

FMVZ-UNESP-BOTUCATU

**INFLUÊNCIA DA AÇÃO DA hCG SOBRE A EXPRESSÃO
GÊNICA DE EPIRREGULINA, AMPIRREGULINA E
HIALURONA SINTETASE-2 EM FOLÍCULOS
OVARIANOS DE ÉGUAS ESTIMULADAS OU NÃO COM
EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA**

IEDA DALLA PRIA BLANCO

BOTUCATU-SP
AGOSTO DE 2011
FMVZ-UNESP-BOTUCATU

**INFLUÊNCIA DA AÇÃO DA hCG SOBRE A EXPRESSÃO
GÊNICA DE EPIRREGULINA, AMPIRREGULINA E
HIALURONA SINTETASE-2 EM FOLÍCULOS
OVARIANOS DE ÉGUAS ESTIMULADAS OU NÃO COM
EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA**

IEDA DALLA PRIA BLANCO

Tese apresentada ao programa de
pós-graduação em Reprodução
Animal para obtenção do título de
doutora

Orientadora: Fernanda da Cruz
Landin e Alvarenga

Co-orientadora: Paula Ripamonte

BOTUCATU-SP
AGOSTO DE 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Blanco, Ieda Dalla Pria.

Influência da ação da hCG sobre a expressão gênica de epirregulina, ampirregulina e hialurona-sintetase-2 em folículos ovarianos de éguas estimuladas ou não com extrato de pituitária equina./ Ieda Dalla Pria Blanco. - Botucatu, 2011

Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientadora: Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga

Capes: 50504002

1. Égua - Doenças. 2. Ovários. 3. Glicoproteínas. 4. Hormônios.

Palavras-chave: Ampirregulina; Aspiração folicular; Epirregulina; Equinos; Folículos ovarianos; Hialurona-sintetase-2.

AUTORA: IEDA DALLA PRIA BLANCO

DATA: 12/08/2011

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

FERNANDA DA CRUZ LANDIM E ALVARENGA

CEZINANDE MEIRA

FREDERICO OZANAN PAPA

MÁRCIO TEORO DO CARMO

CLAUDIA BARBOSA FERNANDES

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Claudio Blanco e Flavia Dalla Pria Blanco.

AGRADECIMENTOS

Á Deus por toda a força que tive para superar as dificuldades e pelas oportunidades de crescimento que cada uma delas representou.

À minha orientadora, Fernanda, não só pela orientação, mas também pela amizade, pelo apoio e acima de tudo pela confiança depositada nas minhas idéias malucas.

À minha co-orientadora Paula Ripamonte, pela ajuda, pela disponibilidade e principalmente pela paciência.

Às amigas Mariana Fernandes Machado e Rosiára Mazziero, por trabalharem no meu projeto como se fosse delas.

Ao Miguel pela indispensável ajuda e orientação no Posto de Monta. À Bianca, também pela ajuda no posto de monta e principalmente pela disponibilidade e boa vontade.

Ao professor José Buratini Jr por disponibilizar o laboratório de Fisiologia Molecular Ovariana do IB para as análises moleculares, à FAPESP e à CAPES pelo apoio financeiro.

Aos amigos, colegas de trabalho, professores e funcionários do departamento de Reprodução Animal, que colaboraram mais do que imaginam para minha formação profissional e pessoal.

A tantos amigos que me acompanham sempre, nas mais variadas situações, boas e ruins, que por serem tantos eu precisaria de mais páginas para citar cada um, e que exatamente por serem amigos de verdade sabem que a importância deles na minha vida não pode ser expressa por palavras.

Aos meus irmãos, Diego e Laura, que eu tanto amo, pelo orgulho de entender o que a palavra “irmão” significa, e à toda minha família que se orgulha e torce tanto por mim, desde sempre.

“The world ain’t all sunshine and rainbows. It’s a very mean and nasty place, and it don’t care how tough you are... it will beat you to your knees and leave you there permanently if you let it. You, me or nobody is gonna hit as hard as life. But it ain’t about how hard you hit, it’s about how hard you can get hit and keep moving forward, how much you can take and keep moving forward: that’s how winning is done!” (Rocky Balboa)

LISTA DE ABREVIATURAS

AR ampirregulina

BMP proteína morfogenética óssea

BTC beta celulina

COC complexo *cumulus oophorus*

COX-2 cicloxigenase2

MEC matriz extracelular

mRNA: RNA mensageiro

EGF fator de crescimento epidermal (*epidermal growth factor*)

EP2 receptor de prostaglandina E2

ER epirregulina

FSH hormônio folículo estimulante

GDF9 Fator de crescimento e diferenciação 9 (*growth and differentiation factor 9*)

HA ácido hialurônico

HAS-2 hialurona sintetase 2

HC cadeia pesada (*heavy chain*)

IL1 Interleucina 1

IaI inibidor serum derivado

LH hormônio luteinizante

LH-R receptor de LH

P4 progesterona

PGE2 prostaglandina E2

TGF β fator de crescimento transformante β

TSG-6 fator de necrose tumoral gene estimulado-6

LISTA DE TABELAS

TABELA 01: Seqüências de primers, tamanho do amplicon, condições e eficiências de amplificação de cada primer utilizado nos experimentos.....	28
TABELA 02: Porcentagem de detecção dos genes em cada grupo.....	30
TABELA 03: diâmetro médio do total de folículos aspirados por grupo.....	31
TABELA 04: Análise descritiva dos dados (média \pm desvio padrão da média) utilizados na expressão dos genes HAS, ER e AR de folículos imaturos e pré-ovulatórios de éguas nos tratamentos controle, EPE, HCG e HCG/EPE.....	33
TABELA 05: Análise de variância (ANOVA) considerando os tratamentos controle, EPE, HCG e HCG/EPE, os grupos de células do <i>cumulus</i> provenientes de folículos imaturos e pré-ovulatórios (fase) as 3 e 24 horas (tempo).....	34
TABELA 06: Expressão relativa (média \pm erro padrão da média) do mRNA dos genes alvo nos grupos de células do <i>cumulus</i> de folículos imaturos e pré-ovulatórios, nos tratamentos propostos, às 3 e 24 horas em relação à amostra padrão, analisados por ANOVA e comparados por t de Student.....	35

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01:** Esquema de tratamento hormonal para os grupos de éguas estimuladas com EPE.....22
- Figura 02:** Esquema de tratamento hormonal para os grupos de éguas tratadas somente com hCG e grupo controle.....23
- FIGURA 03:** Modelo matemático para cálculo da expressão relativa derivada de dados obtidos por PCR em tempo real. A razão de um gene alvo é expressa em relação ao gene constitutivo e normalizada em relação à amostra controle..... 29
- FIGURA 04:** média das razões (equação Pfaffl, 2001) utilizada nos cálculos de expressão gênica, por gene.....32
- FIGURA 05:** Expressão gênica relativa da hialurona sintetase-2 (HAS-2) eipirregulina (ER) e ampirregulina (AR) em folículos de eqüinos submetidos a diferentes tratamentos.....36

RESUMO

As alterações observadas nos folículos pré-ovulatórios dos mamíferos a partir da onda pré-ovulatória de LH são mediadas por fatores de crescimento como AR e ER, que induzem a expansão das células do *cumulus* e maturação oocitária. O LH também estimula a deposição de ácido hialurônico mediada pela enzima HAS-2. Em eqüinos, já foi caracterizada a expressão de HAS-2, AR e ER em resposta à administração de hCG em folículos pré-ovulatórios, mas sua ação em folículos imaturos não está esclarecida, embora tenha sido demonstrada a expansão precoce do *cumulus* após sua administração em folículos menores de 30mm. O objetivo deste estudo foi caracterizar o padrão de expressão de ER, AR e HAS-2 em folículos de eqüinos em diferentes estágios de maturação, submetidos ou não ao tratamento com EPE e hCG. Para isso, recuperamos células foliculares por OPU de folículos de diversos tamanhos, em 3 ou 24 horas após estímulo gonadotrófico exógeno, e avaliamos a expressão gênica de ER, AR e HAS-2 por PCR em tempo real. O tratamento com hCG induziu a expressão de ER em folículos imaturos e pré-ovulatórios, demonstrando sua capacidade de indução da maturação folicular precoce, e houve tendência do mesmo efeito ser obtido com a expressão de HAS-2, embora não tenha sido estatisticamente comprovado. O EPE apresentou efeito menor que a hCG na indução da expressão de ER, o que pode ser justificado pelo mecanismo de *down regulation* que o LH exerce sobre a ativação dos fatores de crescimento ligados ao EGF, como a ER e a AR.

Palavras-chave: ER, AR, HAS-2, eqüinos, maturação folicular

ABSTRACT

The modifications observed on mammalian follicles after the pré-ovulatory surge of LH are mediated by growth factors like epiregulin (ER), which is responsible for the cumulus cells expansion and interfere with the oocyte maturation. The LH also stimulates the deposition of hyaluronic acid mediated by the hialuronan synthase -2 (HAS-2). In horses, the expression of HAS-2 and ER was already characterized in pre-ovulatory follicles, after the administration of hCG. In the present experiment we were able to demonstrate that the hCG is also able to induce the expression of ER in equine follicles smaller than 30mm in diameter, confirming an ability of immature follicles in responding to hormonal stimuli. Although no statistic differences were observed among groups a tendency to the same effect was also observed for the HAS-2. Similarly, the use of EPE stimulated the expression of ER, but when EPE and hCG were combined a decrease in expression was observed. This observation indicates a mechanism of down regulation exerted by the LH on the ER and HAS expression.

Key words: epiregulin, hialuronan synthase-2, equine, follicular maturation, EPE, hCG

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	
2.1 Estrutura e função do <i>cumulus oophorus</i>	03
2.2 Características morfológicas dos folículos de eqüinos	06
2.3 Composição da matriz extra-celular do <i>cumulus</i>	07
2.4 Maturação folicular pré-ovulatória mediada por LH	09
2.5 Expressão gênica de fatores associados à expansão do <i>cumulus</i>	15
3. OBJETIVOS	
3.1 Objetivos gerais.....	18
3.2 Objetivos específicos.....	18
4. HIPÓTESES	19
5. MATERIAL E MÉTODOS	
5.1 Animais	19
5.2 Preparação do Extrato de Pituitária Eqüina	20
5.3 Delineamento experimental	20
5.3.1 Experimento 01.....	20
5.3.2 Experimento 02.....	22
5.4 Obtenção das células foliculares	23
5.5 Extração do RNA	24
5.6 Reação de transcrição reversa	25
5.7 Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real	25
5.8 Caracterização do perfil de expressão dos genes por PCR em tempo real	27
5.9 Validação dos primers	27
5.10 Análise estatística	29
6. RESULTADOS	29
7. DISCUSSÃO	37
8. CONCLUSÃO	47
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1. INTRODUÇÃO

Folículos ovarianos são estruturas complexas e compartimentadas, que apresentam durante seu crescimento vários estágios de desenvolvimento, nos quais importantes modificações morfológicas são observadas e refletem alterações bioquímicas e moleculares desencadeadas pela ação hormonal, primariamente dos hormônios hipofisários LH e FSH.

A ovulação é um processo elaborado, que começa com o aumento do LH circulante, o qual é responsável por uma série de eventos no micro ambiente folicular que levam à liberação do oócito para a fertilização. Todas as células foliculares, inclusive o oócito, participam ativamente do processo ovulatório, orquestrando os eventos por meio de fatores de crescimento. Cada tipo celular apresenta a expressão de fatores de crescimento específicos, com funções diferenciadas, de acordo com seu local e tempo de ação.

Fatores de crescimento são polipeptídeos que modulam a proliferação e a diferenciação celular, agindo através da ligação a receptores celulares específicos. Ao contrário das substâncias com ação endócrina, eles agem localmente, portanto sua ação é caracterizada como autócrina ou parácrina. Diversos fatores de crescimento estão envolvidos na ativação de cascatas bioquímicas responsáveis pela expressão gênica e síntese de moléculas cuja participação no processo ovulatório nem sempre é esclarecida, sendo feitas apenas hipóteses a partir da observação do padrão temporal de surgimento, estudos com deleção gênica ou com reposição exógena de substâncias em cultivos *in vitro*.

O complexo *cumulus oophorus* é uma estrutura folicular formada por células da granulosa diferenciadas, as células do *cumulus*, que envolvem e se comunicam com o oócito pela troca de metabólitos. Estas células estão ancoradas em uma matriz extracelular complexa e dinâmica, formada por diversas substâncias que se depositam em quantidades crescentes, com a progressão do processo ovulatório, até que esteja caracterizada a expansão do *cumulus*, que é o espaçamento entre as células que envolvem o oócito.

Além da expansão do *cumulus*, o aumento do LH endógeno estimula uma série de eventos responsáveis pela maturação oocitária final e culmina com a ovulação. Receptores de LH (LH-R) são expressos nas células da teca no início do desenvolvimento folicular e apenas mais tarde sua expressão é observada nas células da granulosa mural. Entretanto, nas células do *cumulus* e no oócito sua expressão é ausente ou mínima, o que sugere a necessidade de mediadores parácrinos para sua ação.

De todos os fatores de crescimento ovarianos que possivelmente são os mediadores parácrinos da ação do LH no folículo pré-ovulatório, a família do fator de crescimento epidermal (EGF) têm mostrado grande importância, a partir de pesquisas recentes. Já foi demonstrado que a adição de EGF ao meio de cultivo melhora os índices de maturação *in vitro* e é necessária para a expansão das células do *cumulus*. Além disso, a administração de hCG induz aumento da expressão de proteínas relacionadas ao EGF, como a ampirregulina, a epirregulina e a beta celulina.

Uma melhor compreensão dos eventos relacionados à maturação folicular e oocitária e das interações autócrinas e parácrinas entre os

diferentes tipos de células no micro ambiente folicular pode ajudar a desenvolver protocolos mais eficientes de superovulação, recuperação de oócitos e maturação *in vitro*, ampliando a utilização de biotécnicas de reprodução assistida para a espécie eqüina. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar a expressão gênica de epirregulina, ampirregulina e hialurona sintetase-2 em diferentes estágios de maturação folicular, além de avaliar o efeito do estímulo gonadotrófico exógeno com EPE e hCG em folículos ovarianos eqüinos, a partir de células foliculares obtidas *in vivo* por aspiração.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estrutura e função do *cumulus oophorus*

Em folículos ovarianos, as células da granulosa são classificadas em duas subpopulações principais: células do *cumulus* e células da granulosa mural. As células do *cumulus* são intimamente associadas ao oócito e formam o chamado complexo *cumulus oophorus* (CCO), enquanto as células da granulosa mural são organizadas como um epitélio estratificado na periferia do folículo, próximo à parede folicular.

Esta distinção se torna mais evidente após a formação do antro folicular, durante a foliculogênese, e após o estímulo gonadotrófico pré ovulatório, quando ocorre deposição de matriz extracelular entre as células do *cumulus*. As células do *cumulus* são capturadas pela fimbria do oviduto juntamente com o oócito no processo ovulatório, enquanto nas células da granulosa mural não há deposição de MEC e estas permanecem no folículo

após a ovulação. É esta matriz extracelular que facilita a extrusão do CCO do folículo e promove, juntamente com as células do *cumulus*, o ambiente adequado para a penetração espermática e a fertilização (SALUSTRI et al., 1996).

Nos folículos pré-ovulatórios, a relação entre as células do *cumulus* e os oócitos maduros é de influência recíproca, com o oócito interferindo diretamente na morfogênese e diferenciação das células da granulosa. A remoção do oócito resulta na luteinização prematura e secreção elevada de progesterona pelas células foliculares, e fatores parácrinos derivados do oócito são responsáveis pelo estímulo à mitose nestas células e pela regulação da expansão do *cumulus* através da indução da secreção de ácido hialurônico, em resposta ao AMPc e FSH. Além disso, o controle da maturação meiótica do oócito envolve uma interação complexa entre células somáticas e germinativas, com a participação de inúmeras vias metabólicas (FULKA et al., 1998; CANIPARI et al., 2000).

Em camundongos, o CCO possui cerca de 3 a 5 mil células que se mantêm unidas entre si e ao oócito por junções tipo GAP e por processos de membrana, o que facilita a troca de metabólitos de glicose, pequenas moléculas sinalizadoras e íons. Os oócitos dependem das células do *cumulus* para o metabolismo de glicose e suprimento de piruvato para a produção de energia. A extensa deposição de matriz extracelular verificada após o estímulo gonadotrófico pré-ovulatório causa um aumento de volume do CCO (em até 40 vezes) e sua separação da parede folicular (CANIPARI et al., 2000; ZHUO E KIMATA, 2001).

