

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS**

**EXPRESSÃO GÊNICA DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ E DE
RECEPTORES DE LH NO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR DA ÉGUA**

Autor: Henrique Boll de Araujo Bastos

PORTO ALEGRE

2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS**

**EXPRESSÃO GÊNICA DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ E DE
RECEPTORES DE LH NO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR DA ÉGUA**

Autor: Henrique Boll de Araujo Bastos

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos
da Faculdade de Medicina Veterinária
da UFRGS como requisito parcial para obtenção de
grau de Mestre.

**Orientadora: Adriana Pires Neves
Co-orientadora: Sandra Fiala Rechsteiner**

**PORTO ALEGRE
2013**

CIP - Catalogação na Publicação

Bastos, Henrique Boll de Araujo
EXPRESSÃO GÊNICA DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ
E DE RECEPTORES DE LH NO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR
DA ÉGUA / Henrique Boll de Araujo Bastos. -- 2013.
47 f.

Orientadora: Adriana Pires Neves.
Coorientadora: Sandra Fiala Rechsteiner.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos,
Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Ovário. 2. Folículo . 3. Hormônio Luteinizante.
4. Metaloproteínas de Matriz. I. Neves, Adriana
Pires, orient. II. Rechsteiner, Sandra Fiala,
coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

HENRIQUE BOLL DE ARAUJO BASTOS

**EXPRESSÃO GÊNICA DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ E DE
RECEPTORES DE LH NO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR DA ÉGUA**

APROVADO POR:

Profa. Dra. Adriana Pires Neves
Orientadora e Presidente da Comissão

Profa. Dra. Mara Iolanda Batistella Rubin

Prof. Dr. Eduardo Malschitzky

Prof. Dr. Ivan Cunha Bustamante Filho

AGRADECIMENTOS

À Profa. Irene e ao Sr. Gabriel, meu pai e minha mãe, por tudo.

À Profa. Ísis, minha irmã, pelo companheirismo e conselhos.

À Médica Veterinária Vanessa Jegan, minha namorada, que me ajudou em cada passo da realização deste trabalho.

À Profa. Adriana Pires Neves, por me orientar e me incentivar, mesmo em projetos audaciosos.

À Profa. Sandra Fiala Rechsteiner, pelos ensinamentos nos trabalhos.

À Profa. Mara Iolanda Batistella Rubin, pela ajuda e apoio durante o mestrado.

Ao Dr. Néelson Alexandre Kretzmann, pela contribuição significativa para o enriquecimento de minha pesquisa na área da Biologia Molecular.

À Profa. Anamaria Telles Esmeraldino, pelo incentivo no avanço de minha pesquisa, na área da histologia.

Ao Prof. Rodrigo Costa Mattos, pelas contribuições nesta pesquisa.

Ao Prof. Sergio Ivan dos Santos e Prof. Eduardo Brum Schwengber, pelo auxílio na análise estatística.

À equipe do Frigorífico Floresta de São Gabriel - RS, pela receptividade e oportunidade de coletar o material.

A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, por oportunizar meu crescimento profissional.

Aos amigos e colegas do REPROLAB, agradeço pelo aprendizado conjunto e pela convivência fraterna.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema da divergência e dominância folicular segundo Ginther et al. (2004).....	14
Figura 2	Sinopse das interações do LH, tipos celulares ovarianos, ativador de plasminogênio, collagenases e fator de necrose tumoral na degeneração da parede apical folicular durante o processo ovulatório em ovelhas (MURDOCH; MCDONNEL, 2002).....	25
Figura 3	Imunohistoquímica para o RLH no citoplasma das células da superfície ovariana, na região da fossa de ovulação.....	32
Figura 4.A	Esquema demonstrando a expressão genica do RLH.....	34
Figura 4.B	Esquema demonstrando a expressão genica da MMP-1.....	34
Figura 4.C	Esquema demonstrando a expressão genica da MMP-2.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Detalhes das sequências utilizadas para real-time PCR.....	31
----------	--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 Anatomofisiologia ovariana	12
2.2 Dinâmica e dominância folicular	13
2.3 Interação hormonal no ciclo estral	15
2.4 Hormônio luteinizante	16
2.4.1 Receptores para LH.....	17
2.5 Fisiologia da ovulação	18
2.6 Metaloproteinases de matriz	19
2.7 Metaloproteinases de matriz no processo ovulatório	20
2.7.1 Metaloproteinases de matriz – 1.....	21
2.7.2 Metaloproteinases de matriz – 2.....	22
2.8 Epitélio superficial ovariano	24
3 ARTIGO	27
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
ANEXO A - Local de coleta das amostras para a realização da técnica de real - time PCR e imunohistoquímica.....	47

EXPRESSÃO GÊNICA DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ E DE RECEPTORES DE LH NO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR DA ÉGUA

RESUMO

O período compreendido da emergência, desenvolvimento folicular até a formação de um folículo dominante, requer um grande remodelamento tecidual. A ação de enzimas que promovem a lise do colágeno como as metaloproteinases de matriz (MMPs) são fundamentais para o desenrolar deste processo. É sugerido que a produção destas enzimas seja desencadeada pelo aumento na concentração de LH circulante, que atua sobre o epitélio superficial ovariano (ESO). O objetivo deste estudo foi aprofundar o conhecimento da expressão do RNAm das MMP-1 e MMP-2, durante o desenvolvimento folicular em éguas. A técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (real-time PCR) foi utilizada, para relacionar à expressão do RNAm do receptor de hormônio luteinizante (RLH) e a imunolocalização deste RLH nas células que compõe o ESO da região da fossa de ovulação. Foram selecionadas diferentes porções de ovários de éguas cíclicas. As éguas foram distribuídas em dois grupos. Grupo 1: animais onde os folículos foram < 28mm de diâmetro (crescimento); Grupo 2: animais com folículos foram ≥28mm de diâmetro (dominância folicular). Os resultados mostraram que o RNAm para as MMP-1, MMP-2 e RLH, está presente no ovário equino durante todo o período de desenvolvimento folicular e nas diferentes porções do ovário analisadas. No Grupo 2, a MMP-1 e o RLH apresentaram uma concentração significativamente maior ($p < 0,05$), de RNAm no ovário com folículo dominante do que no ovário contra-lateral. No Grupo 2, quando analisadas somente as diferentes porções do ovário com folículo dominante, evidenciou-se que a MMP-1, MMP-2 e RLH tiveram uma concentração maior ($p < 0,05$), na região do estroma ovariano do que na região da fossa de ovulação. As éguas do Grupo 2, apresentaram uma concentração significativamente menor ($p < 0,05$) do que as éguas do grupo 1 na quantidade de RNAm para RLH. Através da imunohistoquímica observou-se que as células da ESO na região da fossa de ovulação expressaram o RLH com diferença nas intensidades médias. As éguas com folículos dominantes tiveram maior intensidade média quando comparadas as éguas sem folículos dominantes ($p < 0,05$). Os resultados sugerem que a MMP-1 e MMP-2 têm uma atividade importante em todo o processo

de remodelamento tecidual, que ocorre durante o desenvolvimento folicular e que RLH presente no ovário e no ESO podem ter um papel fundamental para o mecanismo de sinalização para a produção das MMPs, visto que os ovários que apresentaram maiores concentrações de RLH tiveram maior expressão genica das MMPs.

Palavras – chave: Égua. Ovário. Folículo. Remodelação tecidual.

GENE EXPRESSION OF MATRIX METALLOPROTEINASES AND LH RECEPTORS IN THE FOLLICULAR DEVELOPMENT IN THE MARE

ABSTRACT

The period extending from the follicular emergence and development to the formation of a dominant follicle requires a remarkable tissue reshaping. The action of enzymes that promote collagen lysis, such as matrix metalloproteinases (MMP), is fundamental to this process. It has been suggested that the production of those enzymes is triggered by an increased concentration of circulating LH, which acts on the ovarian surface epithelium (OSE). The aim of this study was to deepen knowledge about the action of mRNA of MMP-1 and MMP-2 along the follicular development in mares by using the technique of real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) to relate the luteinizing hormone receptor (LHR) mRNA expression and the immunolocalization of LHR in the cells that compose OSE in the region of the ovulation fossa. Were selected different portions of ovaries of 12 cyclic mares. The mares were distributed into two groups. Group 1 was composed of animals whose follicles were up to 28 millimeter wide (growth); Group 2 consisted of animals whose follicles were wider than 28 millimeters (follicular dominance). The results showed that mRNA for MMP-1, MMP-2 and LHR was present in the equine ovary during the whole period of follicular development and in the different portions of ovaries analyzed. Within Group 2, MMP-1 and LHR evidenced a significantly higher concentration of mRNA ($p < 0.05$) in the ovary with dominant follicle than in the contralateral ovary. In Group 2, in which only the different portions of the ovary with dominant follicle were analyzed, MMP-1, MMP-2 and LHR showed a higher concentration ($p < 0.05$) in the region of ovarian stroma than in the ovulation fossa. Mares from Group 2 presented a significantly lower concentration ($p < 0.05$) than mare from Group 1 in terms of mRNA for LHR. Through immunohistochemistry, it was observed that OSE cells in the region of the ovulation fossa expressed LHR with different mean intensity. Mares with dominant follicles (Group 2) evidenced higher mean intensity in comparison to mares without dominant follicles (Group 1). The results have suggested that MMP-1 and MMP-2 participate in the whole tissue reshaping process, and LHR present in OSE may play a central role in the signaling

mechanism for MMP production, as the ovaries presenting higher LHR concentrations had higher MMP gene expression.

Keywords: Mare. Ovary. Follicle. Tissue reshaping.

1 INTRODUÇÃO

A ovulação é o somatório de processos em curso sequencial, bem como, simultaneamente, dentro de diversos microambientes ovarianos (RICHARDS et al. 2002). No ovário, a remodelação tecidual é requisito para crescimento, expansão do folículo e rompimento da parede folicular durante o processo ovulatório (SONG; PORTER; COOMBER, 1999).

Ao longo dos anos, alguns pesquisadores já abordaram o tema da influência das metaloproteinases de matriz (MMPs) no ovário equino, mas, sendo este um tema bastante amplo, várias lacunas ainda necessitam ser preenchidas para uma melhor compreensão dos eventos relacionados com a remodelação tecidual que envolve o desenvolvimento folicular e a ovulação. Mais de 200 MMPs já foram descritas na literatura (CURRY; OSTEEEN, 2003), o que faz deste, um grande desafio, quanto a descoberta dos mecanismos e sítios de ação destas enzimas. Após o surgimento das gonadotrofinas pré-ovulatórias, há o aumento da atividade da colagenase ovariana e a degradação do colágeno é maior na região apical da parede folicular pré-ovulatória (MCINTUSH; SMITH, 1998). Em ovinos, através de cultura celular, foi evidenciado que a secreção da uroquinase - tipo ativador plasminogênico (uPA) pelo epitélio superficial ovariano (ESO), isolado durante a fase folicular, foi estimulada pelo Hormônio Luteinizante (LH) (MURDOCH; VAN KIRK; MURDOCH, 1999). Sugere-se que o uPA seja necessário para o desenrolar da cascata que culmina com a produção das MMPs, indicando que o ESO é fundamental para toda remodelação tecidual envolvida no desenvolvimento folicular equino.

