



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EXPRESSÃO DO *GROWTH AND DIFFERENTIATION FACTOR 9 (GDF9)* E *BONE MORPHOGENETIC PROTEIN 15(BMP15)* *IN VITRO* E SEU EFEITO NO PROCESSO DE LUTEINIZAÇÃO EM CÉLULAS DA GRANULOSA BOVINAS**

**FERNANDA PAULINI**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**BRASÍLIA/DF**  
**JANEIRO DE 2010**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EXPRESSÃO DO *GROWTH AND DIFFERENTIATION FACTOR 9 (GDF9)* E *BONE MORPHOGENETIC PROTEIN 15(BMP15)* *IN VITRO* E SEU EFEITO NO PROCESSO DE LUTEINIZAÇÃO EM CÉLULAS DA GRANULOSA BOVINAS**

**FERNANDA PAULINI**

**ORIENTADOR: EDUARDO DE OLIVEIRA MELO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**PUBLICAÇÃO: 24/ 2010**

**BRASÍLIA/DF**  
**JANEIRO DE 2010**

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

PAULINI, F. **Expressão do *Growth and Differentiation Factor 9 (GDF9)* e *Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15)* in vitro e seu efeito no processo de luteinização das células da granulosa bovinas.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2010, 101p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente pra fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

### FICHA CATALOGRÁFICA

PAULINI, F. **Expressão do *Growth and Differentiation Factor 9 (GDF9)* e *Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15)* in vitro e seu efeito no processo de luteinização das células da granulosa bovinas.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2010, 98p. Dissertação de Mestrado. (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2010.

1. Células transgênicas.
2. Superfamília TGF $\beta$ .
3. Foliculogênese.
4. Reprodução animal.

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EXPRESSÃO DO *GROWTH AND DIFFERENTIATION FACTOR 9 (GDF9)* E *BONE MORPHOGENETIC PROTEIN 15(BMP15)* *IN VITRO* E SEU EFEITO NO PROCESSO DE LUTEINIZAÇÃO EM CÉLULAS DA GRANULOSA BOVINAS**

**FERNANDA PAULINI**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS ANIMAIS.**

**APROVADA POR:**

---

**EDUARDO DE OLIVEIRA MELO, Doutor (Embrapa)**

---

**CAROLINA MADEIRA LUCCI, Doutora (UnB)**

---

**JOSÉ ROBSON BEZERRA SERENO, Doutor (Embrapa)**

**BRASÍLIA/DF, 26de JANEIRO DE 2010**

***DEDICO***

***Ao meu amado MARCELO CORRÊA DA SILVA  
Por me fazer abundantemente feliz;  
pelos momentos que compartilhamos,  
pelos sonhos adiados,  
pelo amor que dá o real sentido a vida.***

***DEDICO***

***Aos meus pais JOÃO RENATO e LUCIA HELENA,  
vocês são as minhas metades;  
todas as minhas realizações serão sempre suas.***

*"Não sei o que o mundo dirá de minha obra.  
A mim, parece que nunca acabei de ser criança.  
Uma criança que brincou na praia,  
que encontrou uma pedra bem polida,  
uma concha multicolorida,  
enquanto o grande oceano da verdade  
continua a se estender, ainda inexplorado,  
diante de meus olhos".*

Isaac Newton

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela benção da vida, por proteger meus passos, me dar forças para superar os obstáculos e me fazer acreditar que tudo posso naquele que me fortalece.

Aos meus pais, João Renato e Lucia Helena. Sou apenas um reflexo de vocês. Vocês são meu suporte, a pedra fundamental da minha vida!

Ao meu Marcelo Corrêa, por ser o melhor companheiro, amigo, que eu jamais imaginei ter, por estar sempre ao meu lado, mesmo quando não sou a melhor companhia.

Ao Hur Ben e a Marli, meus sogros tão queridos. Sinto em vocês minha família em Brasília. Obrigada pela acolhida calorosa, por todo apoio, conforto e incentivo.

Ao meu orientador Dr. Eduardo de Oliveira Melo, por compartilhar seus conhecimentos e ensinar-me a pensar e me superar, pela confiança, amizade e ética. Transmito minha admiração e carinho por toda sua dedicação à ciência.

Ao Dr. Maurício Machaim Franco, pela paciência constante, sempre tão atencioso. Seus ensinamentos foram fundamentais!

Ao Dr. José Robson Bezerra Sereno, que foi essencial para minha instalação em Brasília. Por estar sempre presente e colaborando de alguma maneira. Meus sinceros agradecimentos!!

