressão de MMP-13 com o remodelamento e cicatrização final sofrido pelo tecido ovariano.

As maiores expressões dos genes MMP-9 e MMP-19, e a menor expressão de MMP-2 durante a fase final da luteinização, obtidos pelo experimento 2, não corroboram com o perfil do Sistema MMPs. Entretanto, os valores das expressões gênica obtidas nos experimentos são expressivos. Um novo experimento será realizado para confirmação destes dados. O gene Basigin – BSG – é descrito como gene indutor de metaloproteinases de matriz. Sua expressão é detectada nas células do cumulus, bem como no corpo lúteo e estroma ovariano. Smedts et al. (2005), descreveu a alta expressão deste gene durante o crescimento folicular (0 a 48 horas após administração de eCG), quando também ocorre alta na expressão de MMP-2 e MMP-14.

Durante a ovulação, BSG mantém a expressão em estado platô, porém quando a formação do CL se inicia, a expressão do gene é aumentada, em decorrência da presença de hCG. Desta forma, o aumento de BSG induz a expressão de MMP-1 e MMP-2 no corpo lúteo nesta fase. O aumento expressivo de MMP-13 na regressão luteal também já foi relacionado com o aumento expressivo de BSG na mesma etapa (Smedts et al., 2005).
No experimento 1, a expressão de *BSG* apresentou-se mais alta na fase proestro, com expressão decrescente nas demais etapas, evidenciando o papel do gene no aumento da expressão das metaloproteinases durante a foliculogênese (proestro). Sua alta expressão está relacionada, provavelmente, com a indução hormonal (eCG) que coordena o desenvolvimento folicular. Todavia, durante a luteinização natural, não foi detectada expressão significativa do gene como descrito anteriormente. Esse resultado pode estar relacionado à ausência do aumento na expressão de *MMP-13* no mesmo período.

No experimento 2, apenas no decorrer da manutenção luteal (8 dias depois da injeção de hCG), observou-se um aumento na expressão de *BSG*, sendo que nos grupos que representam a foliculogênese e a ovulação, a expressão foi bem menor em relação ao grupo controle.


Na literatura, ainda não foi descrita nenhuma correlação entre a expressão do gene *SPARC* com o perfil do Sistema MMPs no ciclo ovariano. Este trabalho é o primeiro a analisar esta possível relação,
No experimento 2, com a indução hormonal do ciclo reprodutivo, não foi detectada diferença expressiva de \textit{SPARC} em comparação com o grupo controle.

Todavia, na análise da expressão gênica durante o ciclo estral natural, a expressão de \textit{SPARC} apresentou-se significativamente aumentada no proestro e diminuída no diestro. Estes resultados correlacionam a alta na expressão das MMPs durante a foliculogênese com a alta expressão de \textit{SPARC}, que induziria a expressão destas metaloproteínases no ciclo estral.

Os dados contraditórios entre os dois experimentos realizados em comparação com a literatura podem indicar que \textit{SPARC} talvez não esteja relacionado à regulação do Sistema MMPs ovariano, a qual se daria por outra via, a que relacionaria o gene \textit{BSG} à regulação); ou poderiam existir diferenças de reguladores do Sistema MMPs entre espécies diferentes, sendo que, em ratas, o gene \textit{SPARC} não se relaciona com esta função. No entanto, considerando os dados do experimento 1, esta hipótese não é sustentada, sendo necessários experimentos complementares para uma afirmação.

A expressão do gene \textit{RECK} está relacionada à inibição da atividade das metaloproteínases de matriz, MMPs, em câncer. De acordo com a revisão de Meng \textit{et al.}, 2008, quando há alta expressão de gene \textit{RECK}, as MMPs -2 e -9 apresentam baixa expressão. Propõe-se que a inibição dessas MMPs por \textit{RECK} ocorre de acordo com a via esquematizada na Figura 3.

Durante o crescimento folicular observado em ambos os experimentos, a expressão de \textit{RECK} foi representativamente maior, podendo ser relacionado à diminuta expressão da \textit{MMP-9} na mesma fase (Takagi \textit{et al.}, 2009). Esta evidência talvez
colabore para a hipótese de inibição da MMP-9 por RECK neste modelo de ciclo ovariano, já que este impede a liberação da pró-MMP-9 para ativação e funcionalidade na matriz extracelular (Takahashi et al., 1998).

Porém, uma correlação com as demais MMPs e com as outras fases do ciclo não pode ser descrita devido à pequena variação expressiva encontrada em relação ao controle experimental. Porém, experimentos complementares devem ser realizados de modo a elucidar melhor este processo e confirmar a hipótese da inibição de MMP-9 por RECK na foliculogênese.
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A matriz extracelular é um ambiente importante para a dinâmica de cascatas metabólicas e vias que regulam o seu remodelamento, possibilitando o crescimento folicular, ovulação e fase luteal do ciclo ovariano.

O Sistema MMPs tem papel essencial na reestruturação da MEC. Seus reguladores fazem-se assim, agentes importantes durante o ciclo reprodutivo feminino. Este balanço entre as MMPs e seus reguladores é um tópico que exige conhecimento, pois o remodelamento da MEC está envolvido em vários processos fisiológicos e patológicos.

Como observado nos experimentos, as MMPs estão diferencialmente expressas ao longo das diferentes fases do ciclo estral, além de haver evidências de que há diferenças na expressão do Sistema MMPs no ciclo ovariano natural e no ciclo induzido por hormônios, mostrando que a intervenção hormonal induz a expressão diferenciada de algumas MMPs durante o decorrer das fases.

O gene BSG teve expressão semelhante, em parte (descrever), àquela descrita na literatura.

RECK apresentou evidências de que esteja inversamente proporcional à expressão de MMP-9 neste modelo.

Todavia, na expressão do gene SPARC, não foi detecta diferença significativa durante o ciclo estral induzido, mostrando-se aumentado apenas durante o proestro natural. Este resultado indica que o gene SPARC não está relacionado à regulação do remodelamento da MEC de ovário durante o ciclo reprodutivo induzido em ratas.
7. PERSPECTIVAS

Frente aos resultados favoráveis obtidos, espera-se analisar ainda a expressão de tais genes nas amostras uterinas já coletadas nas mesmas condições experimentais, pois o perfil de expressão de MMPs e TIMPs durante o ciclo estral no útero já é conhecido na literatura, mas a correlação dos mesmos com os genes RECK, SPARC e BSG ainda não foi descrita.

Será realizada a análise da expressão de MMPs e TIMPs em relação aos seus genes reguladores durante a histogênese e desenvolvimento ovariano e uterino em ratas. Os experimentos com os animais já foram realizados, bem como a coleta de material de útero e ovários de fêmeas em diversas fases fetais, neonatas, puberdade, gestação e senescência reprodutiva.

Pretende-se ainda realizar experimentos de imunohistoquímica e hibridação in situ que completarão os dados obtidos no qRT-PCR com a localização tanto do mRNA quanto das proteínas traduzidas destes, em todos os pontos experimentais propostos e já mencionados. Os ovários colaterais daqueles utilizados para a extração de RNA dos experimentos descritos neste trabalho foram emblocados em parafina e será realizada a imunohistoquímica das respectivas proteínas.

Da mesma forma, estes experimentos serão realizados em duplicatas independentes para comparação estatística dos resultados obtidos.
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


Mazauda S., Guoyot B, Guigona C.J., Couadouela N., Magueresse-Battistonib B.L., Magre S. Basal membrane remodeling during follicle histogenesis in the rat ovary: contribution of proteinases of the MMP and PA families. *Developmental


Apoio e Agências Financiadoras