Este trabalho tem por objetivo demonstrar a expressão gênica dos receptores do hormônio luteinizante (RLH), da metaloproteinase de matriz – 2 (MMP-2) e da metaloproteinase de matriz – 1 (MMP-1) e suas relações com diferentes fases do desenvolvimento folicular, relacionando com a presença e localização dos RLH no epitélio superficial ovariano (ESO) na região da fossa de ovulação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Anatomofisiologia ovariana

Para fins descritivos, ao ovário equino podem ser atribuídos duas superfícies (lateral e medial), dois bordos (dorsal ou anexado e ventral ou livre) e dois polos ou extremidades (cranial ou tubal e caudal ou uterina). O bordo convexo dorsal é frequentemente chamado de grande curvatura. Os polos são arredondados e o polo cranial ou tubal é ligado com a porção de fímbrias do oviduto. O polo caudal ou uterino é ligado com o ponto exatamente caudal ao fim do corno uterino pelo ligamento próprio do ovário (GINTHER, 1992).

No neonato e durante o período puerperal, os ovários apresentam aparência oval e a zona cortical com o epitélio germinativo na superfície. Conforme o neonato atinge a puberdade, ou com 5 a 7 meses de idade, existe uma transformação anatômica na qual o córtex ovariano é invaginado para dentro da medular. Assim, o ovário assemelha-se à forma de um rim ou um feijão em éguas adultas e seu tamanho varia de aproximadamente 4 a 8 cm de comprimento, 3 a 6 cm de largura e 3 a 5 cm de altura (BERGFELT, 2009).

O ovário equino tem características anatômicas únicas: o córtex está no centro e a porção medular é superficial. No processo de crescimento os folículos selecionados crescem de 50 micrômetros de diâmetro no estágio de folículo primordial para 5 a 7 cm de diâmetro na maturidade. Nesse mesmo tempo o folículo migra para a fossa, o único local onde o oócito pode ser liberado do ovário (SONG; PORTER; COOMBER, 1999).

Esta estrutura histológica única, a fossa de ovulação, diferencia os ovários das éguas das demais espécies domésticas (GETTY, 1975). Os folículos e os corpos lúteos estão distribuídos no interior da parte central do órgão e em direção à fossa ovulação. Eles estão circundados por tecido conjuntivo denso, ricamente vascularizado, o qual corresponde à medula do ovário de outras espécies (DYCE et al. 1996).

O corpo lúteo não se projeta para a grande superfície do ovário como em outras espécies. A projeção (papila ovulatória) pode ser vista, entretanto, na fossa de ovulação, especialmente em corpos lúteos recém formados. Na potranca recém nascida, o ovário é em formato oval e o epitélio germinal cobre a porção superficial.

No ovário de um animal adulto o epitélio germinal torna-se confinado à fossa de ovulação (GINTHER, 1992).

2.2 Dinâmica e dominância folicular

O comprimento médio do intervalo inter-ovulatório é de 21 a 22 dias em éguas e 24 dias em pôneis (GINTHER, 1992). O comportamento no ciclo estral da égua é dividido em estro e diestro, os quais correspondem fisiologicamente às fases folicular e luteal, respectivamente. O comportamento do estro é atribuído ao efeito do aumento das concentrações circulantes do estrógeno, associado com a seleção do folículo dominante na onda folicular primária (BERGFELT, 2009).

A onda folicular refere-se a vários folículos que emergem e crescem inicialmente em sincronia (GINTHER et al. 2004). Gastal et al. (1997) indicam a emergência folicular quando o diâmetro alcançado pelos folículos for de 6 mm.

Após a emergência da onda folicular ovulatória, os folículos crescem durante a fase de crescimento comum até o início da divergência. Na divergência, o folículo dominante continua o crescimento e os folículos subordinados iniciam a regressão. O processo de divergência inicia-se quando o futuro folículo dominante tem cerca de 22,5 mm de diâmetro (GINTHER, 2007). A divergência é reconhecida pelo contínuo crescimento e desenvolvimento do folículo dominante e a diminuição ou parada no crescimento dos folículos subordinados (GINTHER et al. 2002), como exemplificado na Figura 1.

A média de diferença entre o diâmetro dos dois maiores folículos no início da divergência é de cerca de 3 mm, o que é equivalente a um período de crescimento de cerca de um dia. Estas relações são consistentes com a suposição de que o maior folículo se estabelece como folículo dominante no prazo de um dia, ou antes do próximo grande folículo atingir um diâmetro similar (GINTHER et al. 2002).

Durante uma onda específica, um dos folículos é habilitado para se tornar o folículo ovulatório. Este fenômeno é conhecido como seleção folicular. A seleção folicular tem despertado o interesse de biólogos desde pelo menos 1960 e pode ser considerado um dos mistérios mais duradouros na biologia reprodutiva de espécies mono-ovulares (GINTHER, 2007).

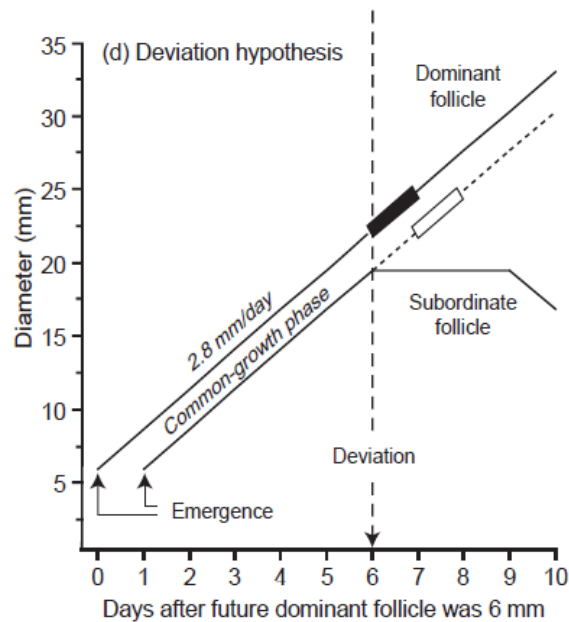


Figura 1 – O folículo maior (futuro dominante) tem uma vantagem de tamanho e é o primeiro a chegar a uma fase crítica (barra preta), associado a um mecanismo que inibi o menor folículo (futuro subordinado) antes que possa chegar a um estágio similar (barra branca) (GINTHER et al. 2004).

Os fatores locais que causam o aparente aumento diferencial na capacidade de resposta do futuro folículo dominante para as gonadotrofinas pode ser fundamental para o mecanismo de seleção folicular (GINTHER et al. 2002).

Vários números e tipos de ondas foliculares desenvolvem-se durante o intervalo inter-ovulatório. Na onda principal o maior folículo da onda atinge diâmetro de folículo dominante (>28 mm). Na onda secundária, o maior folículo não se torna dominante. Em média, o diâmetro máximo do maior folículo da onda secundária foi reportado variando de 22 a 23 mm (GINTHER et al. 2004).

Em mini-pôneis a população folicular por animal é consideravelmente reduzida quando comparado com éguas, ocorre uma média de 6 folículos durante o intervalo interovulatório enquanto em éguas ocorre de 10 a 14 folículos. Ocorre também um pequeno número de folículos em crescimento ≥ 10 mm por onda ovulatória, uma frequência muito maior de ondas ovulatórias com apenas um folículo crescente ≥ 10 mm e um menor índice de divergência de tamanho detectável (GASTAL et al. 2008).

A égua é aparentemente a única na qual algumas vezes a onda folicular principal, com ovulação de um folículo dominante ocorre durante um estado progestacional. Assim, a principal onda folicular pode ocorrer durante o início do

diestro e o folículo dominante pode ser ovulatório ou anovulatório. Neste ponto, a onda principal formada durante o início do diestro e que dá origem ao folículo dominante anovulatório ou ovulatório (diestro ou ovulação secundária) é definida como a onda secundária; a onda principal iniciando durante o meio do diestro e dando origem a ovulação associada ao estro (ovulação primária) é definida como onda primária (GINTHER, 1992).

2.3 Interação hormonal no ciclo estral

Fotorreceptores no olho da égua reconhecem o aumento da duração do dia, que é neurologicamente transmitida para a glândula pineal, onde mudanças aparentes na secreção de melatonina geram mudanças no hipotálamo resultando no aumento da síntese e secreção de GnRH. O GnRH atinge a porção anterior da glândula pituitária via circulação portal sistêmica estimulando primariamente a síntese de LH mas também FSH (BERGFELT, 2009).

O FSH surge associado com a emergência da onda folicular e alcança a concentração máxima cerca de três dias antes da divergência, quando o maior folículo mede cerca de 13 mm. A diminuição do FSH é uma função dos múltiplos folículos antes do início da divergência e do desenvolvimento do folículo dominante após a divergência. A fração proteica do fluido folicular (fonte de inibina) suprime as concentrações circulantes de FSH em éguas (GINTHER et al. 2005).

Um pico de LH peri-ovulatório desenvolve-se progressivamente ao longo de cerca de uma semana, iniciando perto da divergência e estendendo-se em média de um dia após a ovulação. O pico de LH diminui gradualmente ao longo de vários dias (GINTHER et al. 2005; GINTHER, 1992).

Concentrações foliculares e sistêmicas de estradiol continuam a aumentar em paralelo com o aumento no tamanho do folículo dominante e alcançam a concentração máxima 1 a 2 dias antes da ovulação, próximo do momento que o folículo atinge o tamanho máximo. As altas concentrações de estradiol geram *feedback* positivo em nível hipotalâmico-pituitário resultando em marcado aumento no LH (BERGFELT, 2009). O exato mecanismo através do qual o LH leva à ruptura folicular falta ser elucidado (CURRY et al. 1989).

O aumento gradual na concentração circulante de progesterona, associada com o desenvolvimento do corpo lúteo após a ovulação durante a fase luteal é

responsável pela supressão do comportamento do estro e aparecimento do comportamento de diestro. O diestro tem duração de 14 a 16 dias e neste período, a égua tipicamente tem uma resposta negativa para a presença ou aproximação do garanhão (BERGFELT, 2009).

2.4 Hormônio luteinizante

As gonadotrofinas pituitárias (LH e FSH) são glicoproteínas constituídas de 24% de carboidratos e o restante é proteína. As concentrações circulantes de LH durante o ciclo estral envolve uma liberação pulsátil. A frequência dos pulsos varia aproximadamente de, um pulso a cada 2 horas no início do surgimento do LH, para quase um pulso a cada meia hora no momento da ovulação. A meia vida longa do LH pode resultar em uma associação de magnitude suficiente para amortecer o impacto individual da ocorrência dos pulsos rápidos. A ocorrência de pulsos de LH durante o diestro pode ser responsável pela ovulação de diestro. O LH atinge sua concentração máxima frequentemente 1 a 2 dias após a ovulação. (GINTHER, 1992)

Ginther (1992) resume o perfil do LH em éguas: a) permanece baixo durante o meio do diestro; b) começa a aumentar poucos dias antes do começo do estro; c) aumenta progressivamente para depois ter valores máximos pouco depois da ovulação; d) diminui progressivamente ao longo dos próximos 4 a 6 dias diminuindo os valores no diestro.

Em equinos Watson et al. (2004) demonstraram que as concentrações plasmáticas de LH foram significativamente menores ($P < 0.001$) no dia da remoção dos ovários durante a transição comparado com o dia da remoção dos ovários durante o estro.

Em mini-pôneis, o surgimento do LH ovulatório consiste de um lento aumento entre os dias 13 e 18, um platô entre os dias 18 e 21, seguido por rápido aumento que atinge o pico no dia após a ovulação. A interseção entre o final da platô e o início do rápido aumento do LH ocorre no dia do pico pré-ovulatório do surgimento do estradiol. Quando a concentração de LH foi centralizada para o dia da emergência folicular $\geq 10\text{mm}$, a concentração aumentou lentamente e progressivamente entre o dia da emergência e de uma maior concentração 3 dias após a emergência quando o folículo foi de 21mm (GINTHER et al. 2008).