As células do *cumulus* possuem responsividade a hormônios e perfis de expressão gênica diferentes dos observados nas células da granulosa mural. Em folículos pré-ovulatórios, ambas apresentam, em abundância, receptores de superfície para LH, mas durante o crescimento folicular a massa do *cumulus* e a camada de células da granulosa mais próxima ao antro mostram maior resposta proliferativa ao FSH. As células do *cumulus* são as mais diretamente expostas a fatores mitogênicos secretados pelo oócito, pertencentes à superfamília TGF β , que estabelecem um gradiente morfogênico que as proporciona características que incluem alto índice de proliferação celular e biossíntese de progesterona, entre outros (ERICKSON E SHIMASAKI, 2000).

Após o LH pré-ovulatório, as células do *cumulus* respondem com um padrão único de indução gênica que leva à produção e estabilização da matriz extracelular local que envolve o CCO. Este processo, conhecido como expansão do *cumulus*, é dependente de uma cascata específica de sinais intracelulares e da expressão de genes relacionados, dentro do CCO, e desempenha um papel fundamental no processo ovulatório e na fertilidade subsequente (RUSSEL E ROBKER, 2007).

Simultaneamente, o estímulo do LH também aumenta a esteroidogênese, a síntese de prostaglandinas e leucotrienos, a degradação da matriz extracelular por proteases oriundas das células da teca e granulosa e mudanças na permeabilidade das barreiras sanguíneas foliculares, o que resulta em um aumento da pressão intra-folicular, que promove a ruptura da parede folicular e extrusão do CCO (ZHUO E KIMATA, 2001, RUSSEL E ROBKER, 2007).

De acordo com a revisão de Tanghe et al. (2002), o CCO completamente desenvolvido exerce 3 funções biológicas: suporte à maturação oocitária antes da ovulação; condução do oócito ao oviduto durante a ovulação e controle do acesso ao oócito pelo espermatozóide durante a fertilização.

Conforme revisto por Russel e Robker (2007), foi demonstrado em trabalhos científicos com camundongos *knockout* que a formação e expansão adequada do *cumulus* são fundamentais para a ovulação, sendo a ruptura folicular e a fertilização considerados processos sensíveis à alterações na composição e, portanto, na capacidade funcional da matriz extracelular do *cumulus*.

2.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DOS FOLÍCULOS EQUÍNOS

Hawley et al. (1995) analisaram comparativamente folículos dissecados de ovários de bovinos e eqüinos provenientes de matadouro, e concluíram que há entre eles diferenças que justificam a dificuldade de obtenção de oócitos eqüinos. A égua possui um *cumulus oophorus* mais espesso e menos fenestrado que a vaca, que se apresenta menos saliente em relação à lamina basal, com uma ampla base na região em que o *cumulus* está fixado. Além disso, estes autores observaram que, somente em alguns folículos eqüinos, na teca interna imediatamente abaixo do oócito, havia uma área relativamente acelular, fibrilar e vacuolizada na qual se estendiam processos celulares das células do cumulus, e concluíram que esta região serve como âncora para o oócito, impedindo que ele seja facilmente destacado da parede folicular. Para folículos pré - ovulatórios,

entretanto, a deposição de ácido hialurônico mediada por LH favorece o destacamento do oócito (GOUDET et al., 1997; HAFEZ, 2000).

2.3 Composição da matriz extracelular do *cumulus*

O principal componente da MEC que envolve o CCO é o ácido hialurônico (HA), uma glicosaminoglicana de alto peso molecular produzida, no ovário, pelas células do *cumulus* e granulosa adjacentes ao antro, e estabilizado em uma matriz por ligação covalente à proteínas (RICHARDS et al., 2002). Em um CCO completamente expandido, HA está presente em uma concentração de 0,5-1 mg/ml, sendo além do principal componente da matriz extracelular, o responsável também por sua característica visco-elástica (ZHUO E KIMATA, 2001).

O ácido hialurônico é uma glicosaminoglicana, composta por 2000 a 25000 unidades de dissacarídeos, que contribui para a homeostase e biomecânica tecidual em diversos tecidos, além de desempenhar um papel fundamental na ovulação e fertilização de oócitos de mamíferos. É sintetizado na membrana celular pelas hialurona-sintetases (HAS). Em mamíferos, a família das HAS é composta por três conhecidas iso-enzimas: HAS-1, -2 e -3 (EINSPANIER E SCHOENFELDER, 2003).

A regulação temporal da deposição de HA parece ocorrer ao nível da transcrição de hialurona sintetase-2 (HAS-2), cujo mRNA aparece nas células do *cumulus* cerca de uma hora após o pico de LH e antes do início da síntese de HA, e desaparece quando cessa a síntese de HA, conforme demonstrado em camundongos por Fulop et al. (1997).

A matriz extracelular do *cumulus* está bem ancorada na superfície celular pelo seu bem caracterizado receptor, CD44 (ZHUO E KIMATA, 2001). Proteínas derivadas do soro e sintetizadas pelas células do *cumulus* organizam o HA em uma rede elástica inter-celular que ancora o oócito em uma unidade que não pode ser mecanicamente dissociada (SALUSTRI et al., 1996).

Portanto, além do HA, proteoglicanas e proteínas secretadas pelas células do *cumulus* e células da granulosa mural também são componentes importantes da matriz extracelular do CCO. Estas incluem sulfato de condroitina, sulfato de dermatana e substâncias semelhantes à heparina. Também foi caracterizada a expressão gênica do fator de necrose tumoral gene estimulado-6 (TSG-6), que codifica uma proteína com um sítio de ligação ao HA, e uma proteoglicana de 35kDa com um sítio de ligação ao HA, conhecida como inibidor *serum* derivado IaI (ZHUO E KIMATA, 2001; RICHARDS et al., 2002).

O IaI é uma proteína complexa, com duas subunidades de cadeias pesadas (HC), onde o HA se liga. É sintetizada pelo fígado e circula no plasma sanguíneo em altas concentrações, adentrando o folículo como resultado do aumento da permeabilidade vascular folicular verificado durante a ovulação (RUSSEL E ROBKER, 2007).

A função da MEC é dependente da estrutura específica produzida pela ligação da HC e do complexo HC-TSG-6 ao ácido hialurônico (CARRETE et al., 2001; MUKHOPADHYAY et al., 2001; FULOP et al., 2003). A formação do complexo IaI-HC-HA requer uma interação intermediária com o TSG-6 (CHEN et al., 1996; CARRETTE et al., 2001; JESSEN & ODUM et al.,

2003). Sem a síntese de TSG-6 ou IaI, o HA é produzido, mas não estabilizado, ou seja, não há agregação de matriz nem expansão morfológica do *cumulus*, *in vitro* ou *in vivo*, o que resulta em menores índices de ovulação ou em problemas de implantação, de acordo com estudos em camundongos (RUSSEL E ROBKER, 2007).

A deposição de matriz extracelular também é afetada pelo citoesqueleto das células do *cumulus*. O LH induz o alongamento e polarização das células do *cumulus*, acompanhada pela redistribuição dos microfilamentos e em seguida pela extensão dos microtúbulos e filamentos intermediários em direção às recém formadas projeções citoplasmáticas das células do *cumulus* (ZHUO E KIMATA, 2001).

2.4. MATURAÇÃO FOLICULAR PRÉ-OVULATÓRIA MEDIADA POR LH

Em mamíferos, a onda pré-ovulatória de LH desencadeia uma série de mudanças no folículo ovariano, que são necessárias para a ovulação de um gameta apto à fertilização. Elas incluem a indução da retomada da meiose oocitária, diferenciação das células da granulosa mural e reprogramação de sua atividade esteroidogênica, expansão e alterações das células do *cumulus* como a expressão de tipos diferentes de mRNAs e proteínas, e mudanças nas propriedades secretórias destas células (PARK et al., 2004; TSAFRIRI et al., 2005).

A ruptura da parede folicular e liberação da célula germinativa feminina, o oócito, é o que chamamos de ovulação. Para que isto aconteça, o ovário deve sofrer uma série de eventos intimamente regulados, e os folículos devem chegar ao estágio pré-ovulatório, onde as células da

granulosa, da teca e o oócito apresentam características específicas. O oócito deve estar apto para retomar a meiose, as células da granulosa devem ter adquirido a capacidade de produzir estrógenos e responder ao LH e as células da teca começam a sintetizar quantidades maiores de andrógenos, que servirão de substrato para a esteroidogênese (RICHARDS et al., 2002).

As células somáticas do folículo coordenam o estímulo ovulatório para a retomada da meiose e liberação do oócito, bem como remodelação e luteinização do folículo. Uma complexa comunicação intercelular comanda estágios críticos da maturação oocitária e liga este processo com a liberação do oócito do folículo. A ovulação é, portanto, controlada através de muitos fatores, incluindo hormônios endócrinos, sinais imunológicos e metabólicos e fatores parácrinos das células da teca, granulosa mural e *cumulus*, bem como pelo próprio oócito (RUSSELL E ROBKER, 2007).

A seqüência temporal de eventos que ocorrem durante a ovulação é iniciada em resposta ao LH pré - ovulatório, que age tanto nas células da granulosa quanto nas da teca para estimular o AMPc e ativar a PKA, o que rapidamente induz a transcrição de genes específicos, os quais iniciam ou alteram processos que irão causar a ruptura folicular e a remodelação do folículo para a formação do corpo lúteo (RICHARDS et al., 2002).

O LH age via interação com seus receptores (LH-R) que pertencem à super-família dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs), sendo primariamente acoplados à proteína Gs e ativados pela adenilil ciclase. Portanto, o sinal primário proveniente deste receptor é o acúmulo de AMPc nas células da teca e da granulosa, e este segundo mensageiro é o provável

mediador da maioria das mudanças que ocorrem no folículo pré-ovulatório (CONTI et al., 2006).

As células da teca desenvolvem receptores para LH, e as da granulosa inicialmente para FSH e depois para LH, em decorrência da maturação folicular. Na realidade, o FSH age em conjunto com o estradiol para estimular o desenvolvimento de LH-R nas células da granulosa do folículo maduro (HUNTER et al., 2003). A resposta direta ao LH pré-ovulatório é predominante nas células da granulosa mural devido à maior quantidade de receptores (RUSSELL e ROBKER, 2007).

A expressão de LH-R, inicialmente restrita às células da teca, é observada nas células da granulosa mural nos estágios finais de desenvolvimento folicular, mas estes receptores estão ausentes ou em pequeno número em células do *cumulus* e no oócito, o que torna estas células insensíveis à estimulação direta pelo LH, sendo necessária a presença de mediadores parácrinos (MEHLMANN et al., 2005; PARK et al., 2004; CONTI et al., 2006). O sinal ovulatório do LH é recebido e respondido pelas células da teca e da granulosa mural, que o transmitem como sinal secundário às células do *cumulus*, induzindo mudanças e a própria regulação da expressão de LH-R (RUSSELL e ROBKER, 2007).

Em eqüinos, Goudet et al. (1999) demonstraram que os LH-R nas células da granulosa aumentam conforme aumenta o diâmetro folicular, e que folículos com 5 mm de diâmetro já apresentam LH-R tanto nas células da granulosa mural quanto nas do *cumulus*, o que não havia sido reportado em outras espécies, onde os LH-R são detectados no *cumulus* apenas em folículos pré-ovulatórios.

A íntima conexão entre as células foliculares e o oócito, conectados via junções GAP, permite que fatores parácrinos secretados tanto pelas células da granulosa quanto pelo oócito regulem muitas funções importantes no ambiente folicular, promovendo o crescimento e diferenciação das células da granulosa, a deposição de matriz extra-celular e a regulação da maturação oocitária (ALBERTINI et al., 2001; PARK et al., 2004). Dentre estes fatores, os membros da família do fator de crescimento epidermal (EGF) são os mais prováveis mediadores da ação do LH pré-ovulatório, uma vez que o LH ou a hCG estimulam um aumento transitório e seqüencial na expressão de ampirregulina, epirregulina e beta-celulina, que pertencem à família do EGF (PARK et al., 2004). EGF é um fator de crescimento pertencente a um grande grupo de proteínas intimamente relacionadas que incluem TGF, ampirregulina, epirregulina e beta-celulina, entre outros (BEN-AMI et al., 2006).

Ampirregulina, epirregulina e beta-celulina se ligam aos receptores de EGF (EGF-R) presentes no ovócito e nas células do *cumulus*. A ativação dos EGF-R por estas proteínas induz a expansão das células do *cumulus* e maturação nuclear em humanos e camundongos (FEUERSTEIN et al., 2007; PARK et al., 2004). Em éguas, 2 a 4 horas após a administração sistêmica de hCG, observou-se aumento da expressão de mRNA para ampirregulina e epirregulina nas células da granulosa de folículos dominantes pré-ovulatórios (LINDBLOOM et al., 2008). Em folículos cultivados de camundongos, Panigone et al. (2008) demonstraram aumento inicial da expressão de ER e AR em 30 minutos após a administração de LH recombinante, com a expressão máxima detectada 2

horas depois do LH. Em ratos, Sekiguchi et al. (2004) demonstraram aumento da ER e AR em folículos pré-ovulatórios estimulados com eCG durante 24 horas, com máximo em 4 horas. Em macacos, a expressão de AR e ER foi detectada entre 3 e 12 horas após hCG após estímulo com hCG (FRU et al., 2007).

De acordo com a revisão de Ben-Ami et al. (2006) e segundo o trabalho de Panigone et al. (2008), a ligação do LH ao seu receptor ativa a adenilato ciclase e portanto eleva o AMPc, que por sua vez estimula a proteína quinase A (PKA) envolvida na síntese de ER e AR. Para adquirir atividade biológica, ER e AR precisam ser clivados por metaloproteinases, e após a clivagem e ativação podem se ligar a receptores das células do *cumulus* em padrão parácrino, desencadeando a expansão do *cumulus* e a maturação oocitária, ou autócrino, com efeito mitogênico. Em células da granulosa normais, após o aumento do LH ocorre *down-regulation* das metaloproteinases responsáveis pela ativação da ER e AR.

O LH pré-ovulatório também é responsável pelo estímulo à esteroidogênese folicular, síntese de prostaglandina e leucotrienos, secreção de proteases para a degradação de matriz extra-celular e alterações na permeabilidade vascular que levam ao acúmulo de fluido e aumento da pressão intra-folicular (ZHUO E KIMATA, 2001)

Nos estágios finais de maturação folicular, o acúmulo de água e expansão da matriz extra-celular do folículo o leva ao seu diâmetro máximo. O crescimento e a remodelação da membrana basal deve ser extremamente rápido para suportar estas mudanças finais, e imediatamente antes da ovulação há dissolução completa da membrana

basal, além de modificações vasculares que incluem vasodilatação e hiperemia, com progressiva mudança de cor do folículo, devido ao aumento da permeabilidade vascular. Acredita-se que a hiperemia é mediada por histamina e prostaglandina E2 (PGE2).

Entretanto, observa-se isquemia local no ponto de ruptura do folículo. (HUNTER et al., 2003). Esta isquemia local é responsável pela morte das células epiteliais, as quais liberam hidrolases que contribuem para a dissolução das camadas celulares adjacentes. A quebra final da parede folicular depende da apropriada degradação de tecido conjuntivo e outros componentes da matriz extra-celular. Além disso, o aumento de volume do folículo pré-ovulatório é facilitado pela dissociação progressiva das fibras colágenas, um processo que começa na túnica albugínea horas antes da ruptura folicular. Fibroblastos adjacentes à teca se torna ativos e proliferam, sendo provavelmente responsáveis pela liberação de enzimas proteolíticas, especialmente colagenases, que degradam a matriz extra-celular, facilitando sua movimentação e levando a um adelgaçamento da parede folicular (ESPEY et al., 1994).

Na maioria das espécies, incluindo ovinos, suínos, bovinos e eqüinos, há redução da pressão intra-folicular antes da ovulação, com o folículo se tornando mais flácido e perdendo a tensão da parede folicular. Neste caso a fase final de desenvolvimento folicular é caracterizada pela deformação do folículo, que pode ser detectada por palpação retal em vacas e éguas (HUNTER et al., 2003).

2.5. Expressão gênica de fatores associados à expansão do *cumulus*

A expansão do CCO é uma consequência do pico de LH e é dependente da indução de genes específicos, que incluem: cicloxigenase-2 (COX2), a enzima que sintetiza prostaglandinas; hialurona sintetase 2 (HAS2), que sintetiza ácido hialurônico; e TSG-6, que é uma proteína ligante de HA (RICHARDS et al., 2002).

Os mecanismos moleculares pelos quais o LH induz a expressão gênica de HAS-2, COX-2 E TSG-6 podem ser tanto diretos, via receptores de LH (LH-R) nas células do *cumulus* ou indiretos, via ativação de outros eventos sinalizadores no folículo, como o GDF-9 e EGF. A ação direta via LH-R é muito questionada, em função da pequena quantidade deste receptor identificada nas membranas das células do *cumulus* (RICHARDS et al., 2002; SHIMADA et al., 2006).

