

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

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

Universidade Estadual Paulista-“Julio de Mesquita Filho”

Universidade de São Paulo – Instituto de Química, Departamento de Bioquímica

**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

“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
<i>Matriz Extracelular e remodelamento</i>	6
<i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases – TIMPs</i>	8
<i>Basigin, BSG, gene indutor de MMPs</i>	10
<i>Gene RECK, regulador de metaloproteinases de matriz</i>	11
<i>SPARC, outro possível regulador de MMPs</i>	13
<i>Ovário – constante remodelamento tecidual</i>	14
2. OBJETIVO	18
<i>Objetivo Geral</i>	18
<i>Objetivos Específicos</i>	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
(1) <i>Avaliação da expressão gênica dos genes alvos durante o ciclo estral natural</i>	
(A) <i>Modelo Animal</i>	19
(B) <i>Extração de RNA total</i>	25
(C) <i>Geração de cDNA</i>	26
(D) <i>qRT-PCR</i>	27
(E) <i>Análise Estatística</i>	29
(2) <i>Avaliação da expressão gênica perante estímulo hormonal</i>	
(A) <i>Modelo Animal</i>	24
(B) <i>Extração de RNA total</i>	25
(C) <i>Geração de cDNA</i>	26
(D) <i>qRT-PCR</i>	27
(E) <i>Análise Estatística</i>	29
4. RESULTADOS	32
<i>Experimento 1</i>	32
<i>Experimento 2</i>	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 Rifikin, 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: collagenases, gelatinases, estromalisinas 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*.

Family	Enzyme	MMP Number	Matrix substrates of functions
Collagenases	Interstitial collagenase	MMP-1	Collagens I, II, III, VII, X, IGFBP-3
	Neutrophil Collagenase	MMP-8	Collagens I, II, III
	Collagenase-3	MMP-13	Collagens I, II, III
	Collagenase-4 (Xenopus)	MMP-18	Collagen I
Gelatinases	Gelatinase A	MMP-2	Gelatins, collagens IV, V, VII, X and XI, fibronectin, laminin, plasminogen
	Gelatinase B	MMP-9	Gelatins, collagens IV, V, XIV, fibronectin, plasminogen
Stromelysins	Stromelysin-1	MMP-3	Gelatins, fibronectin, laminin, collagens III, IV, IX, X, vitronectin, proteoglycan, ECAD, IGFBP-3, activates proMMP-1
	Stromelysin-2	MMP-10	Fibronectin, collagen IV
	Stromelysin-3	MMP-11	Fibronectin, laminin, collagen IV, gelatin
	Enamelysin	MMP-20	Amelogenin
Membrane-type <i>MMPs</i>	MT1-MMP	MMP-14	Collagens I, II, III, fibronectin, laminin, vitronectin: activates proMMP-2 and proMMP-13
	MT2-MMP	MMP-15	Gelatin, fibronectin, laminin: activates proMMP-2, collagen I, III, nidogen, tenascin, aggrecan, perlecan
	MT3-MMP	MMP-16	Collagen III, fibronectin, gelatin, activates proMMP-2
	MT4-MMP	MMP-17	Gelatin, proMMP-2, proTACE-substrate
	MT5-MMP	MMP-24	ProMMP-2
	MTMMP-6 (Leukolysin)	MMP-24	Collagen IV, gelatin, fibronectin, fibrin
Others	Matrilysin	MMP-7	Fibronectin, laminin, gelatins, collagen IV, plasminogen, proteoglycan
	Metalloelastase	MMP-12	Elastin, plasminogen
	Unnamed	MMP-19	Not known
	xMMP	MMP-21	Not known
	cMMP	MMP-22	Casein
	Unnamed	MMP-23	Not known
	Matrilysin 2 (Endometase)	MMP-26	Fibrinogen, fibronectin, vitronectin, gelatin, collagen I, IV, proMMP-9
	Epilysin	MMP-28	Casein

A família de *MMPs* apresenta uma estrutura comum a todas proteínas, que inclui um sinal peptídico, um domínio pro-peptídeo, um domínio catalítico com sítio de

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 collagenases, 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 processos: ao desenvolvimento embrionário (Sato *et*

al., 1994), possuem ação anti-angiogênica (Johnson *et al.*, 1994), correlacionam-se com a indução do ciclo celular e apoptose (Talhounk *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).

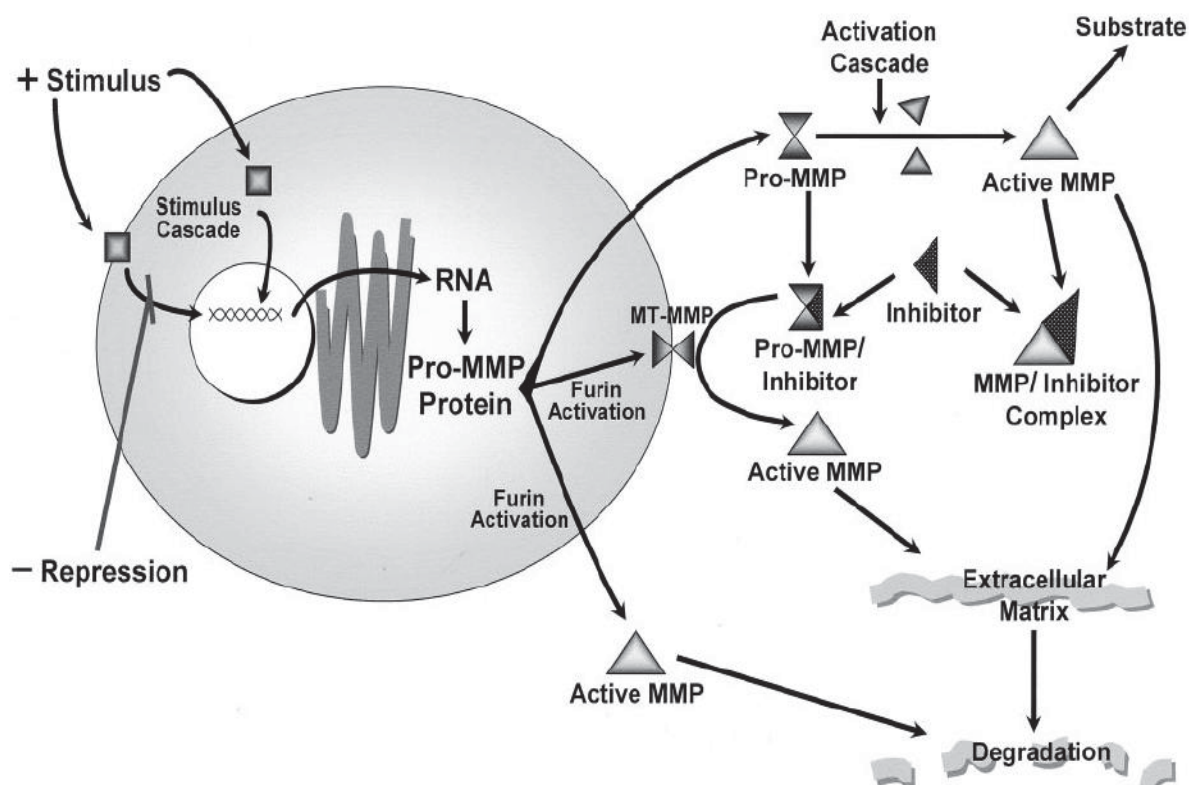
A primeira TIMP descrita, a TIMP1, com peso molecular de 29kDa, possui afinidade por collagenases e MMP9, e induz a produção de estradiol pelas células granulosas do folículo ovariano (Li *et al.*, 2009). A TIMP2, com peso molecular de 23kDa, tem sua regulação e secreção diferenciada das demais TIMPs, 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*

immunoglobulin 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 (Muramatsu *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 folículo 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.