2.4.1 Receptores para o LH

Os receptores para o LH já foram detectados em vários tecidos não gonadais, como em tecidos associados ao sistema reprodutivo de suínos e bovinos e em outras espécies, incluindo o útero (endométrio e miométrio), oviduto, cérvix, vasos sanguíneos, glândula mamária e outros tecidos (ZEICIK et al. 2005).

A organização da proteína do RLH é semelhante em todas as espécies até agora estudadas. O receptor é constituído de três domínios distintos: um domínio extracelular (terminal-N grande), que é responsável pela interação hormônio-receptor (codificado pelos exons de 1-10), um domínio transmembrânico (serpenline) região que contém sete segmentos transmembrânicos ligados por três laços extracelulares e uma região intracelular que contém três laços da cauda terminal-C (ZEICIK et al. 2005).

A interação hormônio-receptor constitui o passo inicial em uma série de eventos biológicos que envolve o mecanismo de ação dos hormônios peptídicos. Os efeitos hormonais são potencialmente regulados pela concentração do hormônio prevalente, concentração de receptores no tecido alvo e afinidade do receptor com o hormônio (ROSER; EVANS, 1983).

Quando a concentração sérica de LH declina a níveis basais, ocorre um aumento no número de receptores e na afinidade destes receptores durante o desenvolvimento do corpo lúteo na égua. Além disto, a regressão do corpo lúteo está envolvida com o declínio da concentração plasmática de progesterona luteal, concomitantemente com a perda dos receptores de LH e afinidade do receptor. Estes dados correlacionam com as observações do desenvolvimento e degeneração da morfologia celular luteal (ROSER; EVANS, 1983).

Através da técnica de real-time PCR, Derecka et al. (1995), demonstraram em suínos, que o gene do receptor de LH é expresso em tecidos reprodutivos não gonadais e sua expressão é dependente da fase do ciclo estral e provavelmente, também é específica do tecido.

O RNAm para receptor de LH estava presente na células da teca e da granulosa, mas, níveis mais baixos foram detectados nas células da granulosa do que nas células da teca. A expressão do RNAm para receptor de LH foi menor na células da teca e da granulosa em égua na transição do que nos animais com folículos pré-ovulatórios (WATSON et al. 2004).

2.5 Fisiologia da ovulação

A ovulação é definida como uma rápida diminuição no tamanho folicular, ocorrendo em média em 42 segundos (variando entre 5 a 90 segundos). Um folículo com exibição de uma borda ecogênica brilhante, formato irregular e uma fenda na parede folicular é preditivo de ovulação eminente (CARNEVALE et al. 1988). O folículo muda o formato consideravelmente (torna-se mais achatado ou irregular) durante as três horas antes da ovulação. Folículos adjacentes ao folículo pré-ovulatório mudam o formato no sentido oposto (não-esférico para esférico) quando a ovulação se aproxima (GINTHER, 1992).

Uma fenda ou ponta aparece na ultrassonografia ligeiramente antes da ovulação e é provavelmente devido a quebra do estroma ovariano e protrusão do folículo para a fossa de ovulação (CARNEVALE et al. 1988).

As seguintes mudanças significativas são encontradas no folículo pré-ovulatório: aumento no diâmetro (média de 3mm/dia), mudança de forma de esférica para não esférica (forma de pera ou cônica) e aumento na espessura da parede. Uma pronunciada mudança no formato aparece em 85% dos folículos pelo menos uma vez durante o período pré-ovulatório. A combinação de diâmetro, mudanças no formato e espessura da parede parece ser importante para avaliar o estado do folículo pré-ovulatório (GINTHER, 1992).

Os aspectos biomecânicos e biofísicos da ovulação em éguas são áreas de pesquisa negligenciadas (GINTHER, 1992). A ovulação é o somatório de processos em curso sequencial, bem como, simultaneamente, dentro de diversos microambientes ovarianos (RICHARDS et al. 2002).

A característica mais distinta da ovulação em éguas, comparada com outras espécies, é a ocorrência da ovulação em uma área especializada, a fossa de ovulação (GINTHER, 1992)

A estrutura original do ovário equino com o eventual grande tamanho do folículo pré-ovulatório, algumas vezes maior que 50 mm de diâmetro, a migração para a fossa de ovulação e a subsequente ovulação requerem profundo remodelamento tecidual (RILEY et al. 2001).

Os processos de desenvolvimento e particularmente migração têm sido largamente abertos a teorias especulativas sugerindo que o grande tamanho do folículo ovulatório resulta em pressão que o força ao longo da linha de menor

resistência até a fossa, ou por mudanças na matriz extracelular que produzem uma linha de menor resistência onde a migração pode ocorrer (RILEY et al. 2001).

Em trabalhos com ovários de mulheres foi descrito que a onda de LH induz a ovulação através de uma reação inflamatória aguda, na parede apical do folículo pré-ovulatório e epitélio superficial ovariano, mediado pelas citocinas produzidas localmente e prostaglandinas (YOUNG et al. 2002).

Acredita-se que as prostaglandinas produzidas pela parede folicular são essenciais para a ovulação, tendo um papel obrigatório na ruptura folicular. Entretanto, o exato mecanismo pelo qual as prostaglandinas foliculares participam da ovulação não é conhecido (STOUT, 2011).

2.6 Metaloproteinases de matriz

A matriz extracelular tem sido reconhecida como um componente regulatório chave na fisiologia celular, proporcionando um ambiente para migração celular, divisão, diferenciação, fixação e, em alguns casos, um destino final entre sobrevivência e morte celular (BIRKEDAL-HANSEN et al. 1993). Possui assim, inúmeros impactos sistêmicos em diversos processos fisiológicos como desenvolvimento embrionário, morfogêneses dos órgãos, angiogênese, remodelamento de cartilagens, crescimento ósseo, cicatrização de feridas, integridade periodontal, reparação corneal (CURRY; OSTEEEN, 2003) e crescimento folicular ovariano e ovulação (SONG; PORTER; COOMBER, 1999).

A primeira descrição de uma enzima capaz de degradar a matriz extracelular foi observado em 1962 por Gross e Lapière com sapos que estavam passando por metamorfose. Atualmente existem cerca de 40 famílias e mais de 200 MMP descritas na literatura (CURRY; OSTEEEN, 2003).

Em suas funções, as collagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13) são capazes de clivar colágeno fibrilar, como o colágeno do tipo I, II, III, V e XI, e também o colágeno não fibrilar do tipo IX, XII e XIV. A clivagem da molécula tripla helicoidal por este membro da família das MMP muda a estabilidade e as propriedades solúveis do colágeno que resulta na desnaturação da molécula de colágeno em gelatina. A gelatina é susceptível ao amplo alcance das proteinases de tecido, incluindo as gelatinases e a stromelisina. As gelatinases (MMP-2 e MMP-9) contem uma sequencia semelhante a fibronectina dentro de seu domínio catalítico, a qual resulta

em uma potente capacidade destas MMPs de se ligarem e clivarem a gelatina (CURRY; OSTEEN, 2003).

Uma das primeiras propostas de que a proteólise poderia ter um papel na função ovariana veio de Schochet, que sugeriu em 1916 que enzimas proteolíticas eram ativas na digestão da matriz de tecido conectivo no ápice de folículos de Graaf, o que permitia a ruptura folicular. Experimentos subsequentes validaram a hipótese inicial de Schochet, como a proteólise sendo um componente do mecanismo ovulatório (CURRY; OSTEEN, 2003).

O advento e desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, permitiram que as mudanças no padrão de expressão de RNAm sejam investigadas, superando algumas das limitações dos ensaios enzimáticos. As mudanças nos níveis de RNAm, na maioria das vezes, no entanto, correspondem com as mudanças relatadas na atividade de colagenases e gelatinases. A regulação do sistema das MMP é extremamente complexo, sinais que coordenados podem regular uma MMP, pode regular diferencialmente outras MMP. Da mesma forma, os sinais que regulam uma determinada MMP em um lugar, podem não ter efeito ou mesmo um efeito oposto dependendo da presença ou ausência de outros sinais. Independentemente, é aparente que os membros das MMP aumentam durante o período periovulatório através de uma cascata de eventos iniciada pelo LH (CURRY; OSTEEN, 2003).

2.7 Metaloproteinases de matriz no processo ovulatório

A ovulação é um processo dinâmico, orquestrado pelo aumento do LH, que inicia e sincroniza uma série de eventos bioquímicos, culminando com a quebra da parede folicular e liberação do oócito (CURRY; OSTEEN, 2003).

As metaloproteinases de matriz são um grupo de enzimas secretadas que podem degradar a maioria dos componentes da matriz extracelular durante o remodelamento tecidual (RILEY et al. 2004).

No ovário, a remodelação tecidual é requisito para crescimento, expansão do folículo, quebra da parede folicular durante o processo ovulatório (SONG; PORTER; COOMBER, 1999), transformação do folículo que ovulou em corpo lúteo, bem como a dissolução do corpo lúteo durante a regressão luteal. (CURRY; OSTEEN, 2003).

O controle do profundo remodelamento tecidual do folículo durante a ovulação em éguas permanece pobremente estudado (RILEY et al. 2004).

As gonadotrofinas pré-ovulatórias iniciam uma cascata de atividade proteolítica dentro da parede folicular do folículo pré-ovulatório, que se assemelha à resposta inflamatória. A região do ápice da parede do folículo pré-ovulatório consiste em células da granulosa, membrana basal, teca interna, teca externa, túnica albugínea e epitélio superficial (MCINTUSH; SMITH, 1998).

Após o surgimento das gonadotrofinas pré-ovulatórias, aumenta a atividade da colagenase ovariana e a degradação do colágeno é maior na região apical da parede folicular pré-ovulatória (MCINTUSH; SMITH, 1998).

A força tênsil da parede folicular é determinada pelo colágeno presente. Após o surgimento das gonadotrofinas pré-ovulatórias, a atividade da colagenase ovariana aumenta e a degradação é aumentada na região apical do folículo (MCINTUSH; SMITH, 1998).

O sistema das MMPs atua no controle do processo de remodelação tecidual (CURRY; OSTEEEN, 2003). Entretanto, o controle da secreção de MMP antes da ovulação não é conhecido (RILEY et al. 2004).

2.7.1 Metaloproteinase de matriz -1

A MMP-1 também é chamada de colagenase-1, colagenase intersticial, colagenase fibroblástica, e sobre o tipo de colágeno que a MMP-1 atua: I, II, III, VII, VIII, X, XI (CURRY; OSTEEEN, 2003).

Através da técnica de imunohistoquímica pode-se identificar a forma latente da MMP-1, em coelhos. Em folículos pré-ovulatórios foi encontrado a pro MMP-1, no citoplasma celular da teca interna e externa, glândulas intersticiais e epitélio germinal. No lúmen capilar do tecido intersticial de ambas as paredes foliculares apicais e basais não houve imunomarcagem para a pro MMP-1. Na parede dos folículos ovulados dos ovários que foram removidos 10 horas após a administração do hCG, as células da granulosa e as células da teca interna em torno do orifício mostraram uma forte imunocoloração para a pro MMP-1 (TADAKUMA et al.1993).