O provável papel do EGF e de seus fatores relacionados, como AR, ER e BTC é justificado pelo aumento de sua expressão em folículos no estágio pré-ovulatório, em padrão temporal semelhante ao dos receptores de prostaglandina, por exemplo, um dos receptores de prostaglandina E2 (EP2), que é expresso nas células do *cumulus* e participa do processo de expansão do *cumulus* e ovulação (CONTI et al., 2005, SHIMADA et al., 2006).

Conforme revisto por Richards et al. (2002), estudos demonstraram que a ovulação é defeituosa em camundongos com deleção do gene COX-2, e que sem COX-2 há falhas na resposta ao LH quanto à expansão do *cumulus*. A ovulação e a expansão do *cumulus* podem ser normalizadas, entretanto, com a administração exógena de PGE2 ou interleucina-1 (IL1),

o que indica que prostaglandina, principalmente PGE2, e outras vias sinalizadoras são fundamentais para ambos os eventos, e evidências indicam que a ação da prostaglandina se dá ao nível do TSG-6, não do HA.

Tanto o TSG-6 quanto o HA são expressos muitas horas antes de qualquer sinal físico de expansão da MEC, o que sugere que a presença dessas moléculas não é suficiente para a formação da matriz ou para que as células do *cumulus* se afastem do oócito. Isto ocorre porque um pré-requisito para a formação e estabilização da MEC é a entrada de IclI no folículo, o que ocorre durante o processo ovulatório pelo aumento da permeabilidade vascular folicular verificado durante a dissolução da membrana basal. A expansão do *cumulus* só ocorre quando o IclI entra no folículo ou quando soro é adicionado ao CCO para estabilizar a matriz, por ligação covalente do HA à cadeia pesada do IclI (RICHARDS et al., 2002).

O mecanismo parácrino de ação dos fatores semelhantes ao EGF nas células do *cumulus* foi proposto por Conti et al. (2006): A ativação do LH nas células da granulosa mural estimula a via do AMPc, que por sua vez induz a expressão de ER, AR e BTC. Estes fatores agem nas células da granulosa mural ou se difundem para agir nas células do *cumulus*, e a ativação dos receptores de EGF nas células do *cumulus* proporcionam juntamente com o AMPc, a maturação oocitária e a expansão do *cumulus* (CONTI et al., 2006).

A deposição da MEC também é influenciada por fatores oocitários da super família TGF β , como o GDF-9, BMP-15 e BMP-6. Dentre estes, o GDF-9 é o mais importante, já que sua deleção em camundongos gera produtos completamente inférteis, tendo sido também demonstrada sua

influência sobre a expressão de HAS-2, COX-2 e enzimas da esteroidogênese (ZHUO E KIMATA, 2001). Entretanto, GDF-9 é expresso em oócitos desde os estágios iniciais da foliculogênese, o que sugere que sua ação específica em folículos pré-ovulatórios é dependente do LH, o que poderia ser explicado por uma necessidade de ativação do GDF-9 (RICHARDS et al., 2002).

O GDF-9, como outros membros da família TGF, é sintetizado como propeptídeo e está presente na superfície das junções celulares entre o oócito e as células do *cumulus*, possivelmente ligado a proteoglicanas, em latência. A indução de proteases pelo LH pode ser necessária para ativar ou liberar o GDF-9, permitindo sua interação com receptores celulares e indução da expressão de HAS-2 e COX-2 nas células do *cumulus* (RICHARDS et al., 2002).

A expansão do *cumulus*, por sua vez, também é estimulada pelo LH e envolve a formação de uma matriz extra-celular viscosa, composta principalmente por ácido hialurônico (HA), secretado pelas células do *cumulus*, que forma um esqueleto estrutural juntamente com moléculas associadas (ASHKENAZI et al., 2005, KIMATA et al., 2001).

Ao contrário do que acontece em outras espécies, onde a expansão celular é verificada somente nas células do *cumulus*, em eqüinos o LH pré-ovulatório causa uma expansão de toda a camada das células da *granulosa in vivo*, e nesta espécie foi caracterizada a expressão de HAS-2 nas células da *granulosa mural* em resposta ao hCG em folículos pré-ovulatórios (STOCK et al., 2002). Além disso, o hCG foi capaz de induzir expansão precoce do *cumulus* em folículos imaturos (BLANCO et al., 2009).

A expressão máxima de HAS-2 em equinos foi detectada 36 horas após hCG (STOCK et al., 2002)

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é o de investigar a expressão gênica de epirregulina (ER), ampirregulina (AR) e hialurona sintetase-2 (HAS-2) em folículos de equinos em diferentes estágios de maturação, submetidos ou não ao estímulo gonadotrófico exógeno com EPE e hCG, visando um melhor conhecimento dos eventos celulares que culminam na expansão do *cumulus oophorus*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) detectar a expressão de HAS-2, AR e ER em folículos de equinos pré-ovulatórios e imaturos;
- 2) detectar se a expressão de HAS-2, AR e ER pode ser induzida pela administração de EPE ou hCG em folículos <30mm
- 3) determinar a influência do protocolo de superovulação (EPE+hCG) sobre a expressão de AR, ER e HAS-2 em folículos <30 mm e >35 mm;
- 4) investigar a influência da indução da ovulação no padrão temporal de expressão gênica de AR, ER e HAS-2.

4. HIPÓTESES

- 1) a expressão de ER, AR e HAS-2 apresenta padrão diferenciado entre folículos imaturos e pré-ovulatórios
- 2) a expressão de ER, AR e HAS-2 é induzida por estímulo gonadotrófico exógeno (EPE e hCG)

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. ANIMAIS

Foram utilizadas 12 éguas mestiças, com idade entre 4 e 15 anos, pesando entre 250 e 400 kg e sem alterações quanto à ciclicidade e fertilidade durante as estações de monta (outubro a março) dos anos 2009-2010 e 2010-2011. Todos os animais utilizados não apresentaram alterações detectadas no exame do trato reprodutivo (histórico, palpação retal, exame ultrassonográfico e citologia uterina). As éguas foram mantidas no Posto de Monta da Fazenda Lajeado – UNESP – localizado no município de Botucatu (LAT. 22°S e LONG. 48°W), estado de São Paulo, em piquetes com livre acesso à água, com fornecimento de 1,5 kg de concentrado/ animal/ dia e 5kg de feno/ animal/ dia, além de suplementação mineral em área coberta.

A dinâmica de crescimento folicular foi acompanhada por palpação retal e ultrassonografia (AQUILAVET, ESAOTE-PIE MEDICAL, HOLANDA) utilizando-se transdutor linear de 5 Mhz em dias alternados até que se observasse um folículo de 30 mm ou se iniciasse o tratamento hormonal , quando iniciava-se o acompanhamento diário.

5.2. PREPARAÇÃO DO EXTRATO DE PITUITÁRIA EQUINA

O extrato de pituitária eqüina foi preparado segundo o método proposto por Guillon & Combarnous, (1983) no laboratório da Universidade Estadual Paulista (UNESP), AMPcus de Botucatu-SP. As pituitárias eram adquiridas no frigorífico, localizado na cidade de Santa Fé-PR, onde eram congeladas e conduzidas para o laboratório (UNESP). Depois de descongeladas, as pituitárias eram banhadas em água destilada/deionizada, trituradas em liquidificador doméstico com solução de 40% de etanol, álcool etílico P.A. (Laboratório Dinamica®, São Paulo), e 6% de acetato de amônia (Laboratório Synth®, São Paulo-SP). A fração ativa era precipitada, aumentando-se a concentração de etanol em 80%, sendo em seguida dializada, liofilizada e conservada a uma temperatura de -20° C. Ao ser utilizado, o EPE liofilizado foi diluído em solução fisiológica na proporção de 6 mg/mL, sendo conservado em refrigerador a 5° C no período máximo de sete dias.

5.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

5.3.1 EXPERIMENTO 1: Análise da expressão de AR, ER e HAS-2 em folículos pré-ovulatórios de éguas submetidas a diferentes tratamentos hormonais

As éguas foram aleatoriamente divididas nos seguintes grupos:

a) CPO - Grupo controle pré ovulatório (não superovuladas sem indução da ovulação):

No sétimo dia após a ovulação administrava-se uma dose de 1 ml de análogo de prostaglandina i.m (Cloprostenol, 5mg/ml). A aspiração do folículo dominante era efetuada entre 3 e 24 horas após a detecção de um folículo com 35-40 mm.

b) EPE/hCG PO - Grupo EPE/hCG pré-ovulatório (superovuladas com indução da ovulação):

No sétimo dia após a ovulação administrava-se uma dose de 1 ml de análogo de prostaglandina i.m (dinoprost, 5mg/ml) e era iniciado o tratamento superovulatório, com a aplicação de 6 mg de EPE, i.m, BID. Quando a maioria dos folículos atingia 35 mm de diâmetro, era administrada uma dose de hCG (2500 UI) e as aspirações eram efetuadas após 3 ou 24 horas .

c) hCG PO - Grupo hCG pré-ovulatório (não superovuladas com indução da ovulação):

No sétimo dia após a ovulação os animais recebiam uma dose de 1 ml de análogo de prostaglandina i.m (dinoprost, 5mg/ml) e a hCG (2500 UI, i.v) era administrada quando detectava-se a presença de um folículo com 35 mm de diâmetro, e as aspirações eram efetuadas após 3 ou 24 horas.

d) EPE PO - Grupo EPE pré ovulatório (superovuladas sem indução da ovulação):

O tratamento superovulatório era efetuado como no grupo 2, e quando o maior folículo atingia 35 mm as aspirações eram efetuadas as 3 e 24 horas, como nos grupos anteriores.

5.3.2. EXPERIMENTO 2: Análise da expressão de ER, AR e HAS-2 em folículos imaturos de éguas submetidas a diferentes tratamentos hormonais

As éguas foram divididas aleatoriamente nos mesmos 4 grupos de tratamento descritos para o experimento 1, entretanto as aspirações eram efetuadas 3 ou 24 horas após a detecção de um folículo de 30 mm. Os grupos foram denominados controle imaturo (CIM), EPE/hCG imaturo (EPE/hCG IM), hCG imaturo (hCG IM) e EPE imaturo (EPE IM).

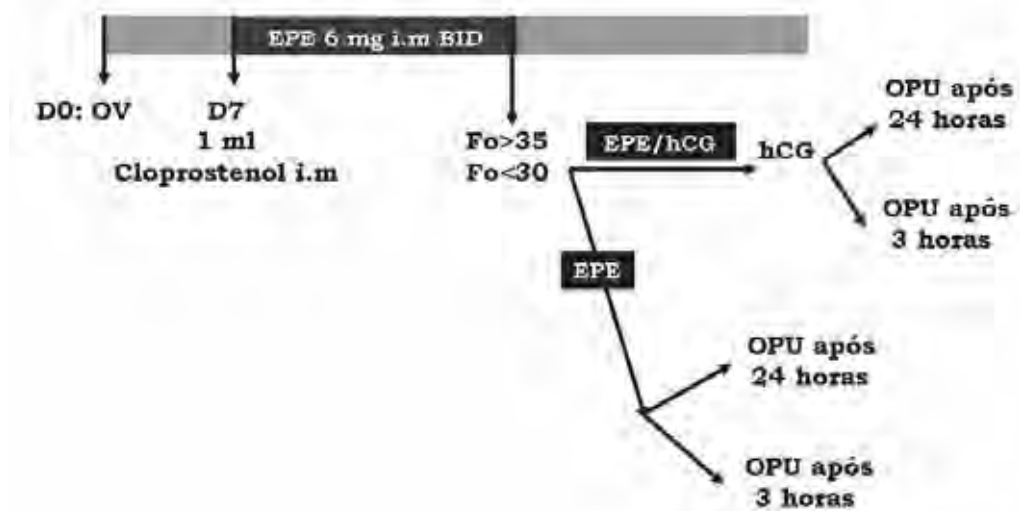


Figura 01: Esquema de tratamento hormonal para os grupos de éguas estimuladas com EPE

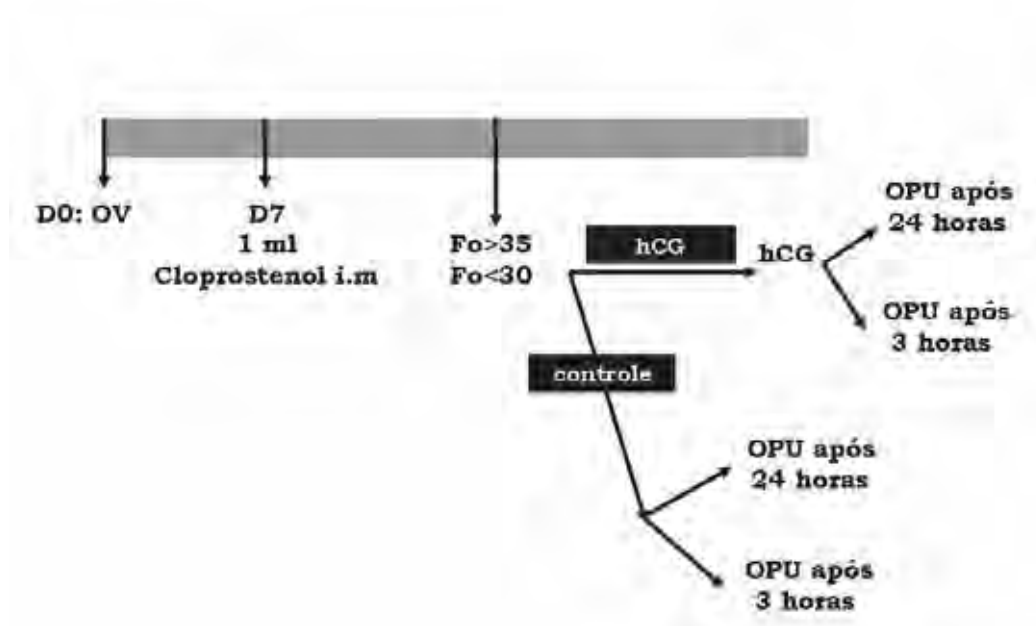


Figura 02: Esquema de tratamento hormonal para os grupos de éguas tratadas somente com hCG e grupo controle

5.4. OBTENÇÃO DAS CÉLULAS FOLICULARES

Após a higienização da região perivulvar da égua, aplicava-se 1ml de xilazina iv, 1 ml de butorphanol iv e 15-20 mm de buscopan i.v. Os folículos eram aspirados, utilizando uma agulha de lúmen duplo (12-GA-Oocyte Aspiration Set – 59009 – Minitube, Veronam WI) acoplada a um transdutor convexo de 7,5 MHz em uma guia de aspiração (Nutricell, AMPcinas-SP) trans-vaginal, que por sua vez era acoplada a uma bomba de vácuo com pressão entre 180-200 mmHG. O antro de cada folículo puncionado era lavado de forma contínua com cerca de 50 ml de PBS (Nutricell, AMPcinas-SP) com 1 ml de heparina diluída, para a recuperação

de células foliculares. O fluido folicular e o lavado intra-folicular eram levados individualmente à placas de Petri (45x25) com fundo quadriculado, para rápida inspeção em esteromicroscópio com aumento de 40x, para visualização da quantidade e aspecto das células foliculares obtidas. Para evitar a degradação do RNA, as células foliculares eram rapidamente retiradas da placa, com auxílio de pipetador automático. O fluido folicular restante era centrifugado para a separação do pellet composto pelas células foliculares restantes.

O pellet era retirado com auxílio de micropipetador fixo (1 ml) e colocado em eppendorfs de 2 ml, nos quais eram acrescentados 1 ml de trizol®. Em seguida eram congelados imediatamente em freezer a -20°C e transferidos em menos de 24 horas para freezer a -80°C, onde ficavam armazenados até o momento da extração de RNA.

5.5. EXTRAÇÃO DO RNA

Depois de trituradas e homogeneizadas em Politron (Ultraturrax®), as amostras de células da teca e células da granulosa foram submetidas ao protocolo Trizol® (Invitrogen™) para extração de RNA total. Este protocolo foi realizado em quatro etapas seqüenciais: separação, precipitação, lavagem e dissolução do RNA total.

A extração do RNA foi realizada segundo o protocolo Trizol (Invitrogen®). Ao final da extração, as amostras de RNA total foram solubilizadas em água destilada e autoclavada. As concentrações das amostras de RNA total foram mensuradas por espectrofotometria (ND-2000, Nanodrop®).

A fim de evitar uma eventual contaminação por DNA genômico, todas as amostras de RNA total foram tratadas com DNase antes de serem submetidas ao RT-PCR. Conforme as instruções do protocolo DNase I – “Amplification Grade (Invitrogen®), o volume da solução de RNA total tratado com DNase foi calculado a fim de conter 1 µg de RNA total. A este volume foi adicionado 1 µl de tampão DNase, 1 µl de DNase I (1 unidade/ µl) e água “RNase free” suficiente para completar 10 µl. Essa solução permaneceu a temperatura ambiente durante 15 minutos e, em seguida, foi acrescida de 1 µl de EDTA (25mM) e incubada a 65°C por 10 minutos para inativação da enzima. Após este procedimento, as amostras foram armazenadas em gelo até serem submetidas à reação de transcrição reversa.