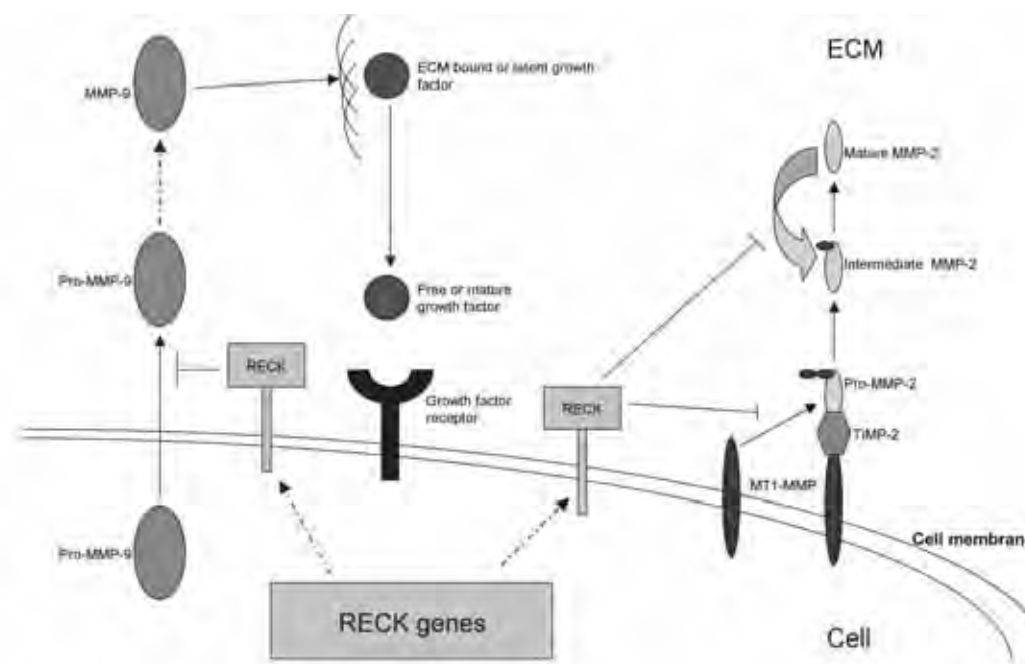
Gene RECK, regulador de metaloproteinases de matriz

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 *RECK* no ovário durante os processos de foliculogênese, ovulação e luteinização, bem como sua relação na regulação do balanço MMPs/TIMPs nestes processos.

SPARC, outro possível regulador de MMPs

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

Alguns estudos relatam um aumento na produção de collagenases por fibroblastos (Tremble *et al.*, 1993) e monócitos (Shankava *et al.*, 1997) na presença de SPARC. Shankava *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 conseqüentemente maior produção de MMPs (Shankava *et al.*, 1997). Ford *et al.* (1993) demonstrou a correlação de SPARC e TGF- β ao observar a indução de TGF- β 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 folículo primário em um folículo de Graaf, que por sua vez, libertará o oócito 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 oócito 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 (revisado 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.

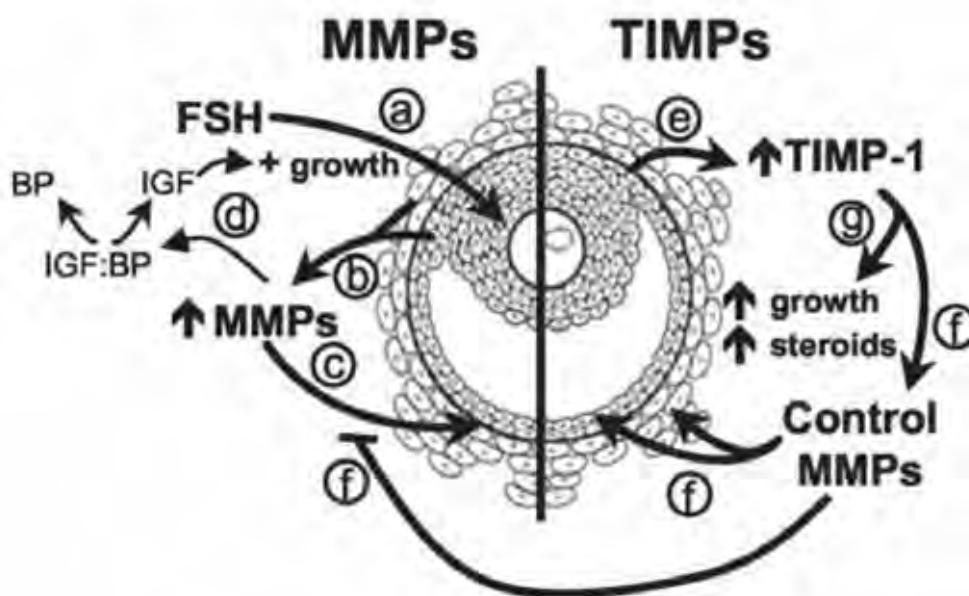
Figura 4. Resumo da expressão do Sistema MMP nas diferentes fases do ciclo menstrual em primatas e do ciclo estral em ratas. O nível de expressão gênica na fase determinada está representada por: alta expressão (↑), baixa expressão (↓) e sem alteração (–) detectada na expressão do gene.

	Follicular development	Ovulation	Luteal formation	Luteal regression
Primate	?	↑ MMP-1, ↑ MMP-2, ↑ MMP-9 ↑ TIMP-1, ↑ TIMP-2	– MMP-1, – MMP-2, ↑ MMP-9, – TIMP-1	↑ MMP-2, ↑ MMP-9, ↓/– TIMP-1, – TIMP-2
Rat	↑ MMP-2, ↑ MMP-9 ↑ TIMP-1, – TIMP-2, ↓ TIMP-3	↑ MMP-2, ↑/– MMP-9, ↑ MMP-13 ↑ MMP-19, – MMP-14 ↑ TIMP-1, – TIMP-2, ↑/– TIMP-3	↑ MMP-2, ↑ MMP-9, – MMP-13 ↑ TIMP-1, – TIMP-2, – TIMP-3	– MMP-2, ↑/– MMP-9, ↑ MMP-13, ↑ TIMP-1, – TIMP-2, ↑ TIMP-3

De acordo com a Figura 5, abaixo, o hormônio folículo-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

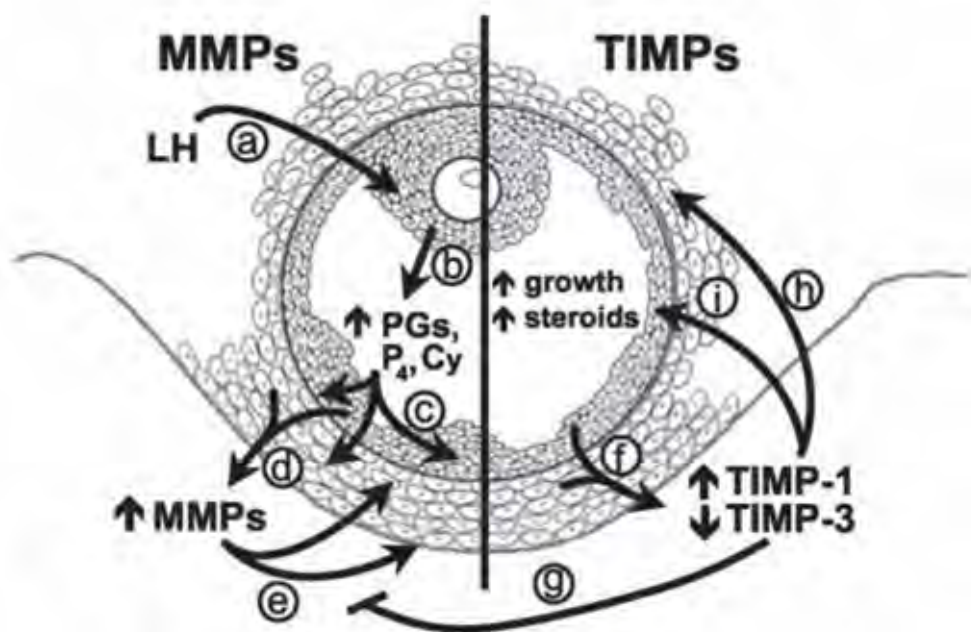
foliculogênese, as MMPs expressas podem também se ligar a IGFBP e, conseqüentemente, interferir no crescimento do folículo (revisado por Curry *et al.*, 2003).

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 folículo 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 visando 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.

(1) 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 doseu 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 lâminas 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.



Figura 8: Detalhe da coleta do lavado vaginal nas ratas.



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).