Em ovários de primatas através da técnica de real-time PCR revelou que os níveis de RNAm da colagenase intersticial (MMP-1) foram maiores no início da fase luteal, quando comparados com todos os outros estágios do ciclo. Os níveis de

RNA_m da MMP-1 diminuíram do início do diestro para a metade da fase luteal e permaneceram baixos após a metade até a fase final do diestro. Através da técnica de imunohistoquímica, foi relatado que uma intensa coloração para a proteína da MMP-1 foi detectada no citoplasma das células da granulosa luteal e nas células da teca luteal no desenvolvimento do corpo lúteo. Em contraste, as células endoteliais e entorno do estroma ficaram isentas de coloração. A coloração para MMP-1 nas células luteais foi grandemente reduzida. A coloração foi de baixa para insignificante da observada na metade, metade tardia e no tecido luteal tardio (YOUNG; HENNEBOLD; STOUFFER, 2002).

O aumento da expressão da MMP-1 sugere que esta colagenase está envolvida em uma extensiva e rápida reorganização tecidual e angiogênese ocorrendo no início da fase lútea (YOUNG; HENNEBOLD; STOUFFER, 2002).

2.7.2 Metaloproteinase de matriz - 2

A MMP-2 é também referida como, gelatinase 72KDa, gelatinase A, colagenase tipo-IV 72KDa, e sobre o tipo de colágeno que a MMP-2 atua: I, III, IV, V, VII, X, XI (CURRY; OSTEEEN, 2003).

No fluido folicular de éguas foi demonstrado que a atividade da gelatinase predominante que estava presente foi a de 72KDa, correspondendo a forma latente de MMP-2, a qual foi secretada em quantidades similares em todos os tamanhos foliculares (<10 a 45mm de diâmetro), o que foi demonstrado por zimografia. Este achado foi consistente, independentemente da fase de desenvolvimento do folículo. A detecção da forma ativa da MMP-2 de 66KDa foi menos consistente e foi detectada em apenas 4 de 20 amostras de fluido folicular sem correlação com o estágio de desenvolvimento folicular (RILEY et al. 2001).

No líquido folicular e em células da granulosa de equinos *in vivo*, através da técnica de real-time PCR foi demonstrado que a expressão da MMP-2 foi maior ($P < 0.05$) em folículos pré-ovulatórios (alta concentração de estradiol e progesterona) do que nos folículos grandes saudáveis (alta concentração de estradiol e baixa de progesterona). *In vitro* a expressão da MMP-2 nas células da granulosa não mudou com o tamanho folicular ou estado folicular. A atividade da MMP-2 foi maior ($P < 0.05$) no fluido folicular de folículos médios (15 a 29 mm) do que no fluido folicular de

folículos grandes (≥ 30 mm) quando analisados independentemente de seus estados (SESSIONS; VICK; FITZGERALD, 2009).

Através da técnica de imunohistoquímica, Riley et al. (2001) demonstraram que a MMP-2 estava presente no estroma ovariano consistentemente em todas as amostras. No tecido folicular de folículos obtidos a partir de 5mm de diâmetro, as camadas da teca e da granulosa foram consistentemente negativas.

Em hamsters siberianos, as MMP-2, 9 e 14 estão aumentadas em folículos grandes, e geralmente diminuídas no fim do diestro quando comparado com as outras fases do ciclo estral (VROOMAN; YOUNG, 2010).

Através da técnica de zimografia, Riley et al. (2004) observaram que ambas MMP-2 e MMP-9 são secretadas dentro do fluido folicular de éguas, do começo ao fim do desenvolvimento do folículo e durante o período imediatamente antes da ovulação. Não existem mudanças na atividade da MMP-2 no fluido folicular, entretanto a MMP-9 diminuiu a atividade imediatamente antes de ovulação. Através da análise densitométrica da gelatina de zimografia das amostras de tecido obtidas a partir da fossa de ovulação, do tecido adjacente e de uma área remota em relação ao folículo, pode-se concluir que as amostras secretaram, predominantemente, a forma latente da MMP-2, em meio de cultura. A quantidade de MMP-2 secretada pelas amostras foi muito consistente dentro dos grupos de regiões teciduais. Não ocorreu mudança significativa na quantidade de MMP-2 secretada pelos tecidos a partir de qualquer uma das três regiões. Menores níveis da forma ativa da MMP-2 (66KDa) foram detectados em algumas amostras, mas não estava consistentemente associado com algum grupo específico. Isto foi encontrado em níveis baixos e não pode ser quantificado por densitometria.

Através da técnica de real-time PCR, Young; Hennebold; Stouffer, (2002) demonstraram em ovários de macacos rhesus (*Macaca mulata*), que nos níveis de RNAm, não houve mudança significativa na gelatinase A (MMP-2) durante a fase luteal. Entretanto, a expressão tendeu a ser duas vezes mais alta no final da fase luteal quando comparado com os estágios mais precoces desta fase. Na imunohistoquímica, ocorreu variação de baixa a desprezível a imunomarcção da gelatinase A (MMP-2), sendo notada em tecidos do início da fase luteal até a metade tardia. Em contraste, as células associadas com a microvasculatura ovariana (presumivelmente células endoteliais) foram imunomarcadas para MMP-2 no tecido

somente no fim da fase luteal. As células do estroma, da teca e da granulosa luteal não foram positivamente marcadas pelo anti-corpo MMP-2 em nenhuma fase luteal.

2.8 Epitélio superficial ovariano

Evidências indicam que o epitélio superficial ovariano (ESO) é um componente obrigatório do processo ovulatório. As células do ESO em contato íntimo com a parede apical do folículo pré-ovulatório em ovinos secreta a uroquinase - tipo ativador plasminogênico em resposta ao aumento das concentrações de gonadotrofinas. A uroquinase ativa a collagenase latente e estimula a liberação do fator de necrose tumoral α do endotélio tecal. Esse fator induz progressivamente a expressão do gene metaloproteinase de matriz, apoptose e necrose inflamatória. A collagenase e a morte celular são um prelúdio para a formação do estigma e ruptura ovariana (MURDOCH; MCDONNEL, 2002).

A ovulação foi suprimida em ovelhas através da injeção intrafolicular de anticorpos para uPA, sugerindo que a secreção de uPA pelo ESO consequentemente o aumento da regulação da plasmina dentro da túnica albugínea e teca folicular é um fator que contribui para o mecanismo de ovulação (COLING; MURDOCH, 1997).

Através da microdissecção de ovários de sapos, demonstrou-se que o ESO, mas não a teca, é necessário para ovulação do oócito pela parede do folículo ovariano (SCHUETZ; LESSMAN, 1982).

O mecanismo de Murdoch e McDonnel, (2002) está bem exemplificado na Figura 2.

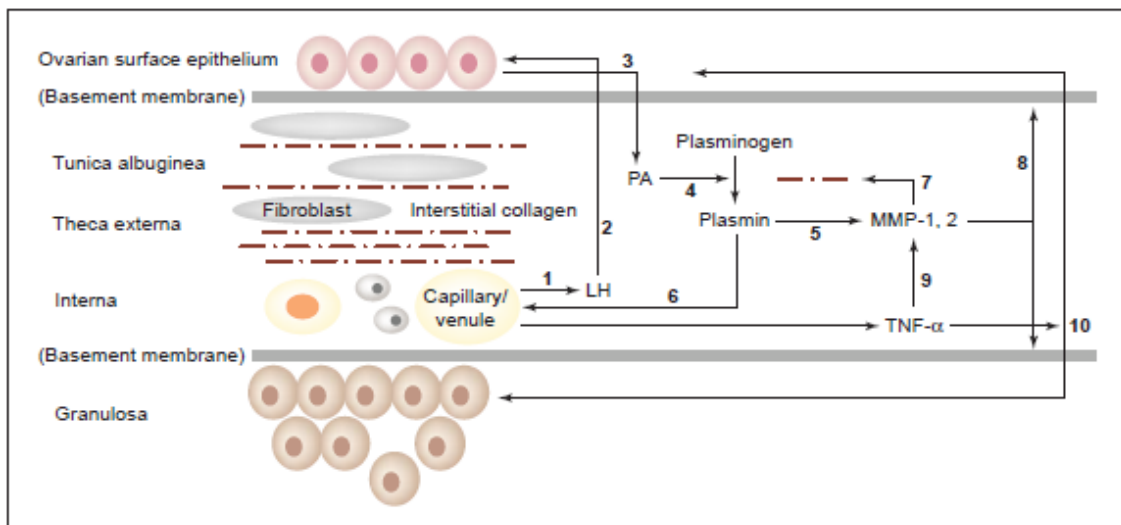


Figura 2 – Sinopse das interações do LH, tipos celulares ovarianos, ativador de plasminogênio (PA), colagenases e fator de necrose tumoral (TNF- α) na degeneração da parede apical folicular durante o processo ovulatório em ovelhas. (1) O transudato vascular tecal contendo LH é (2) entregue a camada de células receptoras no epitélio superficial ovariano, (3) estimulando a secreção do PA. (4) plasminogênio intersticial é convertido em plasmina, a qual (5) ativa as colagenases e (6) cliva o TNF- α das células endoteliais. (7) Colagenases rompem a rede de fibrila na teca e túnica albugínea (via MMP-1) e (8) promove a digestão das membranas basais que suportam o ovário e o epitélio da granulosa (via MMP-2). (9) TNF- α induz a produção de MMP e (10) morte celular; a proteólise e a deleção celular causam afinamento progressivo da parede ovariana, formação do estigma e ruptura folicular (Murdoch; McDonnel, 2002).

Na pesquisa realizada com ovinos, Colgin e Murdoch (1997) foram os primeiros a demonstrar que as células do epitélio superficial ovariano associadas com um folículo pré-ovulatório secretam a uroquinase tipo - ativador plasminogênico (uPA).

Em ovinos, através de cultura celular, foi evidenciado que a secreção uPA pelo epitélio superficial ovariano isolado, durante a fase folicular, foi estimulado pelo LH. Células obtidas durante a fase luteal ou em estado de anestro não responderam para o LH e liberação de uPA. A incubação do ESO em fase de anestro com o 17 β -estradiol e em seguida, inoculado com LH, secretou maiores quantidades ($P < 0.001$) de uPA do que as células que não receberam o 17 β -estradiol (MURDOCH; VAN KIRK; MURDOCH, 1999).

Através da técnica de imunohistoquímica Wright; Jurevic; Stouffer (2011) demonstraram que em ovários de macacos rhesus (*Macaca mulata*), a presença de receptores nucleares para estrógeno e progesterona no epitélio superficial ovariano, a porcentagem de células positivas para a coloração não se correlacionaram com a proximidade do folículo dominante ou corpo lúteo, ou para o tipo morfológico do ESO. A investigação do ESO na emergência do folículo pré-ovulatório e em torno do

sítio de ovulação reforça a conclusão que o ESO do primata é geralmente estável, o que possibilita resistência para o dano ao DNA associado a ovulação, sendo menos influenciado pela proximidade das estruturas dominantes do que o esperado. Na fase pré-ovulatória, o ápice do folículo exibiu um ESO que foi estatisticamente indistinguível da ESO distante do ápice. Após a ruptura folicular, o ESO dentro de 20 mm a partir do sítio ovulatório, mostrou sinais de desordem, mas não apoptose ou proliferação.

O ESO de macacos rhesus (*Macaca mulata*), exibe características ciclo-independente e ciclo-dependente, o que distingue de outros tipos de células ovarianas e sugerem diversas influências do ciclo menstrual. Entretanto, a proximidade do folículo dominante selecionado para ovulação ou do corpo lúteo não afetam claramente o ESO (WRIGHT; JUREVIC; STOUFFER, 2011).