Aos Pesquisadores e Funcionários da Embrapa Cenargen e Embrapa Cerrados pela amizade e incentivo.

A todos do Laboratório de Reprodução Animal, que de alguma maneira contribuíram para este trabalho: Isabela, Allice, Flávia, Rosana, Zé, Jeferson, Felipe, Tiago, Tatiana, Vitor, Ana Cláudia, Ester, Valquíria, Luis Fernando, Fernanda, Tatícia e Werner.

Em especial ao Pablo, Gabriela e Marcelo, que foram fundamentais na condução do trabalho. Obrigada pela ajuda incondicional, as melhores risadas, amizade, parceria e todos os momentos agradáveis proporcionados.

Às minhas amigas Andreza, Milene e Marceley. Com vocês tudo ficou mais fácil, mais divertido, tranquilo e calmo.

Ao pessoal da Embrapa Cerrados: Juliana, Rafael, Lucas, Norton, Sandro Peruano, Fernanda, Jair, pelo convívio maravilhoso e momentos especiais que tanto me fizeram crescer.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela estrutura e apoio financeiro para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A UnB pela formação acadêmica e profissional.

## ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
CAPÍTULO 1	
1 INTRODUÇÃO	01
1.2 Objetivo Geral	03
1.3 Objetivos Específicos	03
2 REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1 Desenvolvimento folicular	04
2.1.1 Interação entre ovócito, células do <i>cumulus oophorus</i> , granulosa e teca	06
2.1.2 Maturação ovocitária	08
2.2 Superfamília dos Fatores de Crescimento Transformadores $\beta$ - TGF $\beta$	09
2.2.1 Proteínas Morfogenéticas Óssea - BMPs	11
2.2.2 Fator de Crescimento e Diferenciação 9 - <i>GDF9</i>	12
2.2.2.1 Participação na expansão das células do <i>cumulus</i>	13
2.2.3 Proteína Morfogenética Óssea 15 - <i>BMP15</i>	14
2.2.3.1 Participação do gene <i>BMP15</i> na foliculogênese	15
2.2.4 Mutações no <i>GDF9</i> e <i>BMP15</i>	16
2.3 Receptores e vias de ativação da Superfamília TGF $\beta$	19
2.4 Esteroidogênese	23
2.4.1 Enzimas da esteroidogênese	24
2.4.2 Ações dos fatores secretados pelo ovócito na esteroidogênese e cultivo <i>in vitro</i> de células	26
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
CAPÍTULO 2	48
1 RESUMO	49
2 ABSTRACT	50
3 INTRODUÇÃO	51
4 MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1 Delineamento experimental	53
4.2 Colheita dos complexos <i>cumulus oophorus</i>	53
4.3 Extração de mRNA e síntese de cDNA	54
4.4 Reação em Cadeia da Polimerase- PCR	55
4.5 Ligação do cDNA ao vetor pGEM® - T Easy	56
4.5.1 Clonagem do vetor em bactérias <i>E. coli</i> competentes, extração do DNA plasmidial e quantificação	56
4.5.2 Purificação de DNA plasmidial	59
4.6 Cultura e propagação de células bovinas	59
4.6.1 Experimento 1 - Expressão do <i>GDF9</i> e <i>BMP15</i> em cultura de células bovinas	59
4.6.1.1 Ensaios de SDS - PAGE e Western Blotting	60

4.6.2 Experimento 2 - Determinação da concentração dos hormônios estradiol (E <sub>2</sub> ) e progesterona (P <sub>4</sub> ) nos meios de cultura.	61
4.6.2.1 Transfecção por meio de lipossomos	62
4.6.2.2 Expressão gênica nas células da granulosa	65
4.6.2.3 Expressão gênica do StAR por meio de PCR em tempo real (qPCR)	66
4.6.2.4 Dosagem hormonal	66
5 RESULTADO E DISCUSSÃO	67
5.1 Transfecção por lipofecção em células bovinas	67
5.2 Experimento 1 - Expressão do <i>GDF9</i> e <i>BMP15</i> em cultura de células bovinas	69
5.2.1 Ensaio de SDS - PAGE e Western Blotting	72
5.3 Experimento 2 - Expressão gênica do mRNA da enzima <i>CYP17</i> nas células da granulosa: confirmação da pureza do cultivo celular	74
5.3.1 Expressão gênica do mRNA do <i>GDF9</i> e <i>BMP15</i> na cultura de células da granulosa	76
5.3.2 Expressão gênica dos mRNA dos receptores do <i>BMP15</i> e <i>GDF9</i> na cultura de células da granulosa	77
5.3.3 Determinação da concentração dos hormônios estradiol (E <sub>2</sub> ) e progesterona (P <sub>4</sub> ) nos meios de cultura	79
5.3.4 Expressão gênica dos mRNA do gene <i>StAR</i> na cultura de células da granulosa	85
6. CONCLUSÕES	88
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