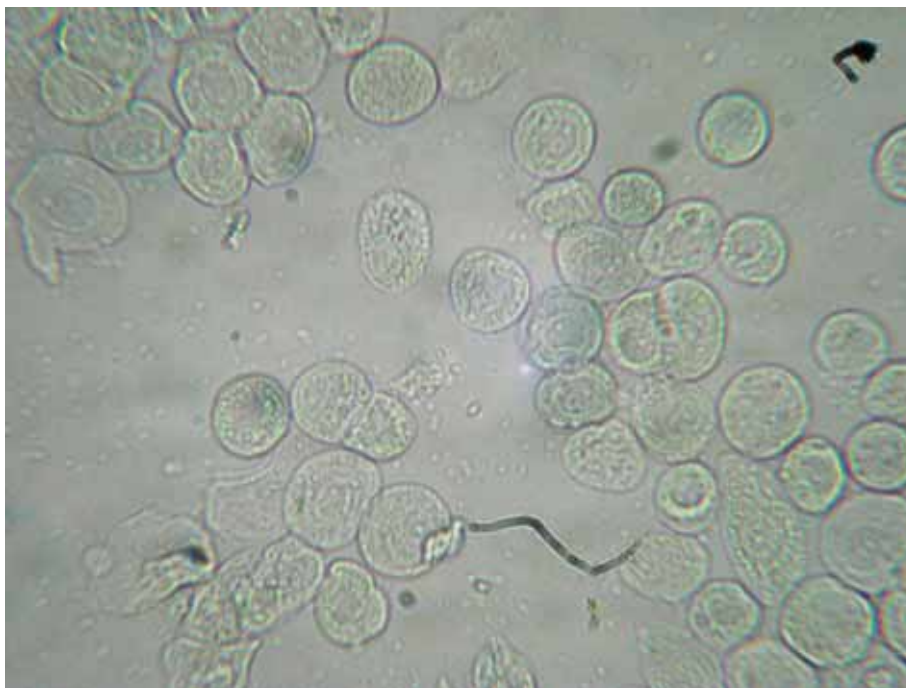


Figura 10: Fase do Ciclo Estral: Estro. Esfregaço consiste principalmente de células cornificadas anucleadas no esfregaço (aumento 40x).

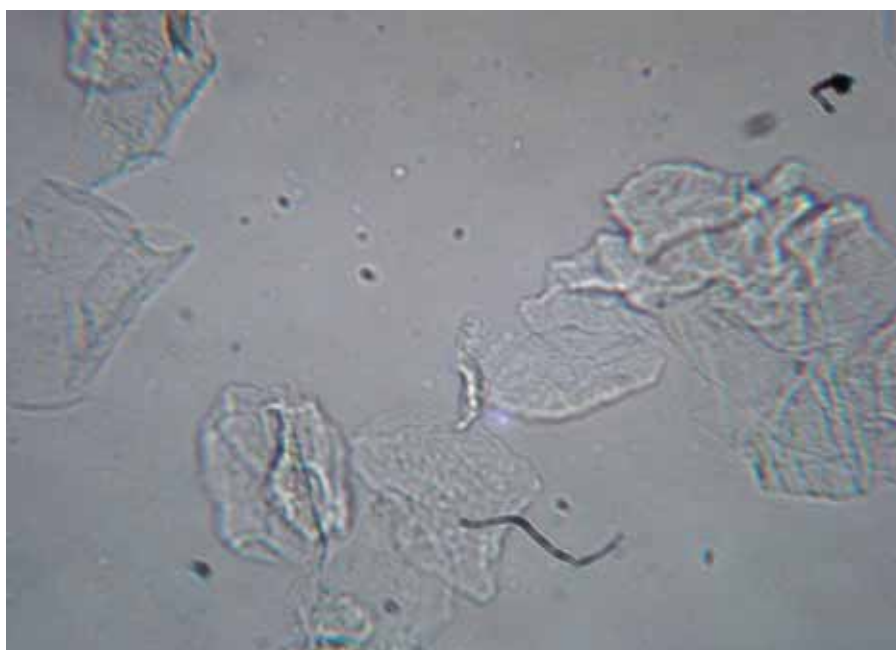
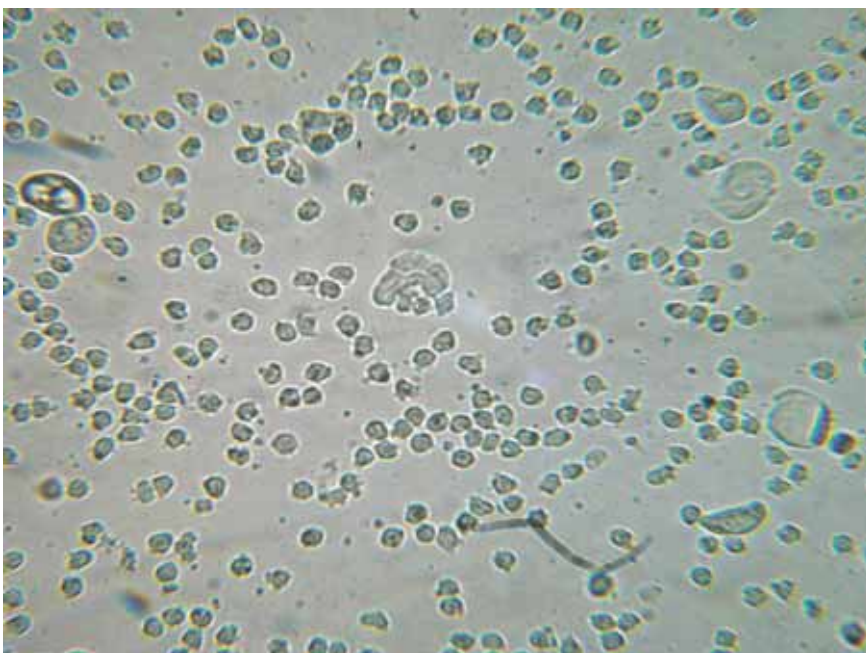


Figura 11: Fase do Ciclo Estral: Metaestro. O esfregaço é composto células epiteliais, células cornificadas e leucócitos na mesma proporção (aumento 40x).



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 foliculogênese 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

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

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 4°C; (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 4°C 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 °C. Depois de retirado o sobrenadante, as amostras de RNA foram ressuspensas 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 37°C e 75°C por 5 min. Em seguida, para inativação da enzima, a amostra foi incubada a 65°C 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 25°C por 10 min, para anelamento dos *primers*, a 42°C por 2 h, onde ocorreu a reação de transcrição reversa, e em seguida, para a inativação das enzimas houve a incubação a 75°C 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 37°C por 30 min, seguidos de uma etapa de 72°C 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 -20°C.

(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.

<i>Primer</i>	Concentração utilizada	<i>Forward Sequence</i>	<i>Reverse Sequence</i>
MMP 2	200 nM	CGATGTCTCCCCAAAACAG	GCAGCCATAGAAAGTGTTTCAGGTA
MMP 9	400 nM	CGACATAAAAGGCATCCAGCAT	GGAGGCCTTGGGTCAGGTT
MMP 13	200 nM	GGGACGCCCATTTTGATG	TGGGCAGCAACAATAAATAAGTTG
MMP 14	200 nM	CAAAGGTTCTATGGTTTACAAGTGACA	CGCCTCATAGCCTTCATCGT
MMP 19	200 nM	GGAGCTGATGACTTCAGGCTAGA	CAGTTCAGATGCTTCCTGGAAA
TIMP 1	100 nM	ACCCACCCACAGACAGCTTT	GGAACCCATGAATTTAGCCCTTA
TIMP 2	100 nM	CAGGCGTTTGTCAATGCA	CCTCCTTCTCGCTCACTGCTT
TIMP 3	200 nM	CCAGGATGCCTTCTGCAACT	GCTTCTTTCCCACTTTGG
BSG	200 nM	GCGGCGGGCACCAT	AAGCAGGTAAGCTGTGTCTTGGA
RECK	400 nM	AAAGTTTGAGGAAAGAATATGAGAAC	CACACCGAGCCCATTTTCATT
SPARC	400 nM	CCTGGATCTTCTTTCTCCTTTGC	TTTCTCCGCCACCATCTC
Actina	100 nM	ACCCGCGAGTACAACCTTCTT	TATCGTCATCCATGGCGAACT
HPRT	200 nM	CCGACCGGTTCTGTGATGTC	CATAACCTGGTTCATCATCACTAATCA
Tubulina	100 nM	CATTGGGACCATCAAAAAAAGATT	GCTCAGCTCCCTCTGTGTAGTGA

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:

$$Ef = 10^{-1/\text{coeficiente angular}}$$

$$Ef (\%) = (Ef - 1) \times 100$$

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 ΔC_p . O cálculo do ΔC_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:

$$ratio = \frac{Ef_{gene\text{alvo}}^{\Delta CP_{gene\text{alvo}}}}{Ef_{controle\text{endógeno}}^{\Delta CP_{controle\text{endógeno}}}}$$

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.

Condições Experimentais	MMP2	MMP9	MMP13	MMP14	MMP19	TIMP1	TIMP2	TIMP3	RECK	SPARC	BSG
Proestro	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Estro	0.232	3.413	0.002	0.021	0.058	0.150	0.018	0.006	0.021	0.021	0.061
Metaestro	0.099	107.619	0.003	0.039	0.044	0.020	0.025	0.012	0.038	0.021	0.043
Diestro	0.118	37.172	0.011	0.022	0.024	0.021	0.009	0.006	0.015	0.011	0.025

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.