Será importante conduzir estudos precisamente cronometrados para resolver o destino do ESO do primata na ovulação: dissolução da túnica albugínea subjacente ao ESO no local de ruptura e/ou subsequente exposição dos conteúdos foliculares que podem provocar a morte do ESO, enquanto deixa o ESO ligado a túnica intacta. Alternativamente, células do ESO separadas da túnica poderiam escapar da morte e serem transportadas para longe do ovário, juntamente com conteúdos foliculares, e serem depositadas dentro do trato reprodutivo ou cavidade peritoneal (WRIGHT; JUREVIC; STOUFFER, 2011).

Assim, a partir do conhecimento prévio sobre ESO em algumas espécies e do conhecimento da fisiologia da produção das MMPs ovarianas, o trabalho a seguir busca desvendar uma parte da relação das MMPs com ESO, relacionando com a expressão do RLH pelo tecido ovariano no desenvolvimento folicular equino.

3 ARTIGO

EXPRESSÃO GÊNICA DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ E DE RECEPTORES DE LH NO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR DA ÉGUA

Henrique Boll de Araujo Bastos¹, Néelson Alexandre Kretzmann², Anamaria Telles Esmeraldino³, Rodrigo Costa Mattos¹, Sandra Fiala Rechsteiner^{1,4}, Adriana Pires Neves^{1,5}

1. Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
2. Centro de Terapia Gênica - Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil
3. Faculdade de Medicina Veterinária, ULBRA, Canoas, Brasil
4. Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas, Brasil
5. Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA, Dom Pedrito, Brazil

RESUMO

O período compreendido pela emergência, desenvolvimento folicular até a formação de um folículo dominante, requer um grande remodelamento tecidual. A ação de enzimas que promovem a lise do colágeno como as metaloproteinases de matriz (MMPs) são fundamentais para o desenrolar deste processo. É sugerido que a produção destas enzimas seja desencadeada pelo aumento na concentração de LH circulante, que atua sobre o epitélio superficial ovariano (ESO). O objetivo deste estudo foi aprofundar o conhecimento da expressão do RNAm das MMP-1 e MMP-2, durante o desenvolvimento folicular em éguas. A técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (real-time PCR) foi utilizada, para relacionar à expressão do RNAm do receptor de hormônio luteinizante (RLH) e a imunolocalização deste RLH nas células que compõe o ESO da região da fossa de ovulação. Foram selecionadas diferentes porções de ovários de éguas cíclicas. As éguas foram distribuídas em dois grupos. Grupo 1: animais onde os folículos apresentavam até 28mm de diâmetro (crescimento); Grupo 2: animais com folículos maiores que 28mm de diâmetro (dominância folicular). Os resultados mostraram que o RNAm para as MMP-1, MMP-2 e RLH, estão presentes no ovário equino durante todo o período de desenvolvimento folicular e nas diferentes porções do ovário analisadas. Dentro do Grupo 2, a MMP-1 e o RLH apresentaram uma concentração significativamente maior ($p < 0,05$), de RNAm no ovário com folículo dominante do que no ovário contra-lateral. No Grupo 2, quando analisadas somente as diferentes porções do ovário com folículo dominante, evidenciou-se que a MMP-1, MMP-2 e RLH tiveram uma concentração maior ($p < 0,05$), na região do estroma ovariano do que na região da fossa de ovulação. As éguas do Grupo 2, apresentaram uma concentração significativamente menor ($p < 0,05$) do que as éguas do grupo 1 na quantidade de RNAm para RLH. Através da imunohistoquímica observou-se que as células da ESO na região da fossa de ovulação expressaram o RLH com diferença

nas intensidades médias. As éguas com folículos dominantes (Grupo 2) tiveram maior intensidade média quando comparadas as éguas (Grupo 1) sem folículos dominantes ($p < 0,05$). Os resultados sugerem que a MMP-1 e MMP-2 têm uma atividade importante em todo o processo de remodelamento tecidual, que ocorre durante o desenvolvimento folicular e que o RLH presente no ovário e no ESO pode ter um papel fundamental para o mecanismo de sinalização para a produção das MMPs, visto que os ovários que apresentaram maiores concentrações de RLH tiveram maior expressão genica das MMPs.

Palavras – chave: Égua. Ovário. Folículo. Remodelação tecidual.

INTRODUÇÃO

A ovulação é o somatório de processos em curso sequencial, bem como, simultaneamente, dentro de diversos microambientes ovarianos (RICHARDS et al. 2002). No ovário, a remodelação tecidual é requisito para crescimento, expansão do folículo e quebra da parede folicular durante o processo ovulatório (SONG; PORTER; COOMBER, 1999). As metaloproteinases de matriz (MMPs) são enzimas que podem degradar a maioria dos componentes da matriz extracelular durante o remodelamento tecidual (RILEY et al. 2004). A metaloproteinase de matriz – 1 (MMP-1) (colagenase intersticial) já foi identificada em ovários de coelho (TADAKUMA et al. 1993) e primatas (YOUNG; HENNEBOLD; STOUFFER, 2002) e a metaloproteinase de matriz – 2 (MMP-2) (gelatinase A) já foi identificada em ovários de éguas, no líquido folicular (RILEY et al. 2001; RILEY et al. 2004), nas células da granulosa (SESSIONS; VICK; FITZGERALD, 2009), em ovários de primatas (YOUNG; HENNEBOLD; STOUFFER, 2002) e em hamsters siberianos (VROOMAN; YOUNG, 2010).

Após o início das ondas das gonadotrofinas pré-ovulatórias, há o aumento da atividade da colagenase ovariana e a degradação do colágeno é maior na região apical da parede folicular pré-ovulatória (MCINTUSH; SMITH, 1998). Em ovinos, foi identificado através de cultura celular, que a secreção da uroquinase - tipo ativador plasminogênico (uPA) pelo epitélio superficial ovariano (ESO), isolado durante a fase folicular, foi estimulado pelo Hormônio Luteinizante (LH) (MURDOCH; VAN KIRK; MURDOCH, 1999). Sugere-se que o uPA seja necessário para o desenrolar da cascata que culmina com a produção das MMPs, indicando que o ESO é

fundamental para que ocorra toda remodelação tecidual envolvida no desenvolvimento folicular equino.

A relação entre as MMPs com ESO e com o RLH ainda não foi descrita no desenvolvimento folicular no ovário equino, assim o objetivo deste trabalho é identificar a presença de receptores para o hormônio luteinizante (RLH) no ESO na região da fossa de ovulação e correlacionar com a expressão gênica da MMP-1, MMP-2 e RLH no ovário, demonstrando suas atividades durante as diferentes fases do desenvolvimento folicular no ovário equino.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram coletados ovários de 12 éguas sem raça definida, com histórico reprodutivo desconhecido, no Frigorífico Foresta, na cidade de São Gabriel no Rio Grande do Sul, Brasil. Foi realizada a inspeção macroscópica de todo o trato reprodutivo da égua, para identificação de alterações. Não havendo alterações, os ovários eram separados do restante do trato reprodutivo e identificados quanto à sua posição (direito e esquerdo), procedendo-se então a análise macroscópica dos mesmos. Foram selecionando apenas ovários de éguas cíclicas. Os ovários foram inspecionados e medidos e as estruturas encontradas foram medidas e descritas (folículos, corpo albicans e corpo lúteo). Com base na análise macroscópica realizada, os ovários foram distribuídos em dois grupos: Grupo 1 e Grupo 2. O diâmetro folicular foi estipulado de acordo com Ginther et al. (2004). O Grupo 1 (n= 6) compreendeu animais onde os folículos apresentavam < 28 mm de diâmetro e o Grupo 2 (n= 6) animais onde os folículos apresentavam ≥ 28 mm de diâmetro (folículos dominantes).

Coleta e armazenamento das amostras

Cada ovário foi seccionado longitudinalmente obtendo-se dois hemi-ovários. A partir de um hemi-ovário foram retirados dois fragmentos para a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (real-time PCR). Um dos fragmentos foi removido do terço médio da fossa de ovulação e o outro fragmento foi retirado da

porção central do ovário (estroma). Nos hemi-ovários que apresentavam folículos, o fragmento central foi removido juntamente com uma porção do folículo de maior tamanho. Os fragmentos obtidos foram colocados em contato com o líquido de preservação RNAlater® (Life Technologies) sendo armazenados junto ao gelo durante a coleta e o transporte, estocados a -20°C por 48 horas e após foram transferidos para um freezer a -80°C.

Foi retirado do outro hemi-ovário um fragmento do terço médio da fossa de ovulação para realização da técnica de imunohistoquímica. Este fragmento foi fixado em formol tamponado a 4% e processado em até 48 horas. Os tecidos fixados, foram encaminhados para serem incluídos em parafina e cortados em um micrótomo na espessura de 4 micrometros. Os cortes foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina, para identificação e confirmação que o epitélio cuboide (células de formato poligonal) estava presente na superfície do ovário o que confirma a presença da fossa de ovulação, as lâminas foram analisadas através da microscopia óptica.

Imunohistoquímica

Após o corte dos blocos de parafina na espessura de 5 μ , o material foi fixado em lâminas previamente tratadas com Histogrip®. Para a realização da técnica de imunohistoquímica, utilizou-se um sistema automatizado (BenchMark XT, Ventana®). O anticorpo primário utilizado foi o anticorpo policlonal de coelho anti-RLH humano (Santa Cruz Biothecnology) de acordo com Esmeraldino et al. (2010). O anticorpo foi diluído a uma concentração de 1:300. Como controle positivo foi utilizado testículo de camundongo de acordo com as especificações do fabricante.

Análise Imunohistoquímica

Para análise das lâminas de imunohistoquímica seguiu-se o método descrito por Detre; Jotti; Dowsett, (1995), modificado para a observação da intensidade da coloração, correspondendo a presença de coloração negativa (0), fraca (1), intermediária (2) e forte (3). Foram consideradas positivas somente as células que apresentaram coloração citoplasmática, local da presença dos RLH.

Extração e transcrição reversa do RNAm

A extração do RNAm foi feita de acordo com as instruções do fabricante utilizando o reagente comercial TRIzol® Reagent (Life Technologies). Após a extração o RNAm foi quantificado por medição fotométrica (NanoDrop, Thermo Scientific®). A transcrição reversa do RNAm em cDNA foi realizada de acordo com as instruções do fabricante do kit comercial GoScript™ Reverse Transcription System (Promega – Wisconsin, USA).

PCR em tempo real quantitativo

O real-time PCR foi realizado com volume final de 25µl, contendo 1µM de ambos os primers e o real-time PCR Master Mix 2X GoTaq® (Promega Wisconsin, USA). A amplificação foi realizada utilizando o termociclador Mx3000P real-time PCR Stratagene system (GE Healthcare), sendo os dados processados pelo o software integrado MX PRO. Para o cálculo foi utilizada uma curva padrão relativa (fórmula= $10^{(ct\ alvo - CT\ padrão)/slope}$). O perfil do programa utilizado para a amplificação foi 95°C por 10 minutos seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento por 30 segundos e extensão a 60°C por 30 segundos. As temperaturas de anelamento foram 56°C para o MMP-1 e 60°C para os genes MMP-2 e RLH.

Os *primers* para amplificação foram obtidos através da *Integrated DNA Technologies* (IDT®) e as sequências utilizadas estão citadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Detalhes das sequências utilizadas para real-time PCR.