Figura 2.1	Eixo bi-direcional. Comunicação entre ovócito e células da granulosa para crescimento e desenvolvimento ovocitário e folicular. Sinalização parácrina (rosa); junções “gap” com troca de pequenas moléculas regulatórias (azul).	07
Figura 2.2	Processamento da secreção do <i>GDF9</i> e <i>BMP15</i> , com formação de homodímeros e heterodímeros.	11
Figura 2.3	A regulação da transdução de sinal da superfamília TGF $\beta$ nos múltiplos níveis.	22
Figura 2.4	Modelo bioquímico da esteroidogênese <i>in vivo</i> .	25
Figura 2.5	Atividade esteroidogênica das células da granulosa e da teca, correspondentes aos hormônios gonadotróficos, FSH e LH no folículo ovariano”.	26

### Capítulo 2

Figura 4.1	Representação esquemática do mapa físico do vetor pGEM® - T Easy.	56
Figura 4.2	Representação esquemática do mapa físico do vetor pCI - Neo.	58
Figura 4.3	Perfil de digestão do DNA plasmidial do clone <i>BMP15</i> .	58
Figura 4.4	Representação esquemática da transfecção das réplicas para avaliação do efeito do <i>GDF9</i> e <i>BMP15</i> na luteinização.	64
Figura 5.1	Células da granulosa (A) e MDBK (B) transfectadas com o plasmídeo pCMV $\beta$ - gal.	69
Figura 5.2	Expressão do gene Neo, com 471 pb em células da granulosa e MDBK transfectadas com <i>GDF9</i> e <i>BMP15</i> .	70
Figura 5.3	Expressão do <i>GDF9</i> , com 1372 pb em células da granulosa e MDBK transfectadas.	71
Figura 5.4	Expressão do <i>BMP15</i> , com 1185 pb em células da granulosa e MDBK transfectadas.	71
Figura 5.5	A: Expressão de proteínas <i>GDF9</i> pelas células da granulosa B: Expressão de proteínas <i>GDF9</i> pelas células MDBK.	72

Figura 5.6	Expressão de proteínas <i>BMP15</i> pelas células MDBK.	73
Figura 5.7	Expressão do gene <i>CYP17</i> para confirmação da identidade das células da granulosa.	75
Figura 5.8	Expressão do mRNA do gene <i>GDF9</i> para confirmação da transgenia das células da granulosa.	76
Figura 5.9	4 Expressão do mRNA do gene <i>BMP15</i> para confirmação da transgenia das células da granulosa.	76
Figura 5.10	Expressão do receptor do tipo II comum ao <i>GDF9</i> e <i>BMP15</i> , <i>BMPRII</i> , com 118 pb nas células da granulosa.	77
Figura 5.11	Expressão do receptor tipo I específico ao <i>GDF9</i> , <i>ALK5</i> , com 152 pb nas células da granulosa.	77
Figura 5.12	Expressão do receptor tipo I específico ao <i>BMP15</i> , <i>ALK6</i> , com 172 pb nas células da granulosa.	78
Figura 5.13	Dosagem acumulativa de progesterona em meios de cultura durante 5 dias. Réplica 1.	80
Figura 5.14	Dosagem acumulativa de progesterona em meios de cultura durante 6 dias. Réplica 2.	80
Figura 5.15	Dosagem não acumulativa de progesterona em meios de cultura durante 21 dias. Réplica 1.	81
Figura 5.16	Dosagem não acumulativa de progesterona em meios de cultura durante 21 dias. Réplica 2.	81
Figura 5.17	Expressão do gene <i>StAR</i> , com 135 pb nas células da granulosa.	86
Figura 5.18	Expressão do gene <i>StAR</i> por meio de PCR em tempo real (qPCR)	87

**LISTA DE TABELAS****Capítulo 1**

Tabela 1.1	SNPs descritos nos genes <i>BMP15</i> , <i>GDF9</i> e sua respectiva localização	17
Tabela 1.2	Denominação das enzimas esteroideogênicas	24