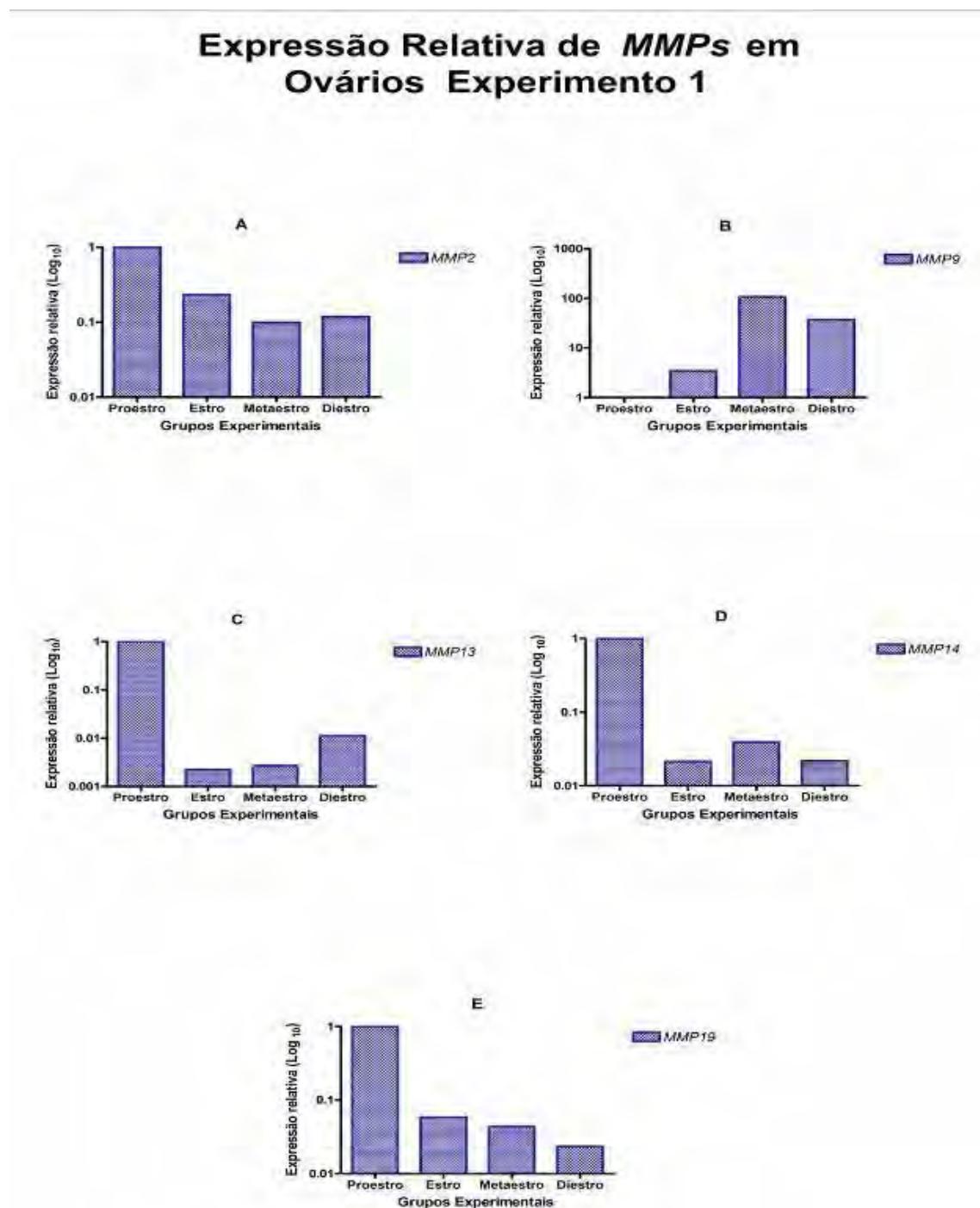
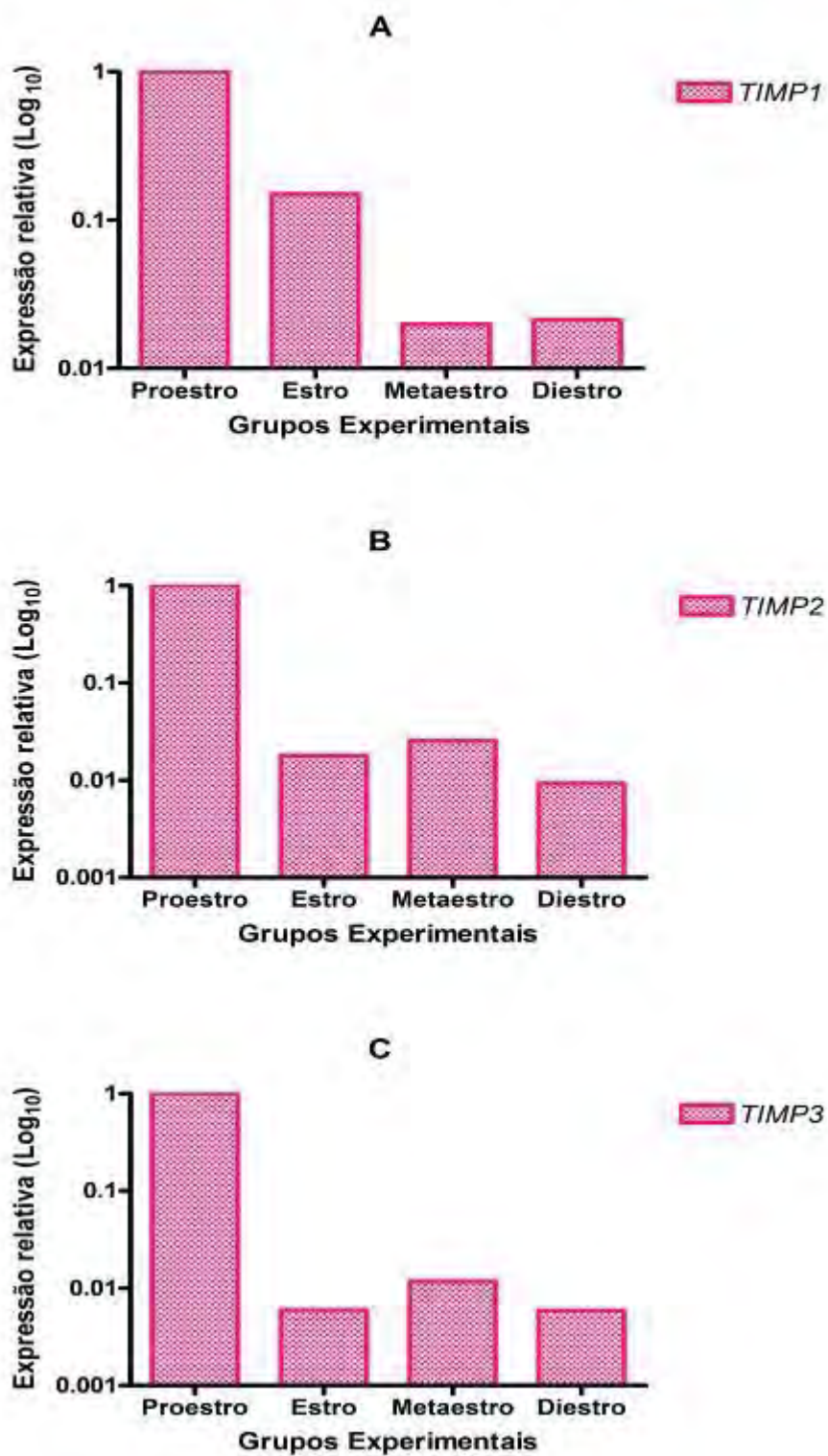


Figura 14 – Expressão relativa de *TIMPs* em ovários de ratas púberes nas diversas fases do ciclo estral.