Gene	Sequência do Primer	Temperatura de anelamento	Referências
PF MMP-1 PR MMP-1	5'- CAT CGT GAC AAT TCT CCC TTT G - 3' 5'- TAC GTG GGC CTG GCT GAA - 3'	56°C	(YUAN et al. 2008)
PF MMP-2 PR MMP-2	5'- ATG GCG CCC ATT TAC ACG TA - 3' 5'- AGC TCT TG A ATG CCC TTG ATG - 3'	60°C	(YUAN et al. 2010)
PF LHR PR LHR	5'- CCA CAA CTG ATA GCT ACC AAC AAA G - 3' 5'- TGC AGG TGA AAT CGG TGAA G - 3'	60°C	(HERRERA-LUNA; BUDIK; AURICH, 2012)

Análise estatística

Para as análises estatísticas foi utilizado o software SPSS versão 20. Para análise dos dados do real-time PCR a significância da diferença entre as medianas foi determinada pelo teste de Mann Whitney. Para a análise dos dados da imunohistoquímica a significância foi determinada pelo teste Kruskal-Wallis. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Imunohistoquímica

Ao analisar as lâminas de imunohistoquímica pode-se evidenciar a presença de RLH, no citoplasma das células do epitélio superficial do ovário na região da fossa de ovulação, em todas as amostras coletadas, com diferença de intensidade média. O Grupo 1 apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) na intensidade média da coloração com coloração mais fraca que o grupo 2. Resultados ilustrados na Figura 3.

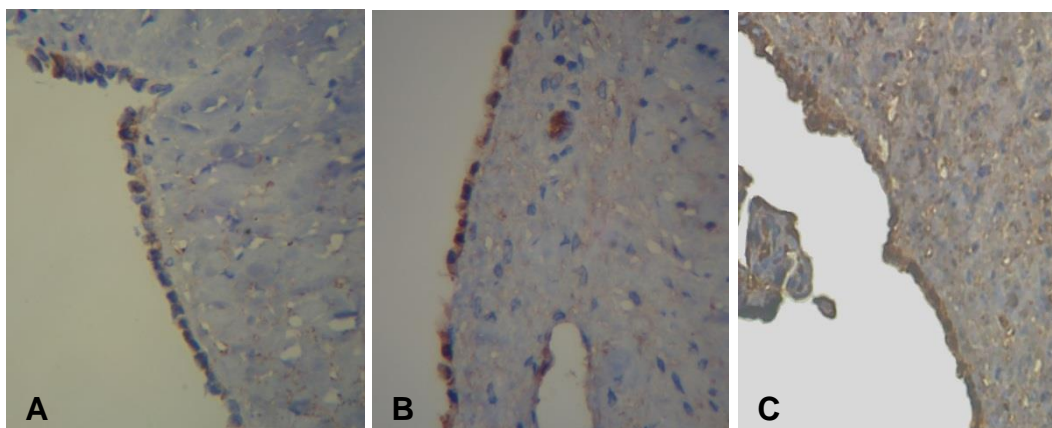


Figura 3. Imunohistoquímica para o RLH no citoplasma das células da superfície ovariana, na região da fossa de ovulação. A) epitélio ovariano com coloração fraca (1), B) coloração intermediária (2), (imagens representativas do grupo 1). C) epitélio ovariano com coloração forte (3), (imagem representativa do grupo 2). Todas as fotos com aumento de (40x).

Expressão gênica do RLH

Através da técnica de real-time PCR pode-se quantificar a expressão do RNAm para RLH nas diferentes porções e diferentes fases do desenvolvimento folicular dos ovários equinos estudados. Dentro do Grupo 2 ocorreu diferença significativa, na avaliação do ovário que apresentava o folículo dominante, nas porções da fossa de ovulação e do estroma ovariano, onde a fossa de ovulação apresentou menor concentração que o estroma ($P=0,031$). Neste mesmo grupo, o total individual da concentração do RNAm do ovário com folículo dominante foi significativamente maior do que o total individual do ovário contra-lateral ($P=0,029$). Quando comparados os dois grupos, o Grupo 1 apresentou uma concentração de RNAm significativamente maior do que o diferença do Grupo 2 ($P=0,048$). A Figura 4 A demonstra os resultados acima descritos.

Expressão gênica das MMPs

Através do real-time PCR foi possível demonstrar, pela primeira vez, que o RNAm para MMP-1 está presente no ovário equino, nas diferentes porções e durante o desenvolvimento folicular até a formação de um folículo dominante. Este achado sugere sua importância em todo remodelamento tecidual que ocorre durante o processo de desenvolvimento folicular. Dentro do Grupo 2 ocorreu diferença significativa, na avaliação do ovário que apresentava o folículo dominante, nas porções da fossa de ovulação e do estroma ovariano, onde a fossa de ovulação apresentou menor concentração que o estroma ($P=0,027$). Neste mesmo grupo, o total individual da concentração do RNAm para MMP-1 do ovário com folículo dominante foi significativamente maior do que o total individual do ovário contra-lateral ($P=0,022$). Os resultados estão ilustrados na Figura 4 B.

Foi também confirmada a presença do RNAm para MMP-2 no ovário equino, nas diferentes porções e durante o desenvolvimento folicular até a formação de um folículo dominante. Dentro do grupo 2 ocorreu diferença significativa, na avaliação do ovário que apresentava o folículo dominante, nas porções da fossa de ovulação e do estroma ovariano, onde a fossa de ovulação apresentou menor concentração que o estroma ($P=0,032$). Nas demais comparações entre os grupos não foi encontrado diferença estatística. Os resultados são demonstrados na Figura 4 C.

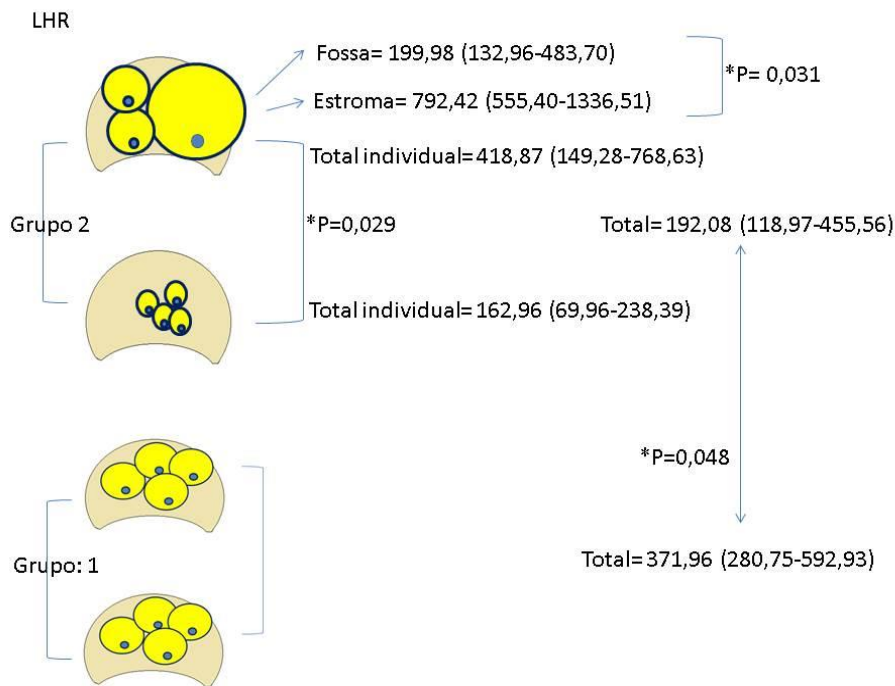


Figura 4. A – Esquema demonstrando a expressão genica do RLH. O grupo 1 é representado por ovários (cor marrom) com folículos (cor amarela) de mesmo tamanho. O grupo 2 é representado por um ovário com folículo dominante e outro com folículos pequenos. Os valores calculados estão demonstrados através da mediana e seus respectivos percentis. O asterisco (*) está presente onde há diferença significativa.

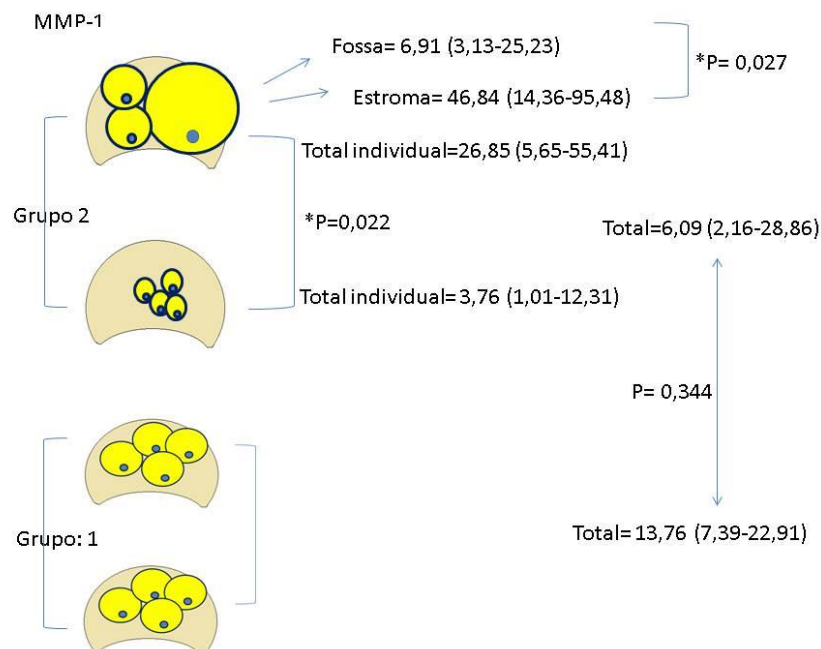


Figura 4. B – Esquema demonstrando a expressão genica da MMP-1. O grupo 1 é representado por ovários (cor marrom) com folículos (cor amarela) de mesmo tamanho. O grupo 2 é representado por um ovário com folículo dominante e outro com folículos pequenos. Os valores calculados estão demonstrados através da mediana e seus respectivos percentis. O asterisco (*) está presente onde há diferença significativa.

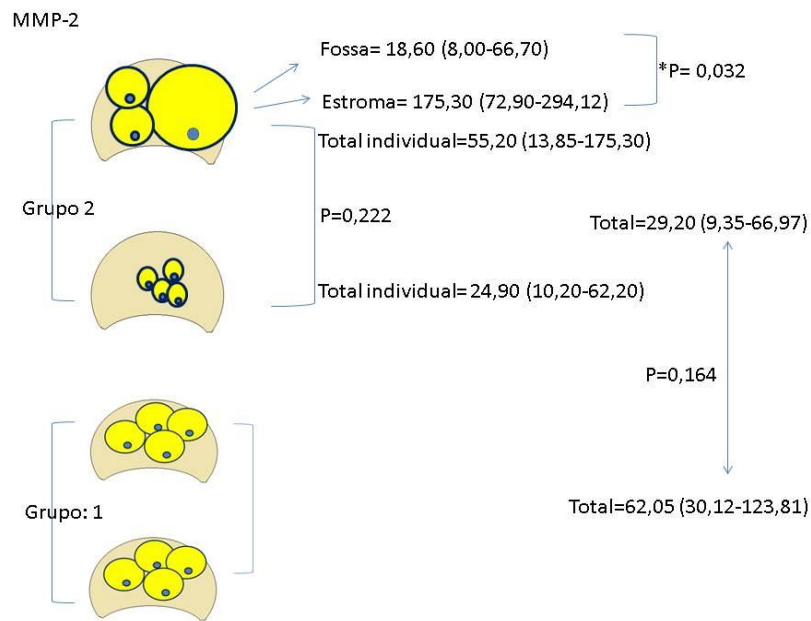


Figura 4. C – Esquema demonstrando a expressão genica da MMP-2. O grupo 1 é representado por ovários (cor marrom) com folículos (cor amarela) de mesmo tamanho. O grupo 2 é representado por um ovário com folículo dominante e outro com folículos pequenos. Os valores calculados estão demonstrados através da mediana e seus respectivos percentis. O asterisco (*) está presente onde há diferença significativa.