5.6. REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA

O RNA extraído foi submetido à reação de transcrição reversa (RT-PCR) para a obtenção de cDNA, utilizando a enzima transcriptase reversa recombinante (Superscript III™, Invitrogen) com um oligonucleotídeo poli T-12 a 18 nucleotídeos, seguindo a metodologia descrita no material fornecido com a enzima.

5.7 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL

Para a quantificação da expressão gênica em tempo real, utilizamos o corante SybrGreen e o equipamento da Applied Biosystems. O princípio do método está baseado na detecção de fluorescência no tubo de reação à

medida que DNA dupla fita é gerado, em virtude da concentração do fluoróforo SybrGreen entre as cadeias de DNA amplificadas.

Os oligonucleotídeos iniciadores foram delineados a partir de seqüências disponíveis no banco de dados GenBank ou obtidos na literatura (Tabela 1).

A reação corre em uma máquina específica que mede a fluorescência gerada pela amplificação e dispõe os resultados em forma de gráfico, onde o eixo vertical representa o número de cópias e o horizontal demonstra o número de ciclos. O *threshold* é a linha pré-determinada utilizada para avaliação da curva de expressão, que é sigmoïdal e apresenta uma fase de crescimento exponencial e um platô, que é o ponto onde as replicações são reduzidas, o que ocorre por fatores como a falta de reagentes, a esta altura já consumidos. O chamado ciclo *threshold* (Ct) é o ponto onde a curva de expressão atinge o *threshold*. Quanto menor o valor de Ct, mais cópias de DNA estão presentes na amostra. Um controle negativo sempre é utilizado e os resultados são analisados comparativamente aos resultados da expressão de um gene de controle endógeno, sendo este necessariamente um gene de expressão comum às células do organismo estudado.

Em nosso experimento, foram analisadas a expressão dos genes AR, ER e HAS-2 em relação à expressão do controle endógeno ACTB, o que foi feito após o cálculo da eficiência das reações pelo método LinReg, e determinadas os valores de expressão relativa pelo método de Pfaffl et al. (2001), que é uma equação que fornece a razão entre a expressão dos genes alvo e a expressão do gene de controle endógeno.

5.8 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES POR PCR EM TEMPO REAL

O perfil de expressão dos mRNA codificadores da ER, AR e HAS-2 e dos genes de controle endógeno testados (GAPDH, UBC, ACTB) foi investigado por ensaio de PCR em tempo real em mRNA oriundo das células da granulosa obtidas com as aspirações dos diferentes grupos. Para isto, foi utilizado o kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem) para amplificação no ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystem), em colaboração com o Prof. Dr. José Buratini Jr, do Depto. De Fisiologia do Instituto de Biociências da UNESP-Botucatu.

A eficiência de amplificação dos genes foi estimada utilizando-se o programa LinRegPCR (Ramakers et al., 2003). Para tanto, foi considerada a eficiência média de cada gene com base na curva de amplificação individual de cada amostra. A variação na expressão dos genes foi normalizada pela frequência de expressão do gene constitutivo mais estável entre as amostras, determinado pelo programa geNorm (Vandesompele et al., 2002) A expressão relativa foi obtida pelo método $\Delta\Delta C_t$ corrigido pela eficiência da amplificação, na equação descrita por Pfaffl et al. (2001, figura 01).

5.9 VALIDAÇÃO DOS PRIMERS

Inicialmente, foram testadas diferentes condições de amplificação dos quatro genes, com variações nas combinações de temperatura de anelamento e concentração de primers. A eficiência de cada reação de amplificação foi calculada por meio de curva padrão através de diluições seriadas e pelo programa LinReg

PCR. As amostras obtidas *in vivo* e *in vitro* utilizadas para a padronização foram as que apresentaram maior quantidade e melhor qualidade de RNA, de acordo com análise prévia feita com o espectrofotômetro Nanodrop®.

TABELA 01: Seqüências de primers, tamanho do amplicon, condições e eficiências de amplificação de cada primer utilizado nos experimentos

Genes	Seqüência de Primers (5'-3')	Tamanho amplicon	Temperatura anelamento	[final] primer	Eficiência de amplificação
AR	S: - AGTGCTGATGGGTTTGAGGT AS: GGATATTTGTGGTTCGTTGTCA	132pb	58 °C	300nM	91%
ER	S: CAATAACGAAGTGCAGCTCTGA AS: GCATTGTCCATGCAAACAGT	53pb	61 °C	200 nM	84%
HAS-2	S: ACAAATGTGGCAGGCGGAAGAG AS: GTGATATGTCTCCGTTGGTGGCA	172pb	61 °C	300nM	83%
GAPDH	S: GTT TGT GAT GGG CGT GAA CC AS: TTG GCA CCA GTA GAA GC	255pb	60 °C	200nM	--
ACTB	S: CCA GCA CGA TGA AGA TCA AG AS: GTG GAC AAT GAG GCC AGA AT	88pb	60°C	200nM	88%

Diferenças na taxa de expressão dos genes foram normalizadas pela frequência daquele que foi considerado o melhor controle endógeno. Após a análise das amostras com o controle endógeno GAPDH, concluímos que o primer utilizado, apesar de ter sido obtido da literatura (Dellaquila et al., 2004), não apresentou eficiência de amplificação desejável. Em vista disso, novos primers para diferentes controles endógenos foram delineados e testados: β -actina (ACTB), e ubiquitina (UBC). Após a padronização, concluiu-se que o gene ACTB era o mais adequado, e decidiu-se utilizá-lo

como controle endógeno, por ter mostrado melhores resultados de amplificação em relação ao GAPDH.

$$Razão = \frac{(E_{alvo})^{\Delta Ct_{alvo} (controle-amostra)}}{(E_{ref})^{\Delta Ct_{ref} (controle-amostra)}}$$

FIGURA 03: Modelo matemático para cálculo da expressão relativa derivada de dados obtidos por PCR em tempo real. A razão de um gene alvo é expressa em relação ao gene constitutivo e normalizada em relação à amostra controle. E_{alvo} é a eficiência do transcrito do gene alvo; E_{ref} é a eficiência do transcrito gene referencia; ΔCt_{alvo} é desvio de CP do controle – amostra do gene alvo transcrito; ΔCt_{ref} é desvio de CT do controle – amostra do gene referência transcrito.

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de variância (ANOVA) foi realizada pelo procedimento PROC MIXED do SAS (versão 9.2) em que o modelo considera os animais como efeito aleatório e efeitos de tratamento, fase (imaturo e pré-ovulatório) dentro de tratamento e tempo (3 e 24 horas) dentro de tratamento e fase como efeitos fixos. As médias foram comparadas pelo teste t de Student. Os valores utilizados para essa análise foram as razões entre a expressão dos genes alvo em relação ao endógeno, calculadas pela equação de Pfaffl (2001).

6. RESULTADOS

Foram efetuadas, ao todo, 66 sessões de aspiração, tendo sido aspirados 93 folículos (Tabela 02). Destes folículos, os que não apresentaram desvio padrão aceitável na análise de expressão gênica das

duplicatas foram excluídos, sendo apenas 53 folículos incluídos nas análises iniciais de expressão gênica (anexo 01) e 23 na análise estatística final.

TABELA 02: Porcentagem de detecção dos genes em cada grupo

GRUPO \ GENE	GENE			
	HAS-2	ER	AR	ACTB
CIM	83%	100%	50%	100%
CPO	66%	44%	44%	66%
EPE IM24	0	66%	0	100%
EPE PO24	100%	100%	100%	100%
EPE/hCG IM24	85%	57%	57%	42%
EPE/hCG PO24	57%	85%	57%	85%
EPE/hCG PO3	60%	100%	40%	100%
HCG IM24	66%	100%	0	100%
HCG IM3	75%	100%	50%	100%
hCG PO24	100%	33%	100%	33%
HCG PO3	100%	50%	100%	50%

CIM: controle imaturo; **CPO:** controle pré-ovulatório; **EPE:** grupos estimulados com EPE; **EPE/hCG:** grupos estimulados com EPE e tratados com hCG; **hCG:** grupos tratados com hCG sem estimulação com EPE; **IM:** aspiração de folículos <30mm, **PO:** aspiração de folículos > 35mm.

O tamanho médio dos folículos aspirados por grupo está demonstrado na Tabela 03.

Do total de amostras restantes para a análise de expressão gênica, apenas 73% (49/53) detectaram expressão, mesmo com Ct alto, do controle endógeno e da ER, enquanto 75% (40/53) detectaram HAS-2 e 60% (32/53) a AR. Entre grupos, a variação da porcentagem de amostras onde foram detectados os genes avaliados variou entre 0 e 100% (Tabela

02). A análise descritiva dos dados em conjunto, considerando já as razões de expressão relativa, demonstra a grande variabilidade das amostras por seus altos erros padrão em relação à média das razões (tabela 04, figura 04).

TABELA 03: diâmetro médio do total de folículos aspirados por grupo

GRUPO	DIÂMETRO
CIM	31,83 ± 3,12
CPO	45,6 ± 4,21
EPE IM24	33,67 ± 3,21
EPE PO24	39 ± 2,82
EPE/hCG IM24	32,14 ± 2,54
EPE/hCG PO24	36,42 ± 3,4
EPE/hCG PO3	38 ± 3,74
HCG IM24	27,34 ± 4,93
HCG IM3	32,25 ± 4,34
hCG PO24	39,34 ± 4,16
HCG PO3	37 ± 1,41

CIM: controle imaturo; **CPO:** controle pré-ovulatório; **EPE:** grupos estimulados com EPE; **EPE/hCG:** grupos estimulados com EPE e tratados com hCG; **hCG:** grupos tratados com hCG sem estimulação com EPE; **IM:** aspiração de folículos <30mm, **PO:** aspiração de folículos > 35mm.

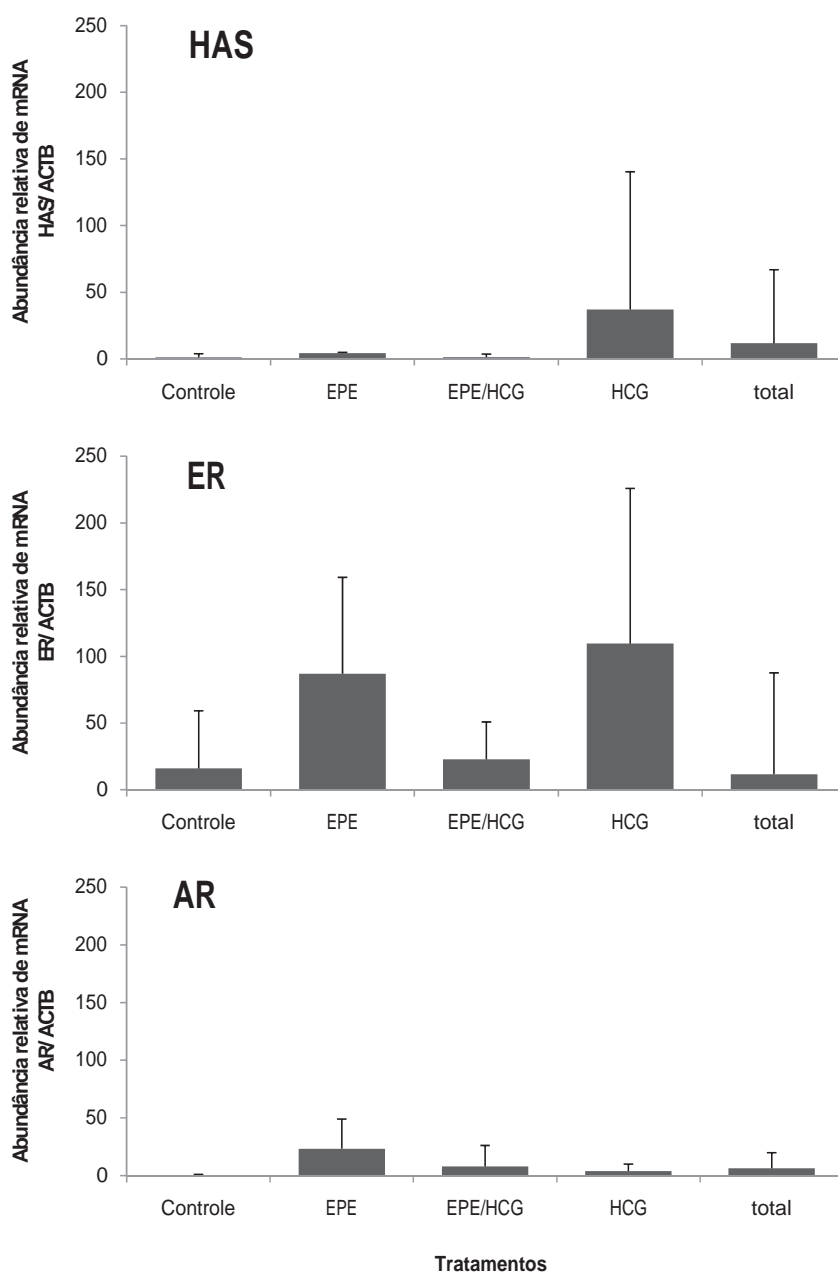


FIGURA 04: média das razões (equação Pfaffl, 2001) utilizada nos cálculos de expressão gênica, por gene.

TABELA 04 – Análise descritiva dos dados (média \pm desvio padrão da média) utilizados na expressão dos genes HAS, ER e AR de folículos imaturos e pré-ovulatórios de éguas nos tratamentos controle, EPE, HCG e HCG/EPE.

Genes	HAS		ER		AR	
	n	Média \pm DP	n	Média \pm DP	n	Média \pm DP
Controle	9	1,17 \pm 2,67	9	15,98 \pm 43,24	5	0,54 \pm 0,58
EPE	2	4,30 \pm 0,57	4	87,04 \pm 72,21	2	23,36 \pm 25,72
EPE/HCG	9	1,39 \pm 2,23	10	22,78 \pm 28,05	6	7,93 \pm 18,21
HCG	8	37,06 \pm 103,31	7	109,57 \pm 116,38	6	3,89 \pm 6,05
Total	28	11,72 \pm 55,11	30	11,72 \pm 75,91	19	6,33 \pm 13,54

A análise estatística não detectou efeito do tamanho dos folículos (imaturos ou pré-ovulatórios), nem dos tempos de tratamento (3 ou 24 horas) sobre a expressão dos genes avaliados. Também não houve diferença significativa em função da aplicação de EPE, hCG ou EPE com hCG em relação à expressão de HAS-2 e AR. O único gene que apresentou diferença significativa em sua expressão, de acordo com o tratamento hormonal efetuado, para um nível de significância de 0,05, foi a ER (Tabela 05).

TABELA 05 – Análise de variância (ANOVA) considerando os tratamentos controle, EPE, HCG e HCG/EPE, os grupos de células do *cumulus* provenientes de folículos imaturos e pré-ovulatórios (fase) as 3 e 24 horas (tempo).

Efeitos	HAS		ER		AR	
	GL	Pr > F	GL	Pr > F	GL	Pr > F
Tratamento	3	0,74	3	0,04	3	0,20
Fase (tratamento)	3	0,60	4	0,88	2	0,11
Tempo (tratamento*fase)	4	0,45	4	0,24	2	0,09

GL= graus de liberdade. P<0,05

A expressão de ER foi influenciada pelo tratamento hormonal, aumentando significativamente nos grupos EPE e hCG, mas no grupo EPE em associação com hCG sua expressão não diferiu do grupo controle. A expressão da HAS-2, embora tenha sido numericamente superior para o grupo tratado com hCG, não foi estatisticamente diferente da expressão dos outros grupos (Tabela 06, Figura 05).

TABELA 06 – Expressão relativa (média \pm erro padrão da média) do mRNA dos genes alvo nos grupos de células do *cumulus* de folículos imaturos e pré-ovulatórios, nos tratamentos propostos, às 3 e 24 horas em relação à amostra padrão, analisados por ANOVA e comparados por t de Student.