Expressão Relativa de *TIMPs* em Ovários Experimento 1



Expressão de *RECK*, *SPARC* e *BSG*

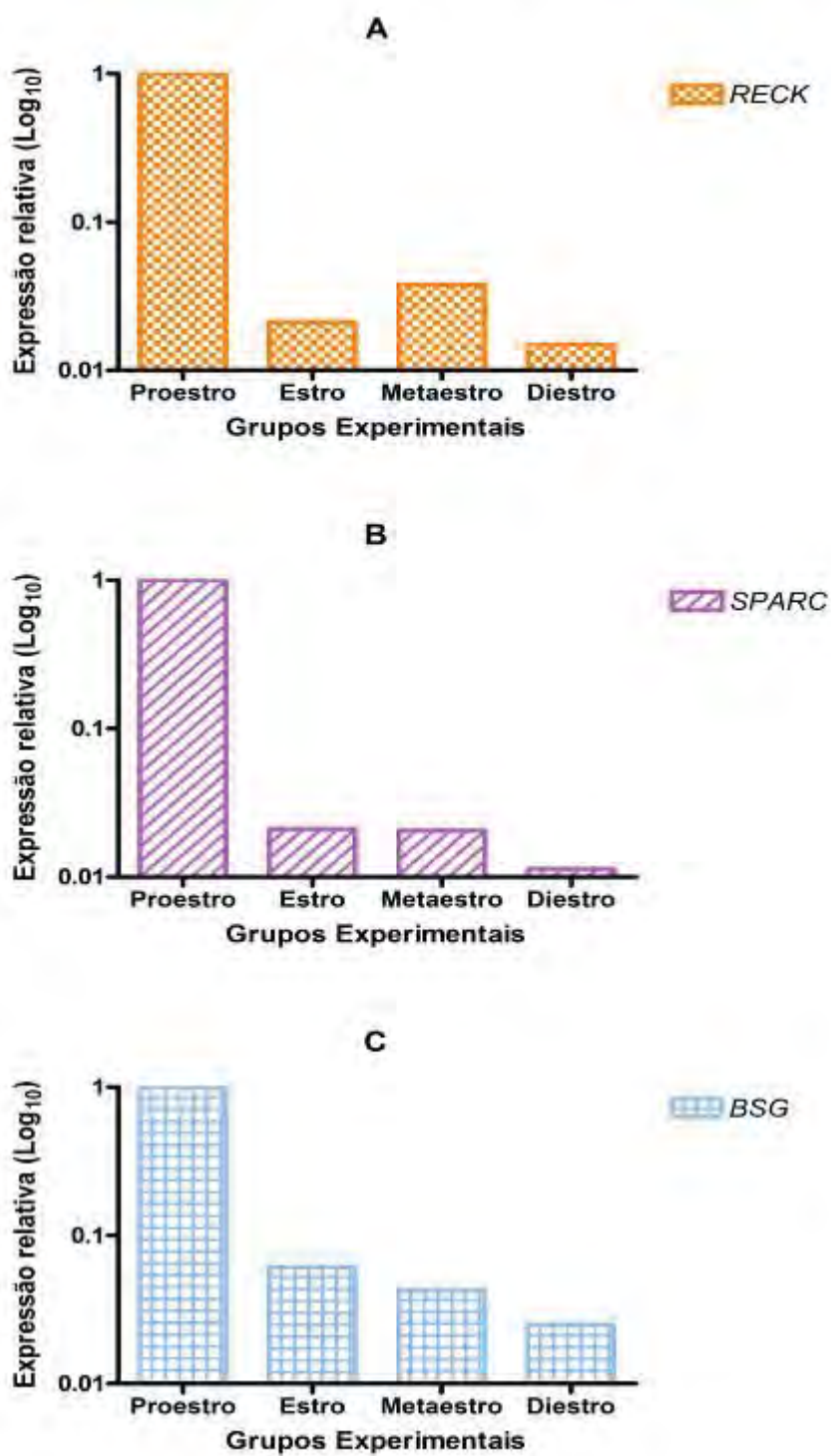
O gene *RECK* apresentou expressões semelhantes e significativamente diminuídas nas fases estro, metaestro e diestro comparadas à fase proestro, conforme representado na Figura 15-A.

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



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.

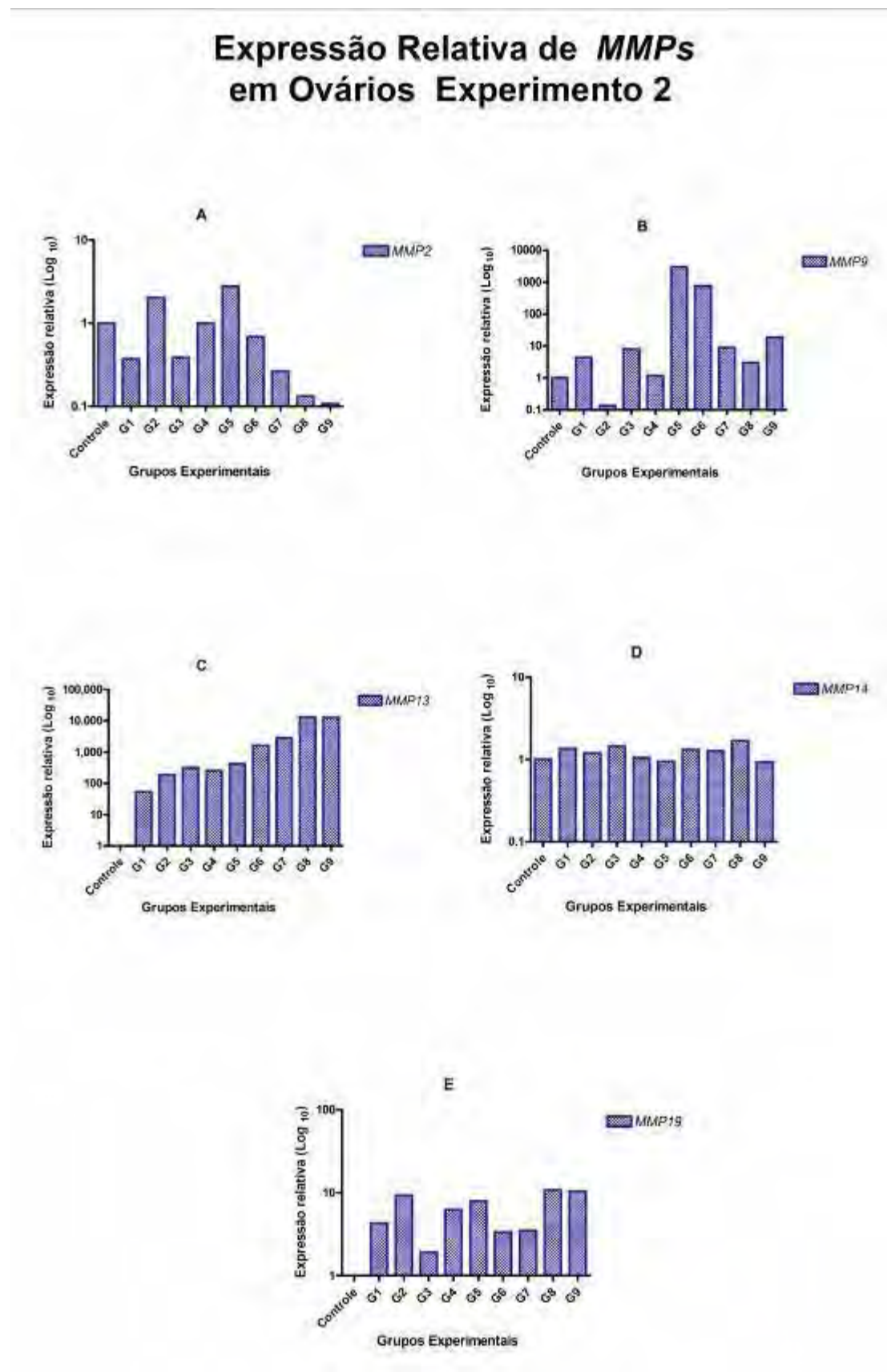
Tabela 4. Quantificação das expressões gênicas dos genes-alvo relativas ao controle (PBSA) do experimento 2.

Condições Experimentais	MMP2	MMP9	MMP13	MMP14	MMP19	TIMP1	TIMP2	TIMP3	RECK	SPARC	BSG
Controle	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
G1	0.371	4.376	53.302	1.358	4.300	1.048	1.197	1.208	2.716	0.931	1.297
G2	2.023	0.134	187.589	1.194	9.282	5.346	3.985	0.350	4.952	1.484	0.535
G3	0.387	7.978	323.541	1.448	1.911	0.716	0.573	0.378	0.598	0.624	0.338
G4	1.001	1.185	255.566	1.048	6.245	6.391	0.594	0.225	0.414	0.578	0.274
G5	2.783	3052.597	417.945	0.950	7.969	4.892	0.726	0.314	0.551	0.966	0.413
G6	0.687	764.704	1641.505	1.321	3.328	1.130	0.477	0.946	0.313	1.649	0.425
G7	0.264	8.967	2898.465	1.266	3.489	0.502	0.309	0.667	0.771	1.035	0.610
G8	0.132	2.994	13196.918	1.698	10.781	1.156	1.279	1.563	1.602	1.346	3.743
G9	0.107	18.766	12647.554	0.939	10.400	1.272	0.743	0.961	0.598	1.031	1.035

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 estímulo 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).