DISCUSSÃO

Este trabalho demonstrou a presença do RNAm para a MMP-1 e MMP-2, nas diferentes porções e fases de desenvolvimento dos ovários coletados, sugerindo que as MMPs podem ser importantes para o desenvolvimento folicular até a formação de um folículo dominante. No ovário, a remodelação tecidual é requisito para crescimento, expansão do folículo, ruptura da parede folicular durante o processo ovulatório (SONG; PORTER; COOMBER, 1999), transformação do folículo que ovulou em corpo lúteo, bem como a dissolução do corpo lúteo durante a regressão luteal. (CURRY; OSTEEEN, 2003).

Nesta pesquisa evidenciou-se que os ovários pertencentes ao Grupo 2, que apresentavam folículo dominante, expressam quantidades significativamente maiores de RNAm para o RLH e MMP-1 que os ovários contra-laterais deste mesmo grupo. Assim sugere-se que a ação do hormônio luteinizante sob seu receptor, possa determinar o controle do desenvolvimento do folículo dominante e também possa determinar o controle da produção da MMPs. Segundo Ginther et al. (2002) os fatores locais que causam o aparente aumento diferencial na capacidade de

resposta do futuro folículo dominante para as gonadotrofinas podem ser fundamentais para o mecanismo de seleção folicular. A atresia folicular que ocorreu no ovário contra-lateral (ovário sem o folículo dominante) do Grupo 2, e a menor expressão do RLH pode ser relacionado com Ginther et al. (2005) que aludem sobre o efeito negativo atribuído à inibina, sobre o FSH, com uma possível contribuição tardia do estradiol.

No Grupo 1 (ovários com folículos em desenvolvimento), não ocorreu diferença significativa entre as concentrações de MMP-1, MMP-2, LHR. Isto pode estar relacionado com a fase de crescimento dos folículos. Após a emergência da onda folicular ovulatória, os folículos se desenvolvem durante a fase de crescimento comum até o início da divergência (GINTHER, 2007). Durante essa fase de crescimento comum, é necessária uma remodelação tecidual e níveis de receptores para o LH semelhantes em ambos os ovários.

Os ovários das éguas do Grupo 1 apresentavam concentrações médias superiores de RLH, MMP-1 e MMP-2, em relação ao Grupo 2, provavelmente por apresentar ambos os ovários com desenvolvimento folicular. Pois nos ovários do Grupo 2, somente o ovário com folículo dominante, apresentava concentrações altas, em contraste com o ovário contra-lateral que apresentou concentrações muito baixas.

Com base nos resultados obtidos sugere-se que a MMP-1 possa ser fundamental durante todo o processo de desenvolvimento folicular e principalmente na formação do folículo pré-ovulatório, pois, o momento de maior concentração do RNAm para MMP-1 ocorreu no ovário que apresentava o folículo dominante.

Em ovários de primatas através da técnica de real-time PCR foi demonstrado que os níveis de RNAm da colagenase intersticial (MMP-1) foram maiores no início da fase luteal, quando comparados com todos os outros estágios do ciclo luteal (meio, meio-tardio, tardio e muito tardio) ($P < 0.05$). O aumento da expressão da MMP-1 sugere que esta colagenase está envolvida em uma extensiva e rápida reorganização tecidual e angiogênese ocorrendo no início da fase lútea (YOUNG; HENNEBOLD; STOUFFER, 2002).

Através da técnica de imunohistoquímica pôde-se identificar a forma latente da MMP-1, em coelhos. Em folículos pré-ovulatórios foi encontrado a pro MMP-1, no citoplasma celular da teca interna e externa, glândulas intersticiais e epitélio germinal. No lúmen capilar do tecido intersticial de ambas paredes foliculares apicais

e basais não mostrou imunomarcagem para a pro MMP-1. Na parede dos folículos ovulados dos ovários que foram removidos 10 horas após a administração da gonadotrofina coriônica humana (HCG), as células da granulosa e as células da teca interna mostrou uma forte imunocoloração para a pro MMP-1 (TADAKUMA et al. 1993).

A MMP-2 manteve concentrações de RNAm muito próximas durante todas as fases de crescimento folicular, indicando uma importante atividade em todos os eventos relacionados com o desenvolvimento folicular. Isto condiz com Riley et al. (2004) que não encontraram mudança significativa na quantidade de MMP-2 secretada pelos tecidos a partir de qualquer uma das três regiões estudadas (entre o folículo e a fossa de ovulação, no sítio lateral ou adjacente do folículo e dentro do córtex ovariano em um local longe de folículos pré-ovulatórios ou outros folículos) e também concorda com Riley et al. (2001) que através da imunohistoquímica demonstraram que a MMP-2 estava presente no estroma ovariano consistentemente em todas as amostras e no tecido folicular de folículos obtidos a partir de 5mm de diâmetro. Através da zimografia também demonstraram no fluido folicular de éguas que a atividade da gelatinase predominante foi a de 72 KDa, correspondendo a forma latente de MMP-2, a qual foi secretada em quantidades similares em todos os tamanhos foliculares <10 a 45mm de diâmetro.

No líquido folicular e em células da granulosa de equinos por meio da técnica de real-time PCR, Sessions; Vick; Fitzgerald (2009) demonstraram que a expressão da MMP-2 foi maior ($P < 0.05$) em folículos pré-ovulatórios do que nos folículos grandes. A expressão da MMP-2 *in vitro* nas células da granulosa não mudou com o tamanho folicular ou estado folicular. A atividade da MMP-2 foi maior ($P < 0.05$) no fluido folicular de folículos médios (15 a 29 mm) do que no fluido folicular de folículos grandes (≥ 30 mm) quando analisados independentemente dos estados. Estes resultados não estão de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pois não foi encontrada diferença estatística, entre os ovários com folículos médios e os ovários com folículos grandes.

O presente estudo ainda relacionou o RLH presente nas células da superfície ovariana na região da fossa de ovulação como um fator importante para o desenrolar da cascata que culmina com a lise do colágeno intersticial, o que é imprescindível para que ocorra todo o remodelamento tecidual. Baseado em um modelo proposto por Murdoch e McDonnell, (2002) que aduzem que as células da

superfície epitelial ovariana em contato íntimo com a parede apical do folículo pré-ovulatório em ovinos secreta a uroquinase - tipo ativador plasminogênico (uPA), em resposta ao aumento das concentrações de gonadotrofinas. A uroquinase ativa a collagenase latente e estimula a liberação do fator de necrose tumoral- α do endotélio tecal. Esse fator induz progressivamente a expressão do gene metaloproteinase de matriz, apoptose e necrose inflamatória. Observou-se que a ovulação foi suprimida em ovelhas através da injeção intrafolicular de anticorpos para uPA (COLING; MURDOCH, 1997). Através da microdissecção de ovários de sapos, foi confirmado que o ESO, mas não a teca, é necessário para ovulação do oócito pela parede do folículo ovariano (SCHUETZ; LESSMAN, 1982).

Este estudo relacionou a imunomarcção do RLH, realizada nas células do ESO da região da fossa de ovulação, como um fator importante para a formação do futuro folículo dominante. Ficou demonstrada uma diferença na intensidade média de coloração de acordo com o desenvolvimento folicular o que pode ser relacionado ao mecanismo proposto por Murdoch e McDonnell, (2002) que aludem sobre a importância do RLH presente no ESO durante os eventos relacionados com a ovulação.

Em ovários de gatas através da autorradiografia, foi demonstrado que em folículos atrésicos, foi reduzido significativamente os níveis dos sítios de ligação do FSH e LH, na camada de células da granulosa, em comparação com folículos não atrésicos. Em folículos não atrésicos, os níveis dos sítios de ligação do FSH nas células da granulosa, bem como os níveis dos sítios de ligação do LH, em ambas teca e camada da granulosa, aumentaram significativamente com o aumento do diâmetro folicular (SAINT-DIZIER et al. 2007), condizendo com os resultados obtidos, pois no grupo 2 nos ovários com folículos dominantes, tiveram um expressão do RNAm para RLH maior do que no ovário contra-lateral (com folículos atrésicos).

Nas células da granulosa, de equinos, foi verificado através do immunoblotting que a quantidade de receptores de LH, aumentou com o aumento no diâmetro folicular (GOUDET et al. 1999). O que condiz em parte com os resultados obtidos, pois os ovários que apresentaram as maiores medianas foram os ovários do grupo 2 com folículo dominante.

Ocorreu diferença de intensidade média do RLH nas amostras de imunohistoquímica entre o Grupo 1 e o Grupo 2, esta diferença não foi marcante na

expressão gênica do RLH, o que pode ser relacionado ao observado por Kogure et al. (2013) que em ovários de ratos demonstra a influência de um siRNA na molécula chaperone identificada como Glucose-Regulated Protein, 78-kilodalton (GRP78), que pode alterar a ativação do RLH. Isto indica que o RLH, pode ter um mecanismo de transcrição e ativação, que ainda permanece pouco compreendido.

A expressão do RNAm para o receptor de LH foi menor na células da teca e da granulosa em égua na transição do que nos animais com folículos pré-ovulatórios (WATSON et al. 2004).

Quando comparamos dentro do Grupo 2, as concentrações das MMPs foram visivelmente maiores no ovário que apresentou o folículo dominante do que no ovário contra-lateral. Esta evidência é relacionada com a presença do RLH, que apresentam maior concentração no ovário que possui o folículo dominante. Assim, pode-se considerar que as MMPs seguem a sinalização realizada pelo LH. Como também sugerido por Desvousges; Sharp, (2005) que em éguas a produção de MMP-2 parece requerer gonadotropina, o HCG aumentou a produção da MMP-2 *in vitro*, pela parede do folículo.

CONCLUSÃO

Este trabalho demonstra a expressão gênica da MMP-1, MMP-2 e RLH nas diferentes fases do desenvolvimento folicular equino, relacionando com a marcação imunohistoquímica do ESO na região da fossa de ovulação, assim, sugere-se que a MMP-1 e a MMP-2 podem ser fundamentais para os eventos relacionados com a remodelação tecidual, que ocorre durante o desenvolvimento folicular, até a formação de um folículo dominante. Foi demonstrado uma relação entre as MMPs e o RLH, sugerindo que o RLH, tenha um papel importante na sinalização para a produção das MMPs.

O mecanismo global da quebra do colágeno no ovário equino ainda necessita ser desvendado. Pesquisas futuras poderão proporcionar um melhor esclarecimento deste ponto fundamental para a compreensão dos eventos relacionados com a ovulação.

REFERÊNCIAS

COLGIN, D. C.; MURDCH, W. J. Evidence for a role of the ovarian surface epithelium in the ovulatory mechanism of the sheep: secretion of urokinase-type plasminogen activator. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 47, p. 197-204, 1997.

CURRY, T. E. JR.; OSTEEN, K. G. The Matrix Metalloproteinase System: Changes, Regulation, and Impact throughout the Ovarian and Uterine Reproductive Cycle. **Endocrine Reviews**. Baltimore, U. S. A. v. 24, p. 428–465, Ago. 2003.

DETRE, S.; JOTTI, G. S.; DOWSETT, M. A “quickscore” method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. **Journal of Clinical Pathology**, v. 48, p.876-878, 1995.

DESVOUSGES, A. L.; SHARP, D. C. Ovarian tissue remodelling and preovulatory follicle development. **Havemeyer Foundation Monograph Series N. 14**, p. 25-27, 2005.

ESMERALDINO, A. T. et al. Immunohistochemical identification of luteinizing hormone receptors in the extra-gonadal reproductive tract of the mare. **Animal Reproduction Science**, v. 121, p. 38-39, 2010.