	HAS-2	ER
Controle	2,20 \pm 26,94 ^a	3,06 \pm 38,88 ^b
EPE	4,30 \pm 42,27 ^a	87,04 \pm 34,10 ^{ab}
EPE/HCG	2,27 \pm 22,67 ^a	22,92 \pm 25,58 ^b
HCG	37,23 \pm 25,89 ^a	125,39 \pm 26,96 ^a

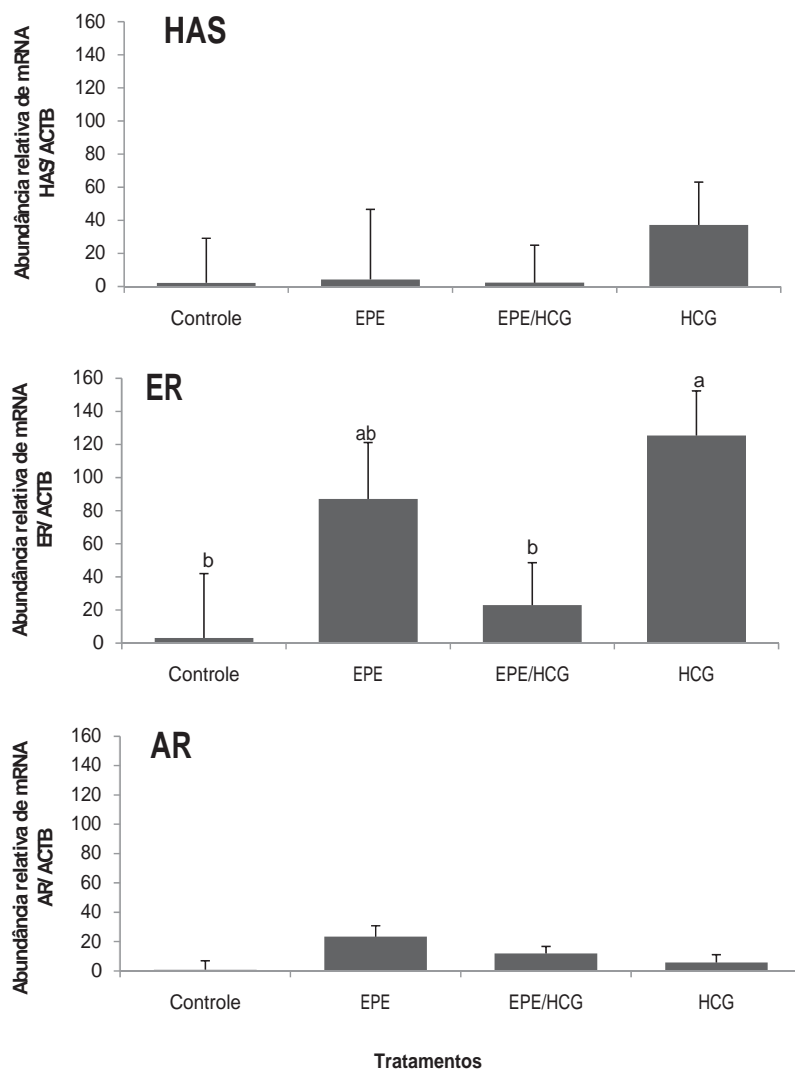


Figura 05 – Expressão gênica relativa da hialurona sintetase-2 (HAS-2) epirregulina (ER) e ampirregulina (AR) em folículos de eqüinos submetidos a diferentes tratamentos.

7. DISCUSSÃO

Em mamíferos a o estímulo pre-ovulatório do LH induz a retomada da meiose no oócito, a reprogramação das células da granulosa da parede folicular que passam a produzir um novo conjunto de RNAs e proteínas e a mudanças metabólicas nas células do *cúmulus* que passam a secretar uma matriz extra-celular especializada que se deposita ao redor do oócito, a qual é fundamental para o sucesso do processo de ovulação (PARK et al. 2004). Desta forma o uso de indutores da ovulação antes da aspiração é preconizado por diversos autores visando otimizar a liberação do oócito da parede folicular. Este procedimento é particularmente importante na espécie eqüina uma vez que o folículo ovariano eqüino apresenta algumas particularidades morfológicas que dificultam tanto a recuperação de oócitos quanto de células foliculares. Nesta espécie, as células da granulosa e os oócitos são anatomicamente mais aderidos aos folículos (HAWLEY et al., 1995) e índices de recuperação maiores que 80% são obtidos a partir da aspiração de folículos pré-ovulatórios após a administração de hCG (CARNEVALE E GINTHER, 1995).

Para outros indutores de ovulação, como o EPE e o GnRH, os índices obtidos em trabalho comparativo realizado por Squires et al. (1992) foram, respectivamente, 63 e 42%. No entanto, em folículos imaturos (<35 mm), nem a hCG nem o EPE foram capazes, de aumentar os índices de recuperação de oócitos obtidos por aspiração de folículos imaturos (BLANCO et al., 2008), o que também aconteceu em outros estudos publicados com folículos pré-ovulatórios, onde a superovulação, com FSH suíno (BRUCK et al., 1997) ou eqüino (PURCELL et al., 2007), EPE

(CARMO et al., 2007; BRUCK et al., 2000; SQUIRES et al., 1996) ou EPE enriquecido com FSH (BEZARD et al., 1995) não aumentou os índices de recuperação por folículo, embora aumente os índices de recuperação por égua.

No trabalho de Maclellan et al. (2002), os melhores índices foram obtidos a partir de éguas não estimuladas (69%) em comparação com as éguas superovuladas (20%). O baixo índice de recuperação pode ser atribuído à dificuldade de manipulação do ovário super estimulado. De fato no presente experimento observou-se em todas as coletas realizadas dificuldade na obtenção de material de estudo.

O folículo ovariano equino apresenta algumas particularidades morfológicas que dificultam tanto a recuperação de oócitos quanto de células foliculares. Nesta espécie, as células da granulosa e os oócitos são anatomicamente mais aderidos aos folículos (HAWLEY et al., 1995), por isso o procedimento de aspiração folicular deve ser feito com agulhas de grosso calibre (12Ga) e lúmen duplo, possibilitando além da aspiração propriamente dita, a lavagem e escarificação da parede folicular (MARI et al., 2005). Este procedimento resulta, via de regra, em contaminação do aspirado com sangue, e esta contaminação aumenta de acordo com o diâmetro do folículo, uma vez que quanto mais próximo do estágio pré-ovulatório, mais vascularizada se apresentará a parede folicular.

De acordo com Stock et al. (2002), ao contrário do que acontece em outras espécies, onde a expansão celular é verificada somente nas células do cumulus, em equinos o LH pré-ovulatório causa uma expansão de toda a camada das células da granulosa in vivo, incluindo as células da

granulosa mural. Entretanto, no presente experimento, a quantidade de células recuperada, mesmo de folículos estimulados com EPE e hCG foi extremamente variável e quase sempre pequena. Obviamente este fato foi agravado nos folículos imaturos, onde o estímulo hormonal não resultou em resposta significativa em termos de expansão das células foliculares.

Após as aspirações, o líquido folicular obtido era imediatamente centrifugado para retirada dos *pellets* de células, mas em alguns casos foram grandes as dificuldades em separar os pellets do coágulo sanguíneo que se apresentava no fundo do tubo. Além disso, mesmo após a centrifugação, algumas amostras não apresentavam *pellets* satisfatórios, o que significava que provavelmente a quantidade de células obtidas era muito pequena. De fato, através de observação empírica, foi possível associar, na maior parte das vezes, a presença de *pellet* visível com quantidade de mRNA obtido.

Esta dificuldade de obtenção de material para análise, inerente à espécie equina, foi grandemente refletida nos resultados, provavelmente por ter comprometido a qualidade das amostras, que continham células em quantidades variáveis, o que pode ter influenciado na enorme variação obtida entre amostras do mesmo grupo, observada em vários casos. Além disso, a necessidade de escarificação da parede folicular para retirada das células da granulosa torna impossível a obtenção de amostras sem presença de sangue, que pode ter sido deletério para o material genético celular.

Associado a este problema, a escassez de abatedouros de equinos no Brasil torna inviável o trabalho com ovários *post mortem*, o que facilitaria,

pelo menos, a padronização da técnica com relação aos *primers* utilizados e diferenças de expressão em células da teca e granulosa, uma vez que para nosso trabalho, de qualquer forma, precisaríamos de material obtido *in vivo*, para que pudessem ser avaliados os efeitos dos tratamentos hormonais propostos.

Investigações realizadas no decorrer da última década demonstraram que moléculas da família do EGF mimetizam alguns efeitos do EGF *in vitro* (PROCHAZKA et al. 2000). Frente a estes resultados Park et al. (2004) demonstraram que, em camundongos, o LH estimula as células da granulosa a produzir fatores de crescimento da família do EGF como AR, ER e BTC. Quando a liberação destes fatores é impedida no folículo de ratos por inibidores de metaloproteinases a maturação meiótica oocitária induzida por LH é suprimida (ASHKENAZI et al., 2005), e a ligação destes fatores a seus receptores nas células do cumulus resulta na expansão do *cumulus* e na quebra da vesícula germinativa (JOHNSON et al., 1993).

Em camundongos a administração de uma dose indutora da ovulação de hCG leva a uma elevação rápida e transitória da expressão do mRNA para AR, ER e BTC em um intervalo entre 1 a 3 horas após a injeção. Enquanto a expressão de AR e a BTC foi transitória o mRNA para ER permaneceu elevado por até 12 horas após a estimulação com gonadotrofina (PARK et al., 2004). Já em éguas foi demonstrado que o mRNA para AR e ER nas células da granulosa se elevam também em um intervalo de 0 a 2 horas após a administração de hCG. No entanto, enquanto a eipirregulina rapidamente declinava, uma nova elevação da

AR ocorria 4 horas após o hCG permanecendo elevada até 6 horas após a administração da droga (LINDBLOOM et al., 2008).

A maioria das publicações com análise de expressão gênica por PCR em tempo real de material obtido de folículos ovarianos é feita a partir de dados obtidos com animais de laboratório, humanos e bovinos, o que também dificultou a execução do nosso trabalho por falta de parâmetros para comparação.

As inconsistências observadas entre os resultados podem ser um reflexo da enorme variabilidade entre as expressões das amostras, com média e desvio padrão dos Cts muito alto, dificultando identificação de um padrão de expressão na grande maioria dos casos. Além disso, muitas amostras foram descartadas da análise estatística por não expressarem o gene de controle endógeno, o que inviabiliza a relativização da expressão gênica por meio do cálculo das razões. Outro fator que torna algumas amostras inviáveis para as análises é o desvio padrão entre as duplicatas. Ao analisar este fator, também foram excluídas amostras que apresentaram desvio padrão muito alto entre as duplicatas, o que tornaria pouco confiável o resultado.

Foi demonstrado na tabela 04 que nos grupos CPO, EPE/ HCG IM24 e HCG PO3, por exemplo, a porcentagem de expressão do gene de controle endógeno foi menor que a expressão dos genes avaliados, e na mesma tabela podemos observar que em alguns casos a média dos Cts da ACTB está próxima de 35, o que significa uma expressão muito baixa para o controle endógeno, o que só pode ser justificado pela baixa qualidade das amostras, uma vez que o fisiologicamente esperado é a

expressão do controle endógeno com Ct mais baixo que o do gene alvo. Foi considerada a hipótese de inadequação do *primer* do controle endógeno, entretanto descartamos esta possibilidade uma vez que na padronização, feita com uma amostra de boa qualidade, a eficiência da amplificação foi alta.

Ainda não se pode descartar a hipótese de que, pelo menos nos folículos imaturos, a detecção dos genes estudados poderia ser prejudicada pela dificuldade de recuperação de células da granulosa murais, as quais não se destacam facilmente da parede folicular. De acordo com Park et al. (2004) a expressão da AR, ER e BTC é restrita as células da granulosa mural e o sinal específico não foi detectado nas células do *cumulus* que circundam o oócito.

Nosso grupo já havia detectado influência da administração exógena de hCG sobre a expansão do *cumulus* em folículos imaturos (BLANCO et al., 2009), onde o tratamento superovulatório clássico com EPE associado à indução da ovulação com hCG, efetuado em folículos de várias categorias de tamanho, foi capaz de induzir a expansão do *cumulus* em folículos <30 mm. No mesmo trabalho, o EPE não foi capaz de induzir sozinho a expansão precoce do *cumulus*, e a partir daí surgiu a necessidade de uma explicação fisiológica para estas diferenças. Além disso, uma definição do padrão temporal de expressão de genes relacionados à expansão do *cumulus* (HAS-2) e à maturação folicular e oocitária (AR e ER) poderia auxiliar na criação de protocolos de tratamento hormonal destinados ao aumento do índice de recuperação de

oócitos por aspiração em eqüinos e no posterior aproveitamento destes oócitos para técnicas de produção *in vitro* de embriões.

Neste trabalho, não observamos diferença estatística entre folículos imaturos (<30 mm) e pré-ovulatórios (>35mm) em relação ao padrão geral de expressão dos genes estudados, o que pode ser justificado pelos dados de Goudet et al. (1999) que detectaram a expressão de LH-R tanto nas células da granulosa mural e do *cumulus* em folículos a partir de 5 mm, ou seja, ainda na fase independente de gonadotrofinas. A presença de receptores de LH em folículos imaturos explica a resposta destes ao estímulo gonadotrófico exógeno. Entretanto, estes autores estimularam os folículos ovarianos com EPE 34 horas antes da aspiração, o que pode ter induzido a expressão precoce destes receptores, uma vez que o FSH age em conjunto com o estradiol na indução de expressão de receptores para LH, e o EPE é um preparado parcial de gonadotrofinas que, portanto, contém FSH e LH. No presente estudo, a presença de FSH no EPE utilizado em associação ao hCG, também poderia ter induzido a expressão precoce de receptores para LH. No entanto, neste grupo foi observado um efeito estimulatório diminuído sobre a ativação da ER em comparação com o uso do hCG sozinho.

Além disso, encontramos diferença significativa na expressão de ER entre os grupos tratados e controle: o grupo tratado com hCG apresentou uma expressão de ER maior que os grupos controle, EPE sozinho e EPE com hCG, o que demonstra a indução da expressão de ER pela administração de hCG, resultado compatível com o observado em outras espécies (PARK et al., 2004; SEKIGUCHI et al., 2004; FRU et al.,

2007; PANIGONE et al., 2008), e em folículos pré-ovulatórios eqüinos por Lindbloom et al. (2007). Como não houve diferença entre a expressão nos grupos de folículos imaturos e pré ovulatórios, foi possível concluir, por esta análise preliminar, que a administração exógena de hCG é capaz de induzir a expressão de ER em folículos imaturos, o que pode justificar a maturação folicular precoce obtida pelo tratamento com hCG por nosso grupo em trabalhos anteriores (BLANCO et al., 2009).

A possível explicação para o efeito da associação de EPE com hCG ser menor que o efeito do uso isolado destes dois hormônios pode ser o mecanismo revisto por Bem-Ami et al. (2006), segundo o qual há um mecanismo de *down regulation* do LH sobre a ativação da ER e AR. Se tanto a hCG quanto o EPE se ligam aos receptores de LH, este mecanismo de *down regulation* pode ter sido ativado antes para a associação dos dois hormônios, resultando na baixa expressão relativa da ER nos momentos avaliados (3 e 24 horas após a administração da hCG).

Por sua vez, a ação da hCG isolada foi maior que a do EPE isolado, o que corrobora nossas observações anteriores (BLANCO et al., 2009), onde a hCG sozinha ou em associação com EPE induziu a maturação folicular precoce (expansão do *cumulus* e aumento da produção de progesterona) em folículos imaturos, mas o EPE sozinho não obteve o mesmo efeito, indicando que provavelmente a quantidade de LH no EPE utilizado era baixa, ou ainda que a hCG possui maior afinidade para os receptores de LH que o próprio LH, conforme proposto por Nogueira et al. (2007).

Quanto à expressão da HAS-2, foi observado que foi numericamente superior para o grupo tratado com hCG, tanto em folículos pré-

ovulatórios quanto em imaturos, demonstrando que a administração exógena de hCG pode induzir a expansão do *cumulus* em ambas as categorias de folículos e tempos de tratamento analisados, o que já havia sido demonstrado por Stock et al. (2002) em células da granulosa mural de folículos pré-ovulatórios de equinos, onde a expressão de HAS-2 aumentou às 12, 24 e 36 horas após a hCG, sendo maior as 36 horas. Neste experimento não conseguimos detectar diferença entre a expressão dos genes as 3 e 24 horas, o que pode significar que a indução da expressão da HAS-2 pela hCG pode ocorrer antes de 12 horas, entretanto nossos resultados devem ser analisados com cautela em função do baixo *n* experimental obtido após a exclusão das asmotras de baixa qualidade, conforme citado anteriormente.

Para uma indução mais expressiva da expansão precoce das células do *cumulus*, entretanto, outras substâncias além do ácido hialurônico devem estar presentes, como a IclI e o TSG-6 (RICHARDS et al., 2002), o que significa que não necessariamente a aplicação de hCG promove a expansão completa do *cumulus* com um resultante aumento do índice de recuperação de oócitos em folículos imaturos, o que também foi demonstrado por nosso grupo em trabalho anterior, onde apesar da indução precoce da expansão do *cumulus*, os índices de recuperação de oócitos não foram semelhantes aos observados em folículos pré-ovulatórios (BLANCO et al., 2009).