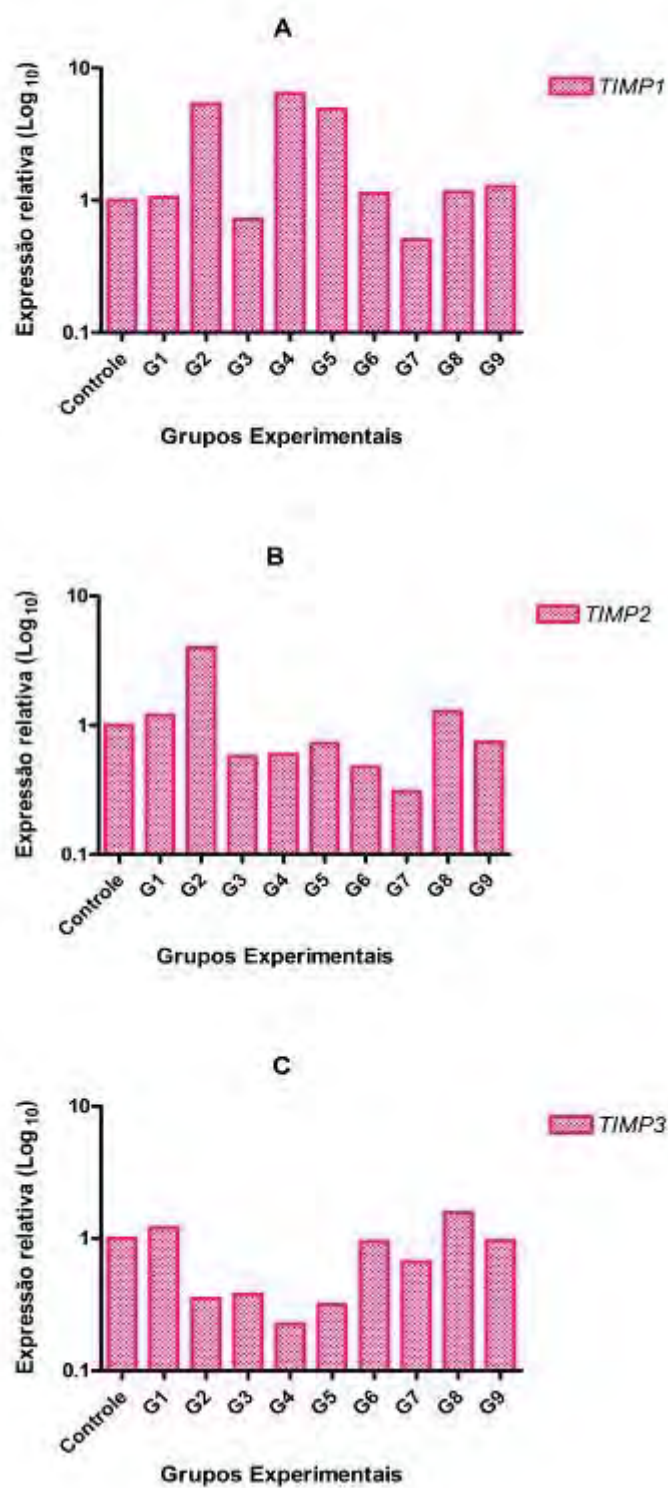
Na Figura 16-B, pode-se observar ampla variabilidade na expressão do gene *MMP-9* ao longo dos grupos. Os grupos G5 e G6 tiveram um aumento expressivo de até 3.000 vezes em relação ao controle. O grupo G2 que apresentou a menor expressão. Os demais grupos apresentaram expressão semelhante ou pouca diferença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

Expressão de *TIMPs*

Os resultados para *TIMP-1* mostraram que 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 estímulo hormonal.

Expressão Relativa de *TIMPs* em Ovários Experimento 2



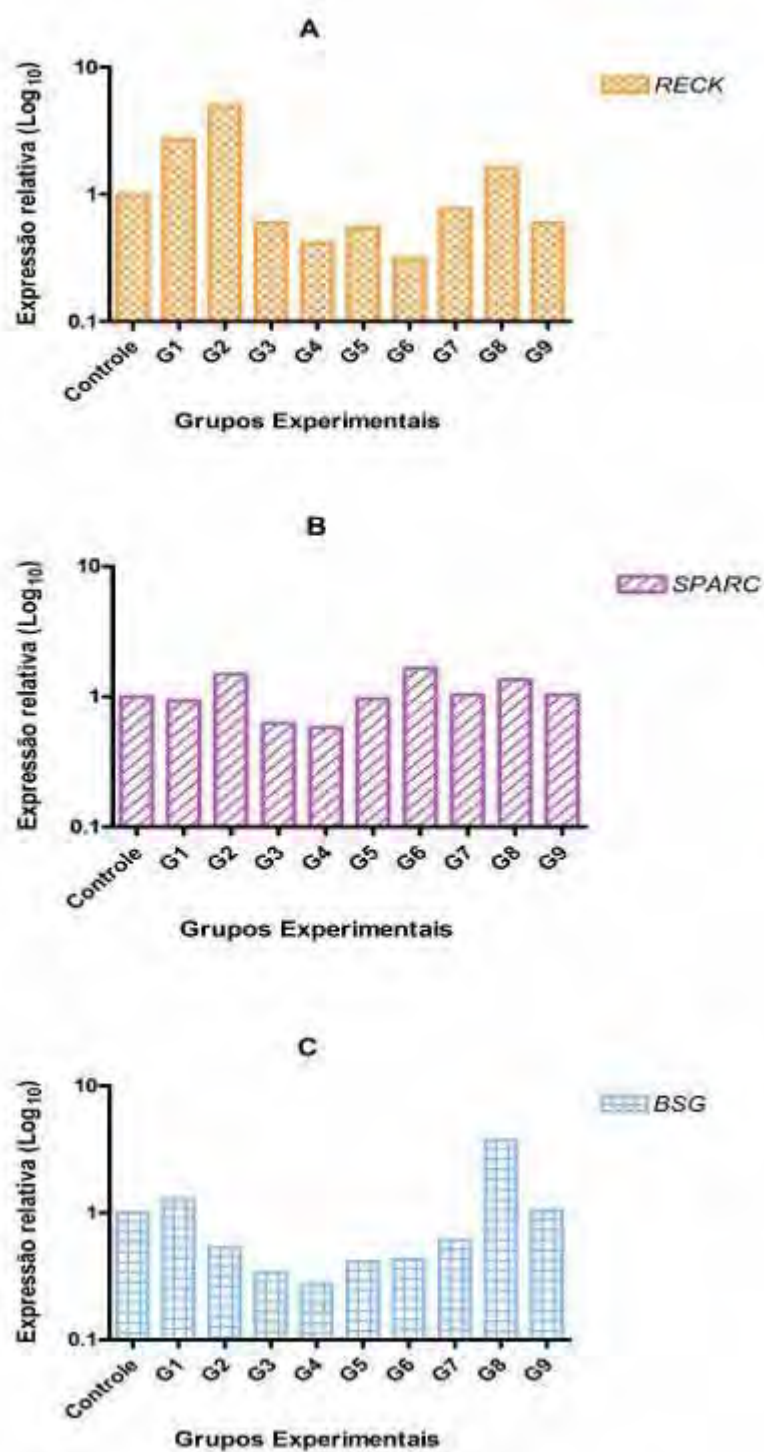
Expressão de *RECK*, *SPARC* e *BSG*

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.

Expressão Relativa de *RECK*, *SPARC* e *BSG* em Ovários Experimento 2



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 *MMPs*-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 do 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 *MMP-2*, no mesmo grupo G2 apresentou-se elevada, a expressão aumentada de *TIMP-2* pode ser explicada pelo fato de que o gene seja essencial para a ativação do pró-MMP2 (Shofuda *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 *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 *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 *MMP-19* em ovários de ratas. Entretanto, no experimento 1, envolvendo o ciclo ovariano induzido, apenas as *MMPs -2, -9 e -19* mostraram tendência uma aumento expressivo na fase estro em relação às demais fases. A expressão de *MMP-13* durante a fase estro natural foi a menor em relação ao ciclo estral como um todo, dado este que deve ser revisto através da futura duplicata experimental, já que a ação da collagenase 13 (*MMP-13*) é importante para a ruptura da parede do folículo de Graaf (Curry *et al.*, 1985). A expressão de *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 folículo 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 acúmulo 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 começo 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 com relação ao grupo controle.

Na fase final da luteinização e regressão do corpo lúteo, corroborando os dados apresentados na revisão de Curry *et al.*(2003) apenas a *MMP-13* teve uma mudança representativa em sua expressão, com aumento da produção de seu mRNA durante a transição da fase diestro para proestro de ratas (Nothnick *et al.*, 1996). Isso explica-se pelo fato de que os níveis de progesterona estão bem minimizados nesta etapa do ciclo reprodutivo.

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.