GINTHER, O. J. et al. Follicle dynamics and selection in mares. **Reproduction**, v. 1, n. 1, p. 45-63, 2004.

GINTHER, O.J. et. al. Follicle and endocrine dynamics during experimental follicle deviation in mares. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.67, p. 862–867, Sep. 2002.

GINTHER, O. J. et. al. Regulation of circulating gonadotropins by the negative effects of ovarian hormones in mares. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 73, p. 315-323, 2005.

GINTHER, O. J. **Ultrasonic imaging and animal reproduction: color-doppler ultrasonography**. Cross plains Equiservices publishing. 2007.

GOUDET, G. et al. Intrafollicular content of luteinizing hormone receptor, a-inhibin, and aromatase in relation to follicular growth, estrous cycle stage, and oocyte competence for in vitro maturation in the mare. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 60, p. 1120-1127, 1999.

HERRERA-LUNA, C. V.; BUDIK, S.; AURICH, C. Gene Expression of ACTH, Glucocorticoid Receptors, 11bHSD Enzymes, LH-, FSH-, GH Receptors and Aromatase in Equine Epididymal and Testicular Tissue. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p. 928-935, 2012.

KOGURE, K. et al. Glucose-Regulated Protein, 78-Kilodalton Is a Modulator of Luteinizing Hormone Receptor Expression in Luteinizing Granulosa Cells in Rats. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 88, p. 1-11, Jan. 2013.

- MCINTUSH, E. W. SMITH M. F. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in ovarian function. **Reviews of Reproduction**, Cambridge, v.3, p. 23-30, Jan. 1998.
- MURDOCH, W. J. MCDONNELL, A. C. Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and carcinogenesis. **Reproduction**. v. 123, n. 6, p. 743-750, Jun. 2002.
- MURDOCH, J.; VAN KIRK E. A.; MURDOCH W. J. Hormonal control of urokinase plasminogen activator secretion by sheep ovarian surface epithelial cells. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 61 p.1487–149. 1999.
- RICHARDS J. S. et al. OVULATION: New Dimensions and New Regulators of the Inflammatory-Like. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 64, p. 69-92. 2002.
- RILEY, S. C. et al. Secretion of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases into follicular fluid during follicle development in equine ovaries. **Reproduction**. v. 121, n. 4, p. 553-60. Apr. 2001.
- 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.
- SAINT-DIZIER, M. et al. Expression of Follicle Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone Receptors During Follicular Growth in the Domestic Cat Ovary. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, p. 989-996, 2007.
- SESSIONS, D. R.; VICK M. M.; FITZGERALD B. P. Characterization of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 and their inhibitors in equine granulosa cells in vivo and in vitro. **Journal of Reproduction Science**. Amsterdam, v. 87, n. 12, Dez. 2009.
- SCHUETZ, A. W.; LESSMAN C. Evidence for follicle wall involvement in ovulation and progesterone production by frog (*Rana pipiens*) follicles in vitro. **Differentiation**. Berlin, v. 22. p. 79–84. 1982.
- SONG L.; PORTER D. G.; COOMBER B. L. Production of Gelatinases and Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases by Equine Ovarian Stromal Cells In Vitro. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 60, p. 1–7. 1999.
- TADAKUMA, H. et al. Association of immunolocalization of matrix metalloproteinase 1 with ovulation in hCG-treated rabbit ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 98, p. 503-508, 1993.
- VROOMAN, L.; YOUNG K. Ovarian matrix metalloproteinases are differentially regulated during the estrous cycle but not during short photoperiod induced regression in Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*) **Reproductive Biology and Endocrinology** , June. 2010.

WATSON, E. D. et al. Expression of messenger ribonucleic acid encoding for steroidogenic acute regulatory protein and enzymes, and luteinizing hormone receptor during the spring transitional season in equine follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 26 p. 215 – 230, Oct. 2004.

YOUNG, K. A.; HENNEBOLD J. D.; STOUFFER R. L. Dynamic expression of mRNAs and proteins for matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in the primate corpus luteum during the menstrual cycle. **Molecular Human Reproduction**, v. 8, p. 833-840, 2002.

YUAN, Z. Q. et al. Equine sarcoid fibroblasts over-express matrix metalloproteinases and are invasive. **Virology**, v. 396, p. 143-151, 2010.

YUAN, Z. Q. et al. Transcriptional Changes Induced by Bovine Papillomavirus Type 1 in Equine Fibroblasts. **Journal of Virology**, v. 82, p. 6481-6491, Apr. 2008.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo pode desvendar alguns pontos ainda não explorados e demonstrar uma parte do mecanismo de ação das MMPs, relacionando com os RLH, e assim verificar que as gonadotrofinas do ciclo estral, têm por função comandar toda a remodelação tecidual, que está envolvida, desde o início do desenvolvimento folicular até a formação de um folículo dominante.

Estudos futuros dos eventos relacionados com o desenvolvimento folicular, assim como a ovulação, são fundamentais para o entendimento da fisiologia ovariana, podendo assim ligar, todo esse conhecimento com os problemas enfrentados na reprodução equina.

REFERÊNCIAS

- BERGFELT, D. R. Anatomy and Physiology of the Mare. In: SAMPER, J. C. (ed. 2nd) **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**. St. Louis: Missouri: Saunders Elsevier. 2009. cap. 11, p. 113 – 131.
- BIRKEDAL-HANSEN, H. et al. Matrix metalloproteinases: a review. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**. v.4, p.197–250, 1993.
- CARNEVALE, E. M. et al. Ultrasonographic characteristics of the preovulatory follicle preceding and during ovulation in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 8, p. 428-431, Nov-Dec. 1988.
- COLGIN, D. C.; MURDOCH, W. J. Evidence for a role of the ovarian surface epithelium in the ovulatory mechanism of the sheep: secretion of urokinase-type plasminogen activator. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 47, p.197-204, 1997.
- CURRY, T. E. JR. et al. The role of ovarian proteases and their inhibitors in ovulation. **Steroids**, v. 54, p. 501-521, Nov. 1989.
- CURRY, T. E. JR.; OSTEEEN, K. G. The Matrix Metalloproteinase System: Changes, Regulation, and Impact throughout the Ovarian and Uterine Reproductive Cycle. **Endocrine Reviews**. Baltimore, U. S. A. v. 24, p. 428–465, Ago. 2003.
- DERECKA, K. et. al. Cycle dependent LH/hCG receptor gene expression in porcine nongonadal reproductive tissues. **Journal Physiol Pharmacol**. v.46, n.1, p. 77-85, Mar. 1995.
- DYCE, K. M.; SACPK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1996, 663p
- GASTAL, E. L. et al. Miniature ponies: 1. Follicular, luteal and endometrial dynamics during the oestrous cycle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, p. 376-385. 2008.
- GASTAL, E. L. et al. Role of Diameter Differences among Follicles in Selection of a Future Dominant Follicle in Mares. **Biology of Reproduction**. Champaign, v. 57, p. 1320-1327.1997.
- GETTY, R. Sisson and Grossman's **The Anatomy of the Domestic Animals**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 5th ed., v.1, p.542-544. 1975.
- GINTHER, O. J. et al. Follicle and endocrine dynamics during experimental follicle deviation in mares. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.67, p.862–867, Sep. 2002.

- GINTHER, O. J. et al. Follicle dynamics and selection in mares. **Reproduction**, v. 1, n. 1, p. 45-63, 2004.
- GINTHER O. J. et. al. Miniature ponies: 2. Endocrinology of the oestrous cycle. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 20, p. 386–390. 2008.
- GINTHER, O. J. et. al. Regulation of circulating gonadotropins by the negative effects of ovarian hormones in mares. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 73, p. 315-323, 2005.
- GINTHER, O. J. **Reproductive biology of the mare.**, Wisconsin, EUA, Ed. 2^a Equiservices. 1992.
- GINTHER O. J. **Ultrasonic imaging and animal reproduction: color-doppler ultrasonography.** Cross plains Equiservices publishing. 2007.
- MCINTUSH E. W.; SMITH M. F. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in ovarian function. **Reviews of Reproduction**, Cambridge, v.3, p. 23-30, Jan. 1998.
- MURDOCH W. J.; MCDONNELL A. C. Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and carcinogenesis. **Reproduction**. v.123, n. 6, p.743-750, Jun. 2002.
- MURDOCH J.; VAN KIRK E. A.; MURDOCH W.J. Hormonal control of urokinase plasminogen activator secretion by sheep ovarian surface epithelial cells. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 61 p.1487–149. 1999.
- RICHARDS, J. S. et al. OVULATION: New Dimensions and New Regulators of the Inflammatory-Like. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, 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.
- RILEY, S. C. et. al. Secretion of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases into follicular fluid during follicle development in equine ovaries. **Reproduction**. v. 121, n. 4, p. 553-60. Apr. 2001.
- ROSER, J. F.; EVANS, J. W. Luteal Luteinizing Hormone Receptors During the Postovulatory Period in the Mare. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.29, p.499-510. 1983.
- SCHUETZ A. W.; LESSMAN C. Evidence for follicle wall involvement in ovulation and progesterone production by frog (*Rana pipiens*) follicles in vitro. **Differentiation**. Berlin, v. 22. p. 79–84. 1982.
- SESSIONS D. R.; VICK M. M.; FITZGERALD B. P. Characterization of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 and their inhibitors in equine granulosa cells in vivo and in vitro. **Journal of reproduction science**. Amsterdam, v. 87, n. 12, Dez. 2009.

SONG, L.; PORTER D. G.; COOMBER B. L. Production of Gelatinases and Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases by Equine Ovarian Stromal Cells In Vitro. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 60, p. 1–7.1999.

STOUT, T. A. E. Prostaglandins. In: MCKINNON, A. O. et. al. (Ed. 2^a) **Equine Reproduction**. Ed. Wiley-Blackwell, 2011. cap. 171, p.1642-1645.

TADAKUMA, H. et. al. Association of immunolocalization of matrix metalloproteinase 1 with ovulation in hCG-treated rabbit ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 98, p. 503-508, 1993.

VROOMAN, L.; YOUNG K. Ovarian matrix metalloproteinases are differentially regulated during the estrous cycle but not during short photoperiod induced regression in Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*), **Reproductive Biology and Endocrinology**, June. 2010.

WATSON, E. D. et. al. Expression of messenger ribonucleic acid encoding for steroidogenic acute regulatory protein and enzymes, and luteinizing hormone receptor during the spring transitional season in equine follicles. **Domestic animal endocrinology**, Stoneham, v. 26 p. 215 – 230, Oct. 2004.

WRIGHT, J. W.; JUREVIC, L.; STOUFFER, R. L. Dynamics of the primate ovarian surface epithelium during the ovulatory menstrual cycle. **Human Reproduction**, Oxford, v. 26, 2011.

YOUNG, K.A.; HENNEBOLD J.D.; STOUFFER R.L. Dynamic expression of mRNAs and proteins for matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in the primate corpus luteum during the menstrual cycle. **Molecular Human Reproduction**, v. 8, p. 833-840, 2002.

YOUNG, P. Y. K. et al. Regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene expression in human ovarian surface epithelial cells by interleukin-1. **Human Reproduction**, v. 17, n. 9, p. 2300–2306, 2002.

ZIECIK, A. J. et al. Nongonadal LH receptors, their involvement in female reproductive function and a new applicable approach. **The Veterinary Journal**, London, v.169, p. 75–84, 2005.

ANEXO A: Local de coleta das amostras para a realização da técnica de real-time PCR (quadrados vermelhos) e imunohistoquímica (quadrado azul).