A expressão da AR geralmente segue o padrão da ER, e seu aumento pode ser induzido por gonadotrofinas exógenas. A literatura cita aumentos a partir de 30 minutos após a administração de LH

recombinante em ratos (PANIGONE et al., 2008), mas no geral os aumentos começam a ser detectados em 2-3 horas (FRU et al., 2007, PANIGONE et al., 2008), havendo relatos de detecção em até 24 horas após o estímulo com eCG (SEKIGUCHI et al., 2004).

Neste trabalho, a expressão de ER não foi diferente entre os tempos de tratamento (3 ou 24 horas após hCG), o que em parte condiz com os resultados apresentados por Lindbloom et al. (2007), onde o aumento inicial tanto da ER quanto da AR ocorreu entre 2 e 4 horas. Entretanto, a expressão de ER e AR não havia sido investigada antes em folículos de eqüinos em 24 horas após a indução da ovulação com hCG, quando de acordo com os nossos resultados a ER ainda é detectada.

Se observada a média dos Cts e a porcentagem de expressão da AR obtida nos diversos grupos analisados, entretanto, pode-se concluir que este gene, particularmente, não apresentou dados confiáveis para a análise, uma vez que mesmo nos grupos onde a porcentagem de expressão foi alta, consideramos a sua expressão muito baixa ao analisarmos a média dos Cts, na grande maioria dos grupos maior que 30. Portanto, embora a literatura demonstre que o padrão de expressão da AR é semelhante ao da ER em folículos pré-ovulatórios sob estímulo gonadotrófico exógeno (PARK et al., 2004; SEKIGUCHI et al., 2004; FRU et al., 2007; PANIGONE et al., 2008, LINDBLOOM et al., 2008), nossos dados infelizmente não nos permitiram estabelecer um padrão de expressão de AR em folículos eqüinos imaturos.

8. CONCLUSÃO

O tratamento com hCG foi capaz de induzir a expressão de ER tanto em folículos imaturos quanto em folículos pré-ovulatórios, demonstrando sua capacidade de indução da maturação folicular precoce. Observa-se também uma tendência do mesmo efeito ser obtido com a expressão de HAS-2, embora não tenha sido estatisticamente comprovado.

O tratamento superovulatório (EPE sozinho ou em associação com hCG) apresentou efeito menor na indução da expressão de ER que o tratamento com hCG sozinha.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTINI, D.F.; COMBELLES, C.M.H.; BENECCHI, E.; CARABATSOS, M.J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 121, p. 647–653, 2001.

ASHKENAZI, A.; CAO, X.; MOTOLA, S.; POPLIKER, M.; CONTI, M.; TSAFRIFRI, A. Epidermal Growth Factor Family Members: Endogenous Mediators of the Ovulatory Response. **Endocrinology**, v. 146, n. 1, p.77–84, 2005.

BEN-AMI, I.; FREIMANN, S.; ARMON, L.; DANTES, A.; RON-EL, R.; AMSTERDAM, A. Novel function of ovarian growth factors: combined studies by DNA microarray, biochemical and physiological approaches. **Molecular Human Reproduction**, v.12, n.7 p. 413–419, 2006.

BÉZARD, J.; GOUDET, G.; DUCHAMP, G.; PALMER, E. Preovulatory maturation of ovarian follicles and oocytes in unstimulated and superovulated mares. **Biology of Reproduction Monograph**, v.1, p. 261–271, 1995.

BLANCO, I.D.P.; DEVITO, L.G.; FERREIRA, H.N.; ARAUJO, G.H.M.; FERNANDES, C.B.; ALVARENGA, M.A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Aspiration of equine oocytes from immature follicles alter treatment with equine pituitary extract (EPE) alone or in combination with hCG. **Animal Reproduction Science** v. 114, p. 203-209, 2009.

BRUCK, I.; BEZARD, J.; BALTSSEN, M.; SYNNESTVEDT, B.; COUTY, I.; GREVE, T.; DUCHAMP, G. Effect of administering of a crude equine gonadotrophin preparation to mares on follicular development, oocyte recovery rate and oocyte maturation in vivo. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 118, p. 351-360, 2000.

BRUCK, I.; RAUN, K.; SYNNESTVEDT, B.; GREVE, T. Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound guided technique. **Equine Veterinary Journal**, v.24, n.1, p. 58-59, 1992.

BRUCK, I.; GRONDAHL, C.; HOST, T.; GREVE, T. In vitro maturation of equine oocytes: effect of follicular size, cyclic stage and season. **Theriogenology**, v.46, p. 75-84, 1996.

BRUCK, I.; GREVE, T. Transvaginal ultrasound-guided aspiration of follicular fluid in the mare. **Theriogenology**, v. 41, p. 170, 1994.

BRUCK, I.; SYNNESTVEDT, B.; GREVE, T. Repeated transvaginal oocyte aspiration in unstimulated and FSH- treated mares. **Theriogenology**, v. 47, p. 1157-1167, 1997.

BUCCIONE, R.; VANDERHYDEN, B.; CARON, P.J.; EPPIG, J.J. FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. **Developmental Biology**, v. 138, n. 1, p. 16-25, 1990.

CANIPARI, R. Oocyte-granulosa cells interactions. **Human Reproduction Update**, v. 6, n. 3, p.279-289, 2000.

CARMO, M.T. **Estudo do fluido folicular, transporte, recuperação e maturação de oócitos em éguas superovuladas com o extrato de pituitária eqüina.** 2007. 214f. Tese (doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu.

CARNEVALE, E.M.; COUTINHO DA SILVA, M.A.; PANZANI, D.; STOKES, J.E.; SQUIRES, E.L. Factors affecting the succes of oocyte tranfer in a clinical program fro subfertile mares. **Theriogenology**, v. 64, p. 519-527, 2005.

CARNEVALE, E.M. Use of oocyte transfer in a commercial program for mares with reproductive abnormalities. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 218, n.1, p. 87-91, 2001.

CARNEVALE, E.M.; GINTHER, O.J. Use of a linear ultrasonic transducer for the transvaginal aspiration and transfer of oocytes in the mare. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 13, n. 6, p. 331-333, 1993.

CARRETE, O.; NEMADE, R.V.; DAY, A.J. TSG-6 is concentrated in the extracellular matrix of mouse cumulus oocyte complex through hyaluronan and inter-alpha-inhibitor binding. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 301- 308, 2001.

CHEN, L.; ZHANG, H.; POWERS, R.W. Covalent linkage between proteins of the inter-alpha-inhibitor family and hyaluronic acid is mediated by a factor produced by granulosa cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 19409- 19414, 1996.

CONTI, M.; HSIEH, M.; PARK, J.Y.; SU, Y.Q. Role of the EGF network in ovarian follicles. **Molecular Endocrinology**, v. 20, n. 4, p.715-723, 2006.

DUCHAMP, G.; BEZARD, J.; PALMER, E. Oocyte yield and the consequences of puncture of all follicles larger than 8 millimeters in mares. **Biology of Reproduction Monograph**, v.1, p. 233-241, 1995.

EINSPANIER, R.; SCHOENFELDER, M. Expression of Hyaluronan Synthases and corresponding Hyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 269-277, 2003.

EPPIG, J.J. Regulation of cumulus oophorus expansion by gonadotropins in vivo and in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 23, p. 545-552, 1980.

ERICKSON, G.F.; SHIMASAKI, S. The role of the oocyte in folliculogenesis. **Trends Endocrinol Metab**, v. 11, p. 193-198, 2000.

ESPEY, L.L. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to a inflammatory reaction. **Biology of reproduction**, v. 50, p. 233-238, 1994.

FEUERSTEIN, P.; CADORET, V.; DALBIES-TRAN, R.; GUERIF, F.; BIDAULT, R.; ROYERE, D. Gene expression in human cumulus cells: one approach to oocyte competence. **Human Reproduction**, p. 1-9, 2007.

FULKA JUNIOR, J.; FIRST, N.L.; MOOR, R.M. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. **Molecular Human Reproduction**, v. 4, p. 41-49, 1998.

FULOP, C.; SALUSTRI, A.; HASCAL, V.C. Coding sequence of hialuronan synthase homologue expressed during expansion of the mouse cumulus oocyte complex. **Archives Biochemistry Biophysics**., v. 337, p. 261-266, 1997.

FULOP, C.; SZANTO, S.; MUKHOPADHYAY, D. Impaired cumulus mucification and female sterility in tumor necrosis factor-induced protein-6 deficient mice. **Development**, v. 130, p. 2253-2261, 2003.

GOUDET, G.; BELIN, F.; BÉZARD, J.; GÉRARD, N. Intrafollicular content of luteinizing hormone receptor, α -inhibin and aromatase in relation to follicular growth, estrous cycle stage, and oocyte competence for in vitro maturation in the mare. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 1120-1127, 1999.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. São Paulo, Manole, 2003, 530 p.

HAWLEY, L.R.; ENDERS, A.C.; HINRICHS, K. Comparison of equine and bovine oocyte-cumulus morphology within the ovarian follicle. **Biology Reproduction Monograph** v. 1, p.243-252, 1995.

HINRICHS, K.; KENNEY, R.M. A colpotomy procedure to increase oocyte recovery rates on aspiration of equine preovulatory follicles. **Theriogenology**, v.27, n.1, p. 237, 1987.

HUNTER, M.G.; ROBINSON, R.S.; MANN, G.E.; WEBB, R. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 461-477, 2004.

JESSEN, T.; ODUM, L. Role of tumor necrosis factor stimulated gene 6 (TSG-6) in the coupling of inter-alpha-typsin inhibitor to hyaluronan in human follicular fluid. **Reproduction**, v. 125, p. 27-31, 2003.

JOHNSON, G.; KANNAN, B.; SHOYAB, M.; STROMBERG, K. Amphiregulin induces tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor and p185erbB2. Evidence that amphiregulin acts exclusively through the epidermal growth factor receptor at the surface of human epithelial cells. **The Journal of Biological Chemistry** v. 268, p. 2924-2931, 1993.

KANITZ, W.; BECKER F.; ALM H.; TORNER H. Ultrasound-guided follicular aspiration in mares. **Biology of Reproduction Monograph**, v. 1, p. 225-231, 1995.

KERBAN, A.; BOERBOOM, D.; SIROIS, J. Human chorionic gonadotropin induces an inverse regulation of steroidogenic acute regulatory proteins messenger ribonucleic acid in theca interna and granulosa cells of equine preovulatory follicles. **Endocrinology**, v. 140, n.2, p. 667-674, 1999.

KIMATA, K.; ZHUO, L. Cumulus oophorus extracellular matrix: its construction and regulation. **Cell Structure and Function**, v. 26, p. 189-196, 2001.

LINDBLOOM, S.M.; FARMERIE, T.A.; CLAY, C.M.; SEIDEL JR, G.E.; CARNEVALE, E.M. Potential involvement of EGF-like growth factors and phosphodiesterases in initiation of equine oocyte maturation. **Animal Reproduction Science**, v. 103, p. 187-192, 2008.

MARI, G.; BARBARA, M.; ELEONORA, I.; STEFANO, B. Fertility in the mare after repeated transvaginal ultrasound-guided aspirations. **Animal Reproduction Science**, v. 88, p. 299-308, 2005.

MARTORIATI, A.; GÉRARD, N. Interleukin-I (IL-I) system gene expression in granulosa cells: kinetics during terminal preovulatory follicle maturation in the mare. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 43, 2003.

MEHLMANN, L.M. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. **Reproduction**, v.130, p. 791-799, 2005.

MUKHOPADHYAY, D.; HASCALL, V.C.; DAY, A.J. Two distinct populations of tumor necrosis factor-stimulated gene-6 protein in the extracellular matrix of expanded mouse cumulus cell-oocyte complexes. **Archive Biochemistry and Biophysics**. v. 394, p. 173-181, 2001.

NAGYOVA, E.; VANDERHYDEN, B.C.; PROCHAZKA, R. Secretion of Paracrine Factors Enabling Expansion of Cumulus Cells Is Developmentally Regulated in Pig Oocytes. **Biology of Reproduction**, v.63, p. 1149–1156, 2000.

NOGUEIRA, M.F.G.; BURATINI JR, J.; PRICE, C.A.; CASTILHO, A.C.S.; PINTO, M.G.L.; BARROS, C.M. Expression of LH receptor mRNA splice

variants in bovine granulosa cells: changes with follicle size and regulation by FSH in vitro. **Molecular Reproduction Development**, v. 74, p. 680-686, 2007.

PARK, J.Y.; YOU-QIANG, S.; ARIGA, M.; LAW, E.S.L; JIN, C.; CONTI, M. EGF-Like Growth Factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. **Science**, v. 303, p. 682-684 , 2004.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 2002-2007, 2001.

PINCTION, H.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. The molecular basis of oocyte growth and development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, p. 27-37, 1998.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREZ, R.H.; MOORMAN, A.F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v.339, p.62-66, 2003.

RICHARDS, J.S.; RUSSELL, D.L.; OCHSNER, S.; HSIEH, M.; DOYLE, K.H.; FALENDER, A.E.; LO, Y.K.; SHARMA, S.C. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation and luteinization. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 57, p. 195-220, 2002.

RICHARDS, J.S.; RUSSEL, D.L.; OCHSNER, S.; ESPEY, L.L. Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. **Annual Reviews of Physiology**, v. 64, p. 69-92, 2002.

RILEY, S.C.; THOMASSEN, R.; BAE, S.E.; LEASK, R.; PEDERSEN, H.G.; WATSON, E.D. Matrix metalloproteinase-2 and -9 secretion by the equine ovary during follicular growth and prior to ovulation. **Animal Reproduction Science**, v. 81, p. 329-339, 2004.

RUSSELL, D.L.; ROBKER, R.L. Molecular mechanisms of ovulation: coordination through the cumulus complex. **Human Reproduction Update**, v. 13, n. 3 p. 289–312, 2007.

SALUSTRI, A.; CAMAIONI, A.; D'ALESSANDRIS, C. Endocrine and paracrine regulation of cumulus expansion. **Zygote**, v.4, p. 313-315, 1996.

SENGER, P.L. **Pathways to pregnancy and parturition**. Pullman, Current Conceptions Inc., 2005, 373 p.

SHIMADA, M.; HERNANDEZ-GONZALES, I.; GONZALEZ-ROBAYNA, I.; ROCHARDS, J.S. Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: Key roles for Prostaglandin Synthase 2 and progesterone receptor. **Molecular Endocrinology**, v. 20, n. 6, p. 1352-1365, 2006.

SIROIS, J.; KIMMICH, T.L.; FORTUNE, J.E. Developmental changes in steroidogenesis by equine preovulatory follicles: effects of equine LH, FSH, and CG. **Endocrinology**, v.127, p. 2423-2430, 1990.

SIROIS, J.; KIMMICH, T.L.; FORTUNE, J.E. Steroidogenesis by equine preovulatory follicles: relative roles of theca interna and granulosa cells. **Endocrinology**, v. 128, p.1159-1166, 1991.

SQUIRES, E.L.; COOK, N.L. Transvaginal aspiration. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.12, n. 1, p. 13-29, 1996.

STOCK, A.E.; BOUCHARD, N.; BROWM, K.; SPICER, A.P.; UNDERHILL, C.B.; DORÉ, M.; SIROIR, J. Induction of hialuran synthase 2 by human Chorionic Gonadotropin in mural granulosa cells of equine preovulatory follicles. **Endocrinology**, v. 143, n. 11, p. 4375-4384, 2002.

TANGHE, S.; SOOM, A.V.; NAUWYNCK, H.; CORYN, M.; KRUIP, A. D. Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation and fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, p. 414-424, 2002.

TORNER, H.; ALM, H. Meiotic configuration of horse oocytes in relation to the morphology of the cumulus-oocyte complex. **Biology of Reproduction Monograph**, v.1, p. 253-259, 1995.

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**, v.3, p.1-11, 2002.

VOGELSANG, M.M.; KEIDER, J.L.; POTTER, G.D. Methods for collecting follicular oocytes from mares. **Theriogenology**, v. 29, n. 5, p. 1007-1018, 1988.

ZHUO, L.; KIMATA, K. Cumulus oophorus extracellular matrix: its construction and regulation. **Cell structure and function**, v. 26, p. 189-196, 2001.

ANEXO 01: Média dos Cts das duplicatas das amostras após exclusão das amostras com desvio padrão entre duplicatas $>0,3$. ND: não detectadas.