**Capítulo 2**

Tabela 4.1	Seqüência dos <i>primers</i> GAPDH, <i>GDF9</i> e <i>BMP15</i> específicos bovinos ( <i>Bos taurus</i> )	55
Tabela 4.2	Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho do <i>amplicon</i> em pares de bases (pb) e temperatura de anelamento	60
Tabela 4.3	Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho do <i>amplicon</i> em pares de bases (pb) e temperatura de anelamento	65

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ALK5**- receptor serina/treonina *kinase* tipo I específico do *GDF9*  
**ALK6**- receptor serina/treonina *kinase* tipo I específico do *BMP15*  
**BCIP**- -bromo - 4 - cloro-indolil fosfato  
**BMP**- proteína morfogenética óssea  
**BMP15**- proteína morfogenética óssea 15  
**BMPRII**- receptor tipo II da subfamília *BMP*, comum ao *GDF9* e *BMP15*  
**COX2**- cicloxigenase 2  
**CYP11A1** - citocromo P450 colesterol *side-chain cleavage*  
**CYP17**- enzima 17 $\alpha$  hidroxilase  
**DMEM**- meio Dulbecco com sais de Eagle modificado  
**dNTP**- desoxirribonucleotídeo trifosfato  
**E<sub>2</sub>**- estrógeno  
**EGF**- fator de crescimento epidermal  
**FSH**- hormônio folículo estimulante  
**GAPDH**- glyceraldehyde 3 - phosphate dehydrogenase  
**GDF9**- fator de crescimento e diferenciação 9  
**GCNF**-fator nuclear das células germinativas  
**GnRH**- hormônio liberador de gonadotrofinas  
**HAS2**- hialurona sintetase 2  
**IGF-I**- fator de crescimento semelhante a insulina-I  
**LB**- Lúria Bertani  
**LH**- hormônio luteinizante  
**MDBK**- Madin - Darby Bovine Kidney Cells  
**mRNA**- ácido ribonucleico mensageiro  
**NBT**- Nitro Blue Tetrazole  
**ORF**- quadro de leitura aberta para tradução  
**PBS**- solução salina em tampão fosfato  
**PCR**- reação em cadeia da polimerase  
**P450arom**- enzima P450 aromatase  
**pb** - pares de base  
**P<sub>4</sub>**- progesterona  
**RIA**- raioimunoensaio  
**RT**- transcrição reversa  
**RT-PCR**- reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia pela polimerase  
**SDS**- Sódio Dodecil Sulfato  
**SDS-PAGE**- eletroforese em gel de poliácridamida desnaturante (com SDS)  
**SFB**- Soro Fetal Bovino  
**SNP**- polimorfismo único de nucleotídeo  
**STAR**- proteína regulatória aguda da esteroidogênese  
**TEMED**- N, N, N', N' – tetrametil etilenodimetilamina  
**TGF $\beta$** - fator de crescimento transformador  $\beta$   
**X-gal**- 5-bromo – 4 – cloro – 3 – indolil –  $\beta$  - Dgalactopiranosídeo  
**3 $\beta$ -HSD**- enzima 3 $\beta$  - hidroxiesteroide desidrogenase  
**17 $\beta$ -HSD**- enzima 17 $\beta$  - hidroxiesteroide desidrogenase

## RESUMO

### **EXPRESSÃO DO *GROWTH AND DIFFERENTIATION FACTOR 9 (GDF9)* E *BONE MORPHOGENETIC PROTEIN 15(BMP15)* IN VITRO E SEU EFEITO NO PROCESSO DE LUTEINIZAÇÃO EM CÉLULAS DA GRANULOSA BOVINAS**

Fernanda Paulini<sup>1</sup>, Eduardo de Oliveira Melo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Agronomia e Veterinária - UnB, Brasília, DF, <sup>2</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

Os sistemas de cultivo de células da granulosa vêm se desenvolvendo com o intuito de assemelhar-se às condições esteroidogênicas encontradas *in vivo* no folículo ovariano. A remoção do ovócito resulta na luteinização espontânea das células somáticas foliculares, com alteração no padrão esteroidogênico, que também acontece quando estas células são colocadas em cultivo. Os fatores secretados pelo ovócito *GDF9* e *BMP15* possuem uma atuação importante, entretanto, ainda não totalmente esclarecida durante o processo de luteinização das células da granulosa. Com este trabalho objetivou-se expressar os genes *GDF9* e *BMP15* em cultivo de células da granulosa bovinas transgênicas e avaliar seus efeitos no processo de luteinização. Para