O gene *SPARC* é descrito como um possível regulador de MMPs, por estar relacionado a tumores agressivos e metastásicos (revisado por Podhajcer *et al.*, 2008). A literatura descreve que em resposta à alta expressão de *SPARC*, detectou-se o aumento na expressão das *MMPs* -1, -9 (Shankava *et al.*, 1997) e *MMP-14* (McClung *et al.*, 2007). Em gliomas, *SPARC* também se relaciona ao aumento observado na expressão das *MMPs* -2, -3 e -9 (Rich *et al.*, 2003).

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 *SPARC* em comparação com o grupo controle.

Todavia, na análise da expressão gênica durante o ciclo estral natural, a expressão de *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 *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 *SPARC* talvez não esteja relacionado à regulação do Sistema MMPs ovariano, a qual se daria por outra via, a que relacionaria o gene *BSG* à regulação); ou poderiam existir diferenças de reguladores do Sistema MMPs entre espécies diferentes, sendo que, em ratas, o gene *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 *RECK* está relacionada à inibição da atividade das metaloproteínases de matriz, MMPs, em câncer. De acordo com a revisão de Meng *et al.*, 2008, quando há alta expressão de gene *RECK*, as MMPs -2 e -9 apresentam baixa expressão. Propõe-se que a inibição dessas MMPs por *RECK* ocorre de acordo com a via esquematizada na Figura 3.

Durante o crescimento folicular observado em ambos os experimentos, a expressão de *RECK* foi representativamente maior, podendo ser relacionado à diminuta expressão da *MMP-9* na mesma fase (Takagi *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 detectada 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

- Bagavandoss P. Differential distribution of gelatinases and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the rat ovar y. *J Endocrinol* 1998; **158**:221–228.
- Birkedal-Hansen H., Moore W.G.I., Bodden M.K. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; **4**:197–250.
- Biswas C., Zhang Y., DeCastro R., Guo H., Nakamura T., Kataoka H., Nabeshima K. The human tumor cell-derived collagenase stimulator y factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily. *Cancer Res* 1995; **55**:434 – 439.
- Borkakoti N. Structural studies of matrix metalloproteinases. *J Mol Med* 2000; **78**:261–268.
- Clark I.M., Swingler T.E., Sampieri C.L., Edwards D.R. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; **40**: 1362–1378.
- Cooke R.G., Nothnick W.B., Komar C., Burns P.D., Curry T.E. Jr. Collagenase and gelatinase messenger ribonucleic acid expression and activity during follicular development in the rat ovary. *Biol Reprod* 1999; **61**: 1309 –1316.
- Curry T.E. Jr, Dean D.D., Woessner J.F. Jr, LeMaire W.J. The extraction of a tissue collagenase associated with ovulation in the rat. *Biol Reprod* 1985; **33**: 981–991.
- Curry Jr T.E., Osteen K.G. Cyclic Changes in the Matrix Metalloproteinase System in the Ovary and Uterus. *Biol Reprod* 2001; **64**: 1285–1296.
- Curry Jr T.E., Osteen K.G. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocr Rev* 2003 **24**: 428 – 465.
- D’Ascenzo S., Giusti I., Millimaggi D., Marci R., Tatone C., Colonna R.C., Moscarini M., Pavan A., Dolo V. and Caserta D. Intrafollicular expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in normally ovulating women compared with patients undergoing in vitro fertilization treatment. *European Journal of Endocrinology* 2004; **151**: 87–91.
- Espey L.L., Lipner H. Ovulation. In: Knobil E, Neill J (eds.), *The Physiology of Reproduction, 2nd Edition*. New York: Raven Press 1994: 725–780.
- Fan Q.W., Yuasa S., Kuno N., Senda T., Kobayashi M., Muramatsu T., Kadomatsu K. Expression of basigin, a member of the immunoglobulin superfamily, in the mouse central ner vous system. *Neurosci Res* 1998; **30**:53–63.
- Fedorcsák P., Polec A., Ráki M., Holm R., Jeben P., and Åbyholm T. Differential Release of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases by Human Granulosa-Lutein Cells and Ovarian Leukocytes. *Endocrinology* 2010, **151**(3): 1290 –1298.
- Ford, R., Wang, G., Jannati, P., Adler, D., Racanelli, P., Higgins, P. J., et al.. Modulation of SPARC expression during butyrate-induced terminal differentiation of cultured human keratinocytes: Regulation via a TGF-beta-dependent pathway. *Experimental Cell Research* 1993; **206**(2): 261–275.
- Fujita T., Shiba H., Sakata M., Uchida Y., Nakamura S., Kurihara H. SPARC stimulates the synthesis of OPG/ OCIF, MMP-2 and DNA in human periodontal ligament cells. *J Oral Pathol Med* 2002; ISSN 0904-2512.
- Gomez D.E., Alonzo D.F., Yoshiji H., Thorgeirsson U.P. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997; **74**:111–122.
- Greenwald G.S., Roy S.K. Follicular development and its control. In: Knobil E, Neill J (eds.), *The Physiology of Reproduction, 2nd Edition*. New York: Raven Press; 1994: 629 –724.

Haber C.L., Gottifredi V., Llera A.S., Salvatierra E., Prada F., Alonso L., Helene S.E. and Podhajcer O.L. SPARC modulates the proliferation of stromal but not melanoma cells unless endogenous SPARC expression is downregulated. *Int. J. Cancer* 2008; **122**, 1465–1475.

Huet C., Monget P., Pisselet C., Hennequet C., Locatelli A., Monniaux D. Chronology of events accompanying follicular atresia in hypophysectomized ewes. Changes in levels of steroidogenic enzymes, connexin 43, insulin-like growth factor II mannose 6phosphate receptor, extracellular matrix components, and matrix metalloproteinases. *Biol Reprod* 1998; **58**: 175–185.

Igakura T., Kadomatsu K., Kaname T., Muramatsu H., Fan Q.W., Miyauchi T., Toyama Y., Kuno N., Yuasa S., Takahashi M., Senda T., Taguchi O., Yamamura K., Arimura K., Muramatsu T. A null mutation in basigin, an immunoglobulin superfamily member, indicates its important roles in peri-implantation development and spermatogenesis. *Dev Biol* 1998; **194**:152–165.

Imai K., Khandoke M.A.M.Y., Yonai M., Takahashi T., Sato T., Ito A., Hasegawa Y., Hashizume K.. Matrix metalloproteinases-2 and -9 activities in bovine follicular fluid of different-sized follicles: relationship to intra-follicular inhibin and steroid concentrations. *Domestic Animal Endocrinology* 2003; **24** 171–183.

Jo M. and Curry, Jr. T.E. Regulation of Matrix Metalloproteinase-19 Messenger RNA Expression in the Rat Ovary. *Biol Reprod* 2004; **71**: 1796–1806.

Jo M., Kizer L.E., Simpson K.S., Curry Jr T.E., Spatiotemporal pattern of expression of mRNA for membrane-type 1 MMP during the preovulatory and luteal period in the rat. *Proc VIX Ovarian Workshop, Baltimore, MD* 2002.

Jo M., Thomas L.E., Wheeler S.E., and Curry, Jr. T.E. Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase (MMP)-Associated MMP-2 Activation Increases in the Rat Ovary in Response to an Ovulatory Dose of Human Chorionic Gonadotropin. *Biol Reprod* 2004; **70**, 1024 –1032.

Johnson M.D., Kim H.R.C, Chesler L., Tsao-Wu G., Bouck N., Polverini P.J. Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase. *J Cell Physiol* 1994; **160**: 194 –202.

Kennedy III J.L., Muse K.N., Keeble S.C., Curry Jr T.E. Hormonal regulation of tissue inhibitors of metalloproteinases during follicular development in the rat ovary. *Endocrine* 1996; **5**: 299 –305.

Bakke L.J., Li Q., Cassar C.A., Dow M.P.D.J., Pursley R., Smith G.W. Gonadotropin Surge-Induced Differential Upregulation of Collagenase-1 (MMP-1) and Collagenase-3 (MMP-13) mRNA and Protein in Bovine Preovulatory Follicles. *Biol Reprod* 2004; **71**, 605–612.

Leco K.J., Apte S., Taniguchi G.T., Hawkes S.P., Khokha R., Schultz G.A., Edwards D.R. Murine tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (Timp-4): cDNA isolation and expression in adult mouse tissues. *FEBS Lett* 1997; **401**:213–217.

Leco K.J., Hayden L.J., Sharma R.R., Rocheleau H., Greenberg A.H., Edwards D.R. Differential regulation of TIMP-1 and TIMP-2 mRNA expression in normal and Ha-ras-transformed murine fibroblasts. *Gene* 1992; **117**: 209 –217.

Lee D.M., Lee T.K., Song H.B., Kima C. The expression of matrix metalloproteinase-9 in human follicular fluid is associated with in vitro fertilisation pregnancy. *BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2005; **112**: 946 – 951.