AMOSTRA	GRUPO	HAS	EREG	AREG	ACTB PL1
		Ct	Ct	Ct	Ct
26/01 31F35	EPE/HCG PO3	32,448	30,5761	ND	22,5103
26/01 31F41	EPE/HCG PO3	ND	31,2446	ND	39,1678
26/01 56F40	EPE/HCG PO3	27,59575	24,86205	33,65925	21,63855
05/03 63F33	EPE/HCG PO3	ND	38,4414	ND	29,82155
12/01 35F41	EPE hCG PO3	24,25	34,9674	24,2831	31,59345
21/01 36F35	EPE/HCG PO24	ND	36,0307	ND	37,451
08/02 36F35	EPE/HCG PO24	ND	33,76115	ND	35,94475
20/01 33pF41	EPE/HCG PO24	32,3915	31,06725	34,051	26,63285
23/01 35F33	EPE/HCG PO24	ND	34,2603	ND	37,9139
23/11 31F33	EPE/hCG PO24	17,25	36,0534	32,1747	37,63425
24/01 M4F37	EPE/hCG PO24	22,31	38,03125	31,3104	30,8356
24/01 M4F41	EPE/HCG PO 24	33,15	ND	35,1194	ND
20/03 255F32	EPE/HCG IM24	31,33915	30,8479	39,03315	22,4406
20/03 255F27	EPE/HCG IM24	34,18945	28,30445	ND	24,2586
08/03 48F33	EPE/HCG IM24	ND	34,8976	ND	und
08/03 48F31	EPE/HCG IM24	30,1621	30,71835	ND	20,1629
10/01 31F34(1)	EPE/hCG IM24	27,47	ND	35,12375	38,6695
10/01 31F34(2)	EPE/HCG IM24	25,56	ND	33,80255	ND
10/01 31F4	EPE/hCG IM24	33,47	ND	36,56025	ND
15/01 48F37	HCG PO3	21,61	29,5726	23,8532	25,773
2/12 M4F38	hCG PO3	36,07415	ND	28,4389	ND
5/12 12F35	hCG PO3	22,96505	28,89525	20,35315	23,79845
17/01 27F38	hCG PO3	31,39	ND	37,09595	ND
7/01 M4F44	hCG PO24	36,46	ND	36,43525	ND
30/12 48F38	hCG PO24	35,00	ND	34,7569	ND
23/11 31F36	hCG PO24	26,42415	38,6592	30,8444	36,94745
14/01 56F25	HCG IM24	ND	30,71835	ND	31,87625
18/01 49F24	HCG IM24	30,61755	30,88455	ND	22,5856
21/03 40F33	HCG IM24	26,3599	28,3875	ND	27,317
10/03 38F38	HCG IM3	28,7581	19,5959	27,50725	18,29795
10/03 56F30	HCG IM3	28,7581	29,3316	ND	21,5908
21/03 35F28	HCG IM3	ND	19,1185	ND	26,27045
21/03 40F33	HCG IM3	21,2623	28,3875	37,788	28
08/02 35F37	EPE PO24	29,58275	30,2764	30,7278	23,29425
08/02 35F41	EPE PO 24	31,34625	27,7514	36,153	25,26355
23/01 38F30	EPE IM24	ND	38,96	ND	35,032
02/02 48F36	EPE IM24	ND	30,8472	ND	29,0026
23/02 31F30	EPE IM24	ND	ND	ND	29,4436
IV3	CPO 3	ND	ND	ND	29,9188
IV6	CPO3	ND	ND	ND	35,89655
19/12 M4FX	CPO3	23,15	35,1666	28,51385	32,67815
IV1	CPO 24	25,3948	29,2437	32,66045	ND
08/01 70F41	CPO 24	ND	29,47825	35,61175	35,41105
10/01 35F41	CPO24	32,25725	34,4776	ND	27,00055
28/12 C1CF48	CPO24	29,48	ND	33,3325	ND
16/11 27F49	CPO24	38,71	ND	ND	ND
16/11 27F49	CPO24	34,43	ND	ND	38,80415
11/02 31F33	CIM24	26,696	29,6474	31,7038	18,74875
22/02 63F27	CIM24	37,3321	35,46375	37,66015	22,8589
04/12 33F34	CIM24	ND	38,2896	ND	26,49525
24/02 38F35	CIM24	28,58715	30,15145	33,59855	20,2141
28/03 31F33	CIM24	35,21745	30,38585	ND	23,01255
07/01 33pF29	CIM3	39,03185	36,95195	ND	21,9781

Artigo científico a ser enviado para a revista *Animal Reproduction Science*

**EFFECT OF HCG ON EPIREGULIN, AMPIREGULIN AND HIALURONAN
SYNTHASE-2 EXPRESSION IN EQUINE FOLLICLES STIMULATED OR NOT
WITH EQUINE PITUITARY EXTRACT**

Blanco, I.D.P¹, Ripamonte, P.², Machado, M.F², Maziero, R.R.1, Figueiredo L. G. G.,

Monteiro, B.A¹. Alvarenga, M.A.¹, Buratini Jr. J²., Landim-Alvarenga, F.L.C¹

¹: Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology-FMVZ-UNESP- Botucatu-SP- Brazil

²: Laboratory of Molecular Ovarian Physiology – IB- UNESP- Botucatu- SP- Brazil

Abstract

The modifications observed on mammalian follicles after the pré-ovulatory surge of LH are mediated by growth factors like epiregulin (ER), which is responsible for the cumulus cells expansion and interfere with the oocyte maturation. The LH also stimulates the deposition of hyaluronic acid mediated by the hialuronan synthase -2 (HAS-2). In horses, the expression of HAS-2 and ER was already characterized in pre-ovulatory follicles, after the administration of hCG. In the present experiment we were able to demonstrate that the hCG is also able to induce the expression of ER in equine follicles smaller than 30mm in diameter, confirming an ability of immature follicles in responding to hormonal stimuli. Although no statistic differences were observed among groups a tendency to the same effect was also observed for the HAS-2. Similarly, the use of EPE stimulated the expression of ER, but when EPE and hCG were combined a decrease in expression was observed. This observation indicates a mechanism of down regulation exerted by the LH on the ER and HAS expression.

Key words: epiregulin, hialuronan synthase-2, equine, follicular maturation, EPE, hCG

Introduction

Ovarian follicles are morphological and functional unities where the somatic and the germinative cells are in intimate association forming an inter-dependent element fundamental for the development of a mature healthy follicle that will release a competent oocyte for fertilization (Canipari et al, 2000).

In mammals the pre-ovulatory surge of LH is responsible for a series of changes in the follicle, which includes meiosis resumption, differentiation and reprogramming of steroidogenic activity of mural granulosa cells, and expansion of *cumulus* cells (Park et al, 2004; Tsafiriri et al, 2005).

The meiosis resumption and ovulation is controlled by the follicular cells through a cascade of events triggered by the LH surge. The periovulatory cascade is controlled by many factors, including hormones, immunological signals, metabolic factors and paracrine signals of the theca, mural granulosa, cumulus cells and the oocyte itself (Russell and Robker, 2007).

The expression of LH receptor (LH-R) initially restricted to the theca cells, is observed in mural granulosa cells in the final stages of follicular development, but these receptors are absent or in very low numbers in the cumulus cells and in the oocyte, which makes these cells unresponsive to direct stimulation by LH, requiring the presence of paracrine mediators (Mehlmann et al, 2005; Park et al, 2004; Conti et al, 2006). It is now established that the effects of LH on the cumulus-oocyte-complex (COC) are mediated by epidermal growth factor (EGF)-like family members, amphiregulin (AR), ephrins (ER) and betacellulin (BTC), which are secreted by mural granulosa cells in response to LH and act upon cumulus cells, where they stimulate their own synthesis (Park et al, 2004; Conti et al, 2006; Russell and Robker, 2007).

These molecules then activate the EGF receptor (EGFR) on cumulus cells and stimulate the expression of genes necessary for cumulus expansion. The main component of the extracellular matrix which involves the COC expansion is the hyaluronic acid (HA), a glycosaminoglycan of high molecular weight produced in the ovary by the granulosa and cumulus. Besides being the main component of the extracellular matrix, the HA is also responsible for the visco-elastic characteristic of the expanded COC (Zhuo and Kimata, 2001, Richards et al, 2002). The setting time of the deposition of HA appears to occur at the transcriptional level of the enzyme hialurona synthetase-2 (HAS-2), whose mRNA is found in the cumulus cells one hour after the LH peak, and disappears when the synthesis of HA ceases, as demonstrated in mice by Fulop et al (1997).

In horses, the expression of HAS-2, ampirregulina (AR) and epirregulina (ER) in response to administration of hCG in pre-ovulatory follicles was already characterized (Lindbloom, 2008, Stock et al, 2002). However, the action of hCG in immature follicles is unclear, although our group has successfully demonstrated the expansion of cumulus cells after the administration of this hormone in follicles smaller than 30 mm (Blanco et al, 2009). The influence of the superovulation protocol (EPE + hCG) on the expression of these factors in pre-ovulatory follicles was also not determined, and the hypothesis that possible changes in the microenvironment of peri-ovulatory follicle could explain the deficiencies in the maturation of oocytes from superovulated mares should be considered.

Material and Methods

A total of 12 mares, aged between 4 and 15 years, weighing between 250 and 400 kg and with historic of normal cyclicity and fertility were used during the breeding seasons (October-March) of the years 2009-2010 and 2010-2011. Follicular dynamics was accompanied by rectal palpation and ultrasound (AQUILAVET, ESAOTE-PIE MEDICAL, NETHERLANDS) using a 5 MHz linear transducer on alternate days until a follicle with 30 mm was observed or the hormone therapy started, when daily monitoring was initiated. The equine pituitary extract was prepared according to the method proposed by Guillon & Combarous, (1983) in the laboratory of the University of São Paulo State (UNESP), Botucatu. The OPUS were performed as described in previous works (Blanco et al 2008), and the follicular fluid and intra-follicular flushes were taken individually to Petri dishes (45x25) with checkered background, for rapid inspection on stereomicroscope with 40x magnification for viewing the amount and appearance of the follicular cells obtained, which were quickly removed from the plate with the aid of automatic pipette. Follicular fluid remaining was centrifuged to separate the pellet consisted of the follicular cells remaining.

Experimental design:

EXPERIMENT 1: Analysis of expression of ER and HAS-2 in pre-ovulatory follicles in mares subjected to different hormonal treatments:

The mares were randomly divided in the following groups:

a) **CPO - Group control pre-ovulatory** (without superovulation treatment and with no induction of ovulation) - On the seventh day following ovulation a dose of 1 ml of prostaglandin analog (dinoprost, 5mg/ml) was administered. Aspiration was

performed between 3 and 24 hours after the detection of a follicle with 35-40 mm in diameter.

b) EPE / hCG PO - Group EPE / hCG pre-ovulatory (superovulated with induction of ovulation) On the seventh day following ovulation a dose of 1 ml of prostaglandin analog (dinoprost, 5mg/ml) was administered and the superovulatory treatment started with application of 6 mg of EPE, BID. When most of the follicle reached 35 mm in diameter, a dose of hCG (2500 IU) was administered and follicular aspirations were performed after 3 or 24 hours.

c) hCG PO - Group hCG pre-ovulatory (not superovulated with induction of ovulation): Seven days after ovulation the animals received a dose of 1 ml of prostaglandin analog (dinoprost, 5mg/ml) and hCG (2500 IU, iv) was administered when the presence of a follicle 35 mm in diameter was detected. The OPUS were made after 3 or 24 hours.

d) EPE PO - Group EPE pre-ovulatory (superovulated without induction of ovulation): The superovulatory treatment was performed as in group 2, and when the largest follicle reached 35 mm aspirations were performed at 3 and 24 hours, as in previous groups.

EXPERIMENT 2: Analysis of expression of ER and HAS-2 in immature follicles in mares subjected to different hormonal treatments:

The mares were randomly divided in the same four treatment groups described for experiment 1. The aspirations were performed 3 or 24 hours after detection of a follicle with 30 mm in diameter. The groups were: immature (CIM), EPE / hCG immature (EPE / hCG IM), hCG immature (hCG IM) and EPE immature (EPE IM).

RNA extraction

After crushed and homogenized in a polytron (Ultraturrax ®), samples of theca cells and granulosa cells were submitted to the Trizol ® (Invitrogen™) for the extraction of total RNA. This protocol was performed in four sequential steps: separation, precipitation, washing and dissolution of total RNA.

Reverse transcription reaction

The extracted RNA was subjected to reverse transcription reaction (RT-PCR) to produce cDNA using the recombinant enzyme reverse transcriptase (Superscript III™, Invitrogen) with a poly T oligonucleotide, 12-18 nucleotides. The method of reverse transcription reaction is described in the material provided with the enzyme.

Characterization of the pattern of gene expression by real time PCR

The expression profile of mRNA encoding the ER and HAS-2 gene as well as the endogenous control gene ACTB was investigated by testing real-time PCR in mRNA derived from granulosa cells obtained with the different groups of OPUS. For this, we used the kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) for amplification on the ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). The efficiency of gene amplification was estimated using the program LinRegPCR (Ramakers et al., 2003). Therefore, we considered the average efficiency for each gene based on the amplification curve for each individual sample. Variation in gene expression was normalized by the frequency of constitutive gene expression between the more stable samples, as determined by the program geNorm (Vandesompele et al, 2002). The relative expression was obtained by the method $\Delta\Delta C_t$ corrected by the efficiency of amplification, in the equation described by Pfaffl et al (2001)

Table 01:

Sequences of primers, amplicon size, conditions and efficiency of each amplification primer used in the experiments

Genes	Sequences of primers (5'- 3')	Amplicon size	Annealing temperature	[primer]	Amplification efficiency
ER	S: CAATAACGAAGTGCAGCTCTGA AS: GCATTGTCCATGCAAACAGT	53pb	61 °C	200 nM	84%
HAS-2	S: ACAAATGTGGCAGGCGGAAGAG AS: GTGATATGTCTCCGTTGGTGGCA	172pb	61 °C	300nM	83%
ACTB	S: CCA GCA CGA TGA AGA TCA AG AS: GTG GAC AAT GAG GCC AGA AT	--	60°C	200nM	88%

Statistical Analysis

The analysis of variance (ANOVA) was performed by PROC MIXED procedure of SAS (version 9.2) that considered the animals as a random effect and treatment, follicular phase (immature and preovulatory) and time (3 to 24 hours) as fixed effects. Means were compared by Student's t test. The values used for this analysis were the ratios between target gene expression relative to the endogenous gene calculated by Pfaffll equation (2001).

Results

The statistical analysis did not detect any effect according to the size of the follicles (immature or preovulatory) or the time of OPU (3 or 24) on the expression of the studied genes. There was no significant difference depending on the application of EPE, EPE with hCG or hCG on the expression of HAS-2. The only significant

difference on gene expression, in accordance with the hormonal treatment performed, was observed for the ER (Table 02).

Table 02

Analysis of variance (ANOVA) whereas the control treatments, EPE, hCG and hCG / EPE, groups of cumulus cells from immature and pre-ovulatory follicles (Phase) aspirated at the 3 and 24 hours (Time) after treatment.

Effect	HAS		ER	
	GL	Pr > F	GL	Pr > F
Treatment	3	0,74	3	0,04
Phase	3	0,60	4	0,88
Time	4	0,45	4	0,24

GL= degrees of freedom. P<0,05

The expression of ER was influenced by hormone treatment, significantly increasing in the groups hCG and EPE. However, when EPE was used in combination with hCG the expression of ER did not differ from control group (Table 03, Figure 01). The expression of HAS-2, although numerically higher in the group treated with hCG was not statistically different from the other groups.

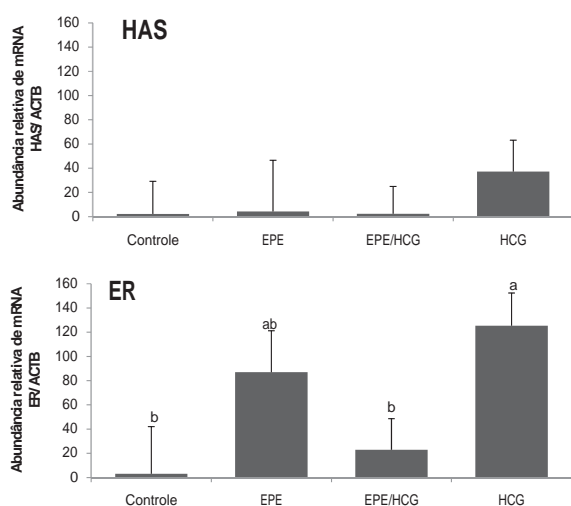
Table 03

Relative mRNA expression (mean \pm standard error of mean) of the target genes in groups of cumulus cells from immature and pre-ovulatory follicles, in the proposed treatments, at 3 and 24 hours compared to the standard sample, (analyzed by ANOVA and compared by Student t test).

	HAS-2	ER
Control	2,20±26,94 ^a	3,06±38,88 ^b
EPE	4,30±42,27 ^a	87,04±34,10 ^{ab}
EPE/HCG	2,27±22,67 ^a	22,92±25,58 ^b
HCG	37,23±25,89 ^a	125,39±26,96 ^a

Figure 01

Relative gene expression of hyaluronan synthase-2 (HAS-2) epiregulina (ER) in follicles of horses subjected to different treatments.