Li F. and Curry, Jr. T.E. Regulation and Function of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP) 1 and TIMP3 in Perioovulatory Rat Granulosa Cells. *Endocrinology* 2009; **150**(8):3903–3912.

Marcondes, F.K., Bianchi, F.J., Tanno, A.P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz. J. Biol* 2002; **62**(4A): 609-614.

Masui T., Doi R., Koshiba T., Fujimoto K., Tsuji S., Nakajima S., Koizumi M., Toyoda E., Tulachan S., Ito D., Kami K., Mori T., Wada M., Noda M. and Imamura M.. RECK expression in pancreatic cancer: its correlation with lower invasiveness and better prognosis. *Clin. Cancer Res* 2003; **9**: 1779-1784.

Mazauda S., Guyotb R, Guigona C.J., Coudouela 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*

Biology 2005; **277** 403 – 416.

McClung H.M., Thomas S.L., Osenkowski P., Toth M., Menon P, Raz A., Fridman R., Rempel S.A. SPARC upregulates MT1-MMP expression, MMP-2 activation, and the secretion and cleavage of galectin-3 in U87MG glioma cells. *Neuroscience Letters* 2007; **419**: 172–177.

Meng N., Li Y., Zhang H. and Sun X-F. RECK, a novel matrix metalloproteinase regulator. *Histol Histopathol* 2008; **23**: 1003-1010.

Monniaux D., Huet C., Besnard N., Clement F., Bosc M., Pisselet C., Monget P., Mariana J.C. Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. *J Reprod Fertil Suppl* 1997; **51**:3–23.

Mott J.D., Werb Z.. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol* 2004; **16**:558 –564.

Muramatsu T., Miyauchi T. Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion. *Histol Histopathol* 2003; **18**:981–987.

Murphy G., Knauper V., Cowell S., Hembry R.M., Stanton H., Butler G., Freije J.M.P., Pendas A.M., Lopez-Otin C. Evaluation of some newer matrix metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci* 1999; **878**:25–39.

Nagase H., Visse R., Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006; **69**:562–573.

Nagase H., Woessner J.F. Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; **274**:21491–21494.

Netzel-Arnett S.J., Mallya S.K., Nagase H., Birkedal-Hansen B., Van Wart H.E. Sequence specificities of fibroblast and neutrophil collagenases. *J Biol Chem* 1991; **266**:6747– 6755.

Nothnick W.B., Keeble S.C., Curry Jr T.E. Collagenase, gelatinase, and proteoglycanase mRNA expression and activity during luteal development, maintenance, and regression in the pseudopregnant rat ovary. *Biol Reprod* 1996; **54**:616 – 624.

Ohnishi J., Ohnishi E., Jin M., Hirano W., Nakane D., Matsui H., Kimura A., Sawa H., Nakayama K., Shibuya H., Nagashima K., and Takahashi T. Cloning and Characterization of a Rat Ortholog of MMP-23 (Matrix Metalloproteinase-23), a Unique Type of Membrane-Anchored Matrix Metalloproteinase and Conditioned Switching of Its Expression during the Ovarian Follicular Development. *Molecular Endocrinology* 2001; **15**(5): 747–764

Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; **29**:e45.

Podhajcer O.L., Benedetti L., Girotti M.R., Prada F., Salvatierra E., Llera A.S. The role of the matricellular protein SPARC in the dynamic interaction between the tumor and the host. *Cancer Metastasis Rev* 2008; **27**:523–537.

Porter, P.L., Sage, E.H., Lane T.F., Funk, S.H., and Gowan, A.M. Distribution of SPARC in normal and neoplastic tissue. *J. Histochem. Cytochem* 1995; **43**:791 – 800.

Prada F., Benedetti L.G., Bravo A.I., Alvarez M.J., Carbone C. and Podhajcer O.L. SPARC Endogenous Level, rather than Fibroblast - Produced SPARC or Stroma Reorganization Induced by SPARC, Is Responsible for Melanoma Cell Growth. *Journal of Investigative Dermatology* 2007; Volume **127**.

Ramirez F.E., Rifkin, D.B. Cell signaling events: a view from the matrix. *Matrix Biol* 2003; **22**, 101-7.

Reich R., Daphna-Iken D., Chun S.Y., Popliker M., Slager R., Adelman-Grill B.C., Tsafiriri A. Preovulatory changes in ovarian expression of collagenases and tissue metalloproteinase inhibitor messenger ribonucleic acid: role of eicosanoids. *Endocrinology* 1991; **129**:1869 –1875.

Rich J.N., Shi Q., Hjelmeland M., Cummings T.J., Kuan C.T., Bigner D.D., Counter C.M., Wang X.F., Bone-related genes expressed in advanced malignancies induce invasion and metastasis in a genetically defined human cancer model, *J. Biol. Chem* 2003; **278**: 15951–15957.

Said N., Socha M.J., Olearczyk J.J., Elmarakby A.A., Imig J.D., and Motamed K. Normalization of the Ovarian Cancer Microenvironment by SPARC. *Mol Cancer Res* 2007; **5**(10).

Satoh T., Kobayashi K., Yamashita S., Kikuchi M., Sendai Y., Hoshi H. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-1) produced by granulosa and oviduct cells enhances in vitro development of bovine embryo. *Biol Reprod* 1994; **50**:835–844.

Shankavaram U.T., Dewitt D.L., Funk S.E., Sage E.H., and Wahl L.M. Regulation of Human Monocyte Matrix Metalloproteinases by SPARC. *Journal Of Cellular Physiology* 1997; **173**:327 – 334.

Shofuda K., Moriyama K., Nishihashi A., Higashi S., Mizushima H., Yasumitsu H., Miki K., Sato H., Seiki M., Miyazaki K. Role of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) in regulation of pro-gelatinase A activation catalyzed by membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) in human cancer cells. *J Biochem.* 1998; **124**(2):462-70.

Smedts A.M. and Curry, Jr. T.E. Expression of Basigin, an Inducer of Matrix Metalloproteinases, in the Rat Ovary. *Biol Reprod* 2005; **73**, 80 –87.

Smith M.F., Gutierrez C.G., Ricke W.A., Armstrong D.G. and Webb R. Production of matrix metalloproteinases by cultured bovine theca and granulosa cells. *Reproduction* 2005; **129** 75–87.

Smith M.F., McIntush E.W., Ricke W.A., Kojima F.N., Smith G.W. Regulation of ovarian extracellular matrix remodelling by metalloproteinases and their tissue inhibitors: effects on follicular development, ovulation and luteal function. *J Reprod Fertil Suppl* 1999; **54**:367–381.

Smith M.F., McIntush E.W., Smith G.W. Mechanisms associated with corpus luteum development. *J Anim Sci* 1994; **72**:1857–1872.

Smith M.F., Ricke W.A., Bakke L.J., Dow M.P.D., Smith G.W. Ovarian tissue remodeling: role of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2002; **191**: 45 -56.

Sternlicht M.D., Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; **17**:463–516.

Stetler-Stevenson W.G., Kruttsch H.C., Liotta L.A. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J Biol Chem* 1989; **264**:17374 –17378.

Takagi S., Simizu S., Osada H. RECK negatively regulates matrix metalloproteinase-9 transcription. *Cancer Res* 2009; **69**(4):1502-8.

Takahashi C., Sheng Z., Horan T.P., Kitayama H., Maki M., Hitomi K., Kitaura Y., Takai S., Sasahara R.M., Horimoto A., Ikawa Y., Ratzkin B.J., Arakawa T., Noda M. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; **95**(22):13221-6.

Talhok R.S., Bissell M.J., Werb Z. Coordinated expression of extracellular-matrix-degrading proteinases and their inhibitors regulates mammary epithelial function during involution. *J Cell Biol* 1992; **118**:1271–1282.

Tremble P.M., Lane T.F., Sage E.H., and Werb Z. SPARC, a secreted protein associated with morphogenesis and tissue remodeling, induces expression of metalloproteinases in fibroblasts through a novel extracellular matrix-dependent pathway. *J. Cell Biol* 1993; **121**:1432 – 1444.

Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 2002; **3**(7): 0034.

Welm B., Mott J. and Werb Z. Developmental biology: vasculogenesis is a wreck without RECK. *Curr. Biol* 2002; **12**: R209-211.

Wick M., Burger C.W., Brusselbach S., Lucibello F.C., Muller R. A novel member of human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) gene family is regulated during G1 progression, mitogenic stimulation, differentiation, and senescence. *J Biol Chem* 2000; **269**: 18953–18960.

Apoio e Agências Financiadoras

Universidade de São Paulo



Instituto de Química
Departamento de Bioquímica



Núcleo de Terapia Celular e Molecular - Universidade de São Paulo
Cell and Molecular Therapy Center - University of São Paulo, Brazil