Discussion

The equine ovarian follicle presents some morphological peculiarities that hinder the recovery of both oocytes and follicular cells. In this species, granulosa cells and oocytes are more anatomically attached to the follicles (Hawley et al, 1995), so the follicle aspiration procedure should be done with large-caliber double lumen needle (12ga), allowing in addition to aspiration, washing and scraping of the follicular wall (Mari et al, 2005). Furthermore, the use of ovulation-inducers before the OPU is advocated by several authors to optimize the release of the egg from the follicular wall.

According to Stock et al (2002), unlike other species where the cell expansion is only observed in cumulus cells, in the equine LH preovulatory stimulus causes expansion of the entire layer of granulosa cells in vivo, including the mural granulosa cells. However, in this experiment, the number of cells recovered, even when follicles were stimulated with EPE and hCG was extremely variable and often low.

Our group had already detected the influence of exogenous administration of hCG on cumulus cells expansion in immature follicles (Blanco et al, 2009), where the classic superovulation treatment with EPE associated with induction of ovulation like hCG, was able to induce cumulus expansion in follicles <30 mm. In the same study, the EPE alone was unable to produce cumulus expansion, and from there came the need for a physiological explanation for these differences. Furthermore, a definition of the time pattern of expression of genes related to cumulus expansion (HAS-2) and the follicle maturation (ER) may assist in creating a hormonal treatment protocols to increase the rate of oocyte recovery during OPU in horses and the subsequent use of these techniques for in vitro production of embryos.

In this study, we found no statistical difference between immature (<30 mm) and preovulatory (> 35mm) follicles compared to the general pattern of expression of the studied genes. This can be justified by the data of Goudet et al (1999) who detected the expression of LH-R both in mural and cumulus granulosa cells in follicles as smaller as 5 mm, in other words, in a phase not yet under the influence of gonadotropins. The presence of LH receptors in immature follicles explains their response to exogenous hormonal stimulation. However, the authors stimulate the follicles with EPE 34 hours before the OPU, which could induced an early expression of these receptors, since FSH acts together with estradiol in the induction of expression of LH receptors, and EPE contains both FSH and LH. In the present study, the presence of FSH in the EPE in

combination with hCG could also have induced early expression of LH receptors. However, in this group a diminished stimulatory effect on the activation of ER was observed in comparison with the use of hCG alone.

In the present work we found significant differences in the expression of ER between treated and control groups: in group treated with hCG, ER expression was greater than the control group, EPE alone and EPE+hCG, demonstrating the induction of the expression of ER by hCG. This result is consistent with that seen in other species (Park et al, 2004; Sekiguchi et al, 2004; Fru et al, 2007; Panigone et al, 2008), and also in equine preovulatory follicles by Lindbloom et al (2007). As there was no difference in expression between groups of pre-ovulatory and immature follicles, it was possible to conclude that the exogenous administration of hCG is able to induce the expression of ER in immature follicles, which may account for follicular maturation obtained by early treatment with hCG by our group in previous works (Blanco et al, 2009).

A possible explanation for the effect of the combination with hCG+EPE be smaller than the isolated effect of these hormones can be reviewed by the mechanism described by Bem-Ami et al (2006), according to which there is a down-regulation of LH on activation of ER and AR. If both the hCG and the LH present in the EPE bind to LH receptors, this down-regulation mechanism may have been activated in the above case of the association of two hormones, resulting in reduced expression of ER on the studied times (3 and 24 hours after administration of hCG).

In turn, the effect of hCG alone was higher than the EPE alone, which confirms our earlier observations (Blanco et al, 2009), where the hCG alone or in combination with EPE induced follicular maturation (cumulus expansion and increased production of progesterone) in immature follicles, but the EPE alone did not obtain the same effect. Probably this result indicate that the amount of LH in the EPE was low, or that hCG has

a higher affinity for LH receptors than the actual LH as proposed by Nogueira et al (2007).

In the present study, the expression of ER was not different between OPU moments (3 or 24 h after hCG), which is partly consistent with the results presented by Lindbloom et al (2007), where the initial increase in ER occurred between 2 and 4 hours. However, expression of ER has not been previously investigated in equine follicles within 24 hours after hCG treatment, when in accordance with our results the ER is still detected in the follicles.

The HAS-2 expression was numerically higher for the group treated with hCG in both pre-ovulatory and immature follicles, demonstrating that the administration of exogenous hCG can induce cumulus expansion in both categories of follicles. Similar results have been shown by Stock et al (2002) in mural granulosa cells of preovulatory follicles of horses, where the expression of HAS-2 increased on 12, 24 and 36 hours after the Administration hCG being higher at 36 hours. In the present experiment no differences were detected between the expression of genes at 3 and 24 hours after hCG, which indicate that the induction of expression of HAS-2 by hCG starts before 12 hours.

Conclusion

The treatment with hCG was able to induce the expression of ER both in immature and in pre-ovulatory follicles. There was also a tendency for the same effect to be obtained with the expression of HAS-2, although not statistically proven. The superovulation (EPE alone or in combination with hCG) had less effect on the induction of expression of ER than treatment with hCG alone, which can be explained by the down-regulation mechanism that LH has on the activation of growth factors bound to EGF, such as the ER. The elucidation of the effects of the change in expression of these factors on the hCG-induced oocyte maturation as well as the temporal pattern of induction would

assist in the development of hormonal treatment protocols to increase oocyte recovery and improvement of in vitro production techniques for equine embryos.

Acknowledgements: Financial support by FAPESP, CAPES.

References

- ALBERTINI, D.F. et al. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 121, p. 647–653, 2001.
- BEN-AMI, I. et al. Novel function of ovarian growth factors: combined studies by DNA microarray, biochemical and physiological approaches. **Molecular Human Reproduction**, v.12, n.7 p. 413–419, 2006.
- BÉZARD, J. et al. Preovulatory maturation of ovarian follicles and oocytes in unstimulated and superovulated mares. **Biol. Reprod. Mono**, v.1, p. 261-271, 1995.
- BLANCO, I.D.P. et al. Aspiration of equine oocytes from immature follicles alter treatment with equine pituitary extract (EPE) alone or in combination with hCG. *Anim. Reprod. Sci.* v. 114, p. 203-209, 2009.
- BRUCK, I. et al. Effect of administering of a crude equine gonadotrophin preparation to mares on follicular development, oocyte recovery rate and oocyte maturation in vivo. **Journal of reproduction and fertility**, v. 118, p. 351-360, 2000.
- BRUCK, I.; GREVE, T. Transvaginal ultrasound-guided aspiration of follicular fluid in the mare. **Theriogenology**, v. 41, p. 170, 1994.
- BRUCK, I. et al. In vitro maturation of equine oocytes: effect of follicular size, cyclic stage and season. **Theriogenology**, v.46, p. 75-84, 1996.
- BRUCK, I. et al. Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound guided technique. **Equine Veterinary Journal**, v.24, n.1, p. 58-59, 1992.
- BRUCK, I.; SYNNESTVEDT, B.; GREVE, T. Repeated transvaginal oocyte aspiration in unstimulated and FSH- treated mares. **Theriogenology**, v. 47, p. 1157-1167, 1997.
- BUCCIONE, R. et al. FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte. **Developmental biology**, v. 138, n. 1, p. 16-25, 1990.
- CANIPARI, R. Oocyte-granulosa cells interactions. **Human Reproduction Update**, v. 6, n.3, p.279-289, 2000.
- CARMO, M.T. Estudo do fluido folicular, transporte, recuperação e maturação de oócitos em éguas superovuladas com o extrato de pituitária equina. 2007. 214f. Tese (doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade estadual paulista- UNESP-Botucatu.

- CARNEVALE, E.M. Use of oocyte transfer in a commercial program for mares with reproductive abnormalities. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 218, n.1, p. 87-91, 2001.
- CARNEVALE, E.M. et al. Factors affecting the succes of oocyte tranfer in a clinical program fro subfertile mares. **Theriogenology**, v. 64, p. 519-527, 2005.
- CARNEVALE, E.M.; GINTHER, O.J. Use of a linear ultrasonic transducer for the transvaginal aspiration and transfer of oocytes in the mare. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 13, n. 6, p. 331-333, 1993.
- CARRETE, O.; NEMADE, R.V.; DAY, A.J. TSG-6 is concentrated in the extracellular matrix of mouse cumulus oocyte complex through hyaluronan and inter-alpha-inhibitor binding. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 301- 308.
- CHEN, L.; ZHANG, H.; POWERS, R.W. Covalent linkage between proteins of the inter-alpha-inhibitor family and hyaluronic acid is mediated by a factor produced by granulosa cells. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 19409- 19414, 1996.
- CONTI, M. et al. Role of the EGF network in ovarian follicles. **Molecular Endocrinology**, v. 20, n. 4, p.715-723, 2006.
- DUCHAMP, G.; BEZARD, J.; PALMER, E. Oocyte yield and the consequences of puncture of all follicles larger than 8 millimeters in mares. **Biol. Reprod. Mono**, v.1, p. 233-241, 1995.
- EINSPANIER, R., SCHOENFELDER, M. Expression of Hyaluronan Synthases and corresponding Hyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 269-277, 2003.
- EPPIG, J.J. Regulation of cumulus oophorus expansion by gonadotropins in vivo and in vitro. **Biology of reproduction**, v. 23, p. 545-552, 1980.
- ERICKSON, G.F.; SHIMASAKI, S. The role of the oocyte in folliculogenesis. **Trends Endocrinol Metab**, v. 11, p. 193-198, 2000.
- ESPEY, L.L. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to a inflammatory reaction. **Biology of reproduction**, v. 50, p. 233-238, 1994.
- FEUERSTEIN, P. et al. Gene expression in human cumulus cells: one approach to oocyte competence. **Human Reproduction**, p. 1-9, 2007.
- FULKA, J. JR.; FIRST, N.L.; MOOR, R.M.; Nuclear and cytomplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. **Molecular Human Reproduction**, v. 4, p. 41-49, 1998.
- FULOP, C. SALUSTRI, A. HASCAL, V.C. Coding sequence of hialuronan synthase homologue expressed during expansion of the mouse cumulus oocyte complex. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 337, p. 261-266, 1997.
- FULOP, C.; SZANTO, S.; MUKHOPADHYAY, D. Impaired cumulus mucification and female sterility in tumor necrosis factor-induced protein-6 dificient mice. **Development**, v. 130, p. 2253-2261, 2003.

- GOUDET, G. et al. Intrafollicular content of luteinizing hormone receptor, α -inhibin and aromatase in relation to follicular growth, estrous cycle stage, and oocyte competence for in vitro maturation in the mare. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 1120-1127, 1999.
- HAFEZ, E.S.E. Reprodução animal. São Paulo, Manole, 2003, 530 p.
- HAWLEY, L.R.; ENDERS, A.C.; HINRICHS, K. Comparison of equine and bovine oocyte-cumulus morphology within the ovarian follicle. **Biol. Reprod. Mono.** v. 1, p.243-252, 1995.
- HINRICHS, K; KENNEY, R.M. A colpotomy procedure to increase oocyte recovery rates on aspiration of equine preovulatory follicles. **Theriogenology**, v.27, n.1, p. 237, 1987.
- HUNTER, M.G. et al Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 461-477, 2004.
- JESSEN, T. E ODUM, L. Role of tumor necrosis factor stimulated gene 6 (TSG-6) in the coupling of inter-alpha-typsin inhibitor to hyaluronan in human follicular fluid. **Reproduction**, v. 125, p. 27-31, 2003.
- JOHNSON, G. ET AL. Amphiregulin induces tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor and p185erbB2. evidence that amphiregulin acts exclusively through the epidermal growth factor receptor at the surface of human epithelial cells. **J Biol Chem** V. 268, P. 2924–2931, 1993.
- KANITZ, W. et al. Ultrasound-guided follicular aspiration in mares. **Biol. Reprod. Mono**, v. 1, p. 225-231, 1995.
- KERBAN, A.; BOERBOOM, D.; SIROIS, J. Human chorionic gonadotropin induces an inverse regulation of steroidogenic acute regulatory proteins messenger ribonucleic acid in theca interna and granulosa cells of equine preovulatory follicles. **Endocrinology**, v. 140, n.2, p. 667-674, 1999.
- KIMATA, K., ZHUO, L. Cumulus oophorus extracellular matrix: its construction and regulation. **Cell structure and function**, v. 26, p. 189-196, 2001.
- LINDBLOOM, S.M. et al. Potential involvement of EGF-like growth factors and phosphodiesterases in initiation of equine oocyte maturation. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 103, p. 187-192, 2008.
- MARI, G. et al. Fertility in the mare after repeated transvaginal ultrasound-guided aspirations. **Animal Reproduction Science**, v. 88, p. 299-308, 2005.
- MARTORIATI, A.; GÉRARD, N. Interleukin-I (IL-I) system gene expression in granulosa cells: kinetics during terminal preovulatory follicle maturation in the mare. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 43, 2003.
- MEHLMANN, L.M. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. **Reproduction**, v.130, p. 791-799, 2005.
- MUKHOPADHYAY, D.; HASCALL, V.C.; DAY, A.J. Two distinct populations of tumor necrosis factor-stimulated gene-6 protein in the extracellular matrix of expanded mouse cumulus cell-oocyte complexes. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 394, p. 173-181, 2001.

- NAGYOVA, E.; VANDERHYDEN, B.C.; PROCHA ZKA, R. Secretion of Paracrine Factors Enabling Expansion of Cumulus Cells Is Developmentally Regulated in Pig Oocytes. **Biology of Reproduction**, v.63, p. 1149–1156, 2000.
- PARK, J.Y. et al, M. EGF-Like Growth Factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. **Science**, v. 303, p. 682-684 , 2004.
- PINCTION, H.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. The molecular basis of oocyte growth and development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, p. 27-37, 1998.
- RICHARDS, J. S. et al. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation and luteinization. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 57, p. 195-220, 2002.
- RICHARDS, J.S. et al Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. **Annual reviews of Physiology**, v. 64, p. 69-92, 2002.
- RILEY, S.C. et al. Matrix metalloproteinase-2 and -9 secretion by the equine ovary during follicular growth and prior to ovulation. **Animal Reproduction Science** V.81, P.329-339, 2004.
- RUSSELL, D.L.; ROBKER, R.L. Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. **Human Reproduction Update**, v.13, n.3 p. 289–312, 2007.
- SALUSTRI, A.; CAMAIONI, A.; D’ALESSANDRIS, C. Endocrine and paracrine regulation of cumulus expansion. **Zygote**, v.4, p. 313-315, 1996.
- SENGER, P.L. Pathways to pregnancy and parturition, ISBN 0-9657648-2-6, 2005.
- SHIMADA, M. ET AL . Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. **Molecular Endocrinology**, V. 20, N. 6, P. 1352-1365, 2006.
- SIROIS, J.; KIMMICH, T.L.; FORTUNE, J.E. Developmental changes in steroidogenesis by equine preovulatory follicles: effects of equine LH, FSH, and CG. **Endocrinology**, V.127, P. 2423-2430, 1990.
- SIROIS, J.; KIMMICH, T.L.; FORTUNE, J.E. Steroidogenesis by equine preovulatory follicles: relative roles of theca interna and granulosa cells. **Endocrinology**, v. 128, p.1159-1166, 1991.
- SQUIRES, E.L.; COOK, N.L. Transvaginal aspiration. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.12, n. 1, p. 13-29, 1996.
- STOCK, A.E. et al. Induction of hialuran synthase 2 by human Chorionic Gonadotropin in mural granulosa cells of equine preovulatory follicles. **Endocrinology**, v. 143, n. 11, p. 4375-4384, 2002.
- TANGHE, S. et al. Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation and fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, p. 414-424, 2002.
- TORNER, H.; ALM, H. Meiotic configuration of horse oocytes in relation to the morphology of the cumulus-oocyte complex. **Biol. Reprod. Mono**, v.1, p. 253-259, 1995.
- TSAFRIFRI, A., et al. Epidermal Growth Factor Family Members: Endogenous Mediators of the Ovulatory Response. **Endocrinology**, v. 146, n. 1, p.77–84, 2005.

- VANDESOMPELE, J.; et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, **v.3, p.1-11, 2002.**
- VOGELSANG, M.M. et al Methods for collecting follicular oocytes from mares. *Theriogenology*, v. 29, n. 5, p. 1007-1018, 1988.
- ZHUO, L.; KIMATA, K. Cumulus oophorus extracellular matrix: its construction and regulation. *Cell structure and function*, v. 26, p. 189-196, 2001.
- RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience letters*, v.339, p.62-66, 2003.
- PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, v.29, p.2002-2007, 2001.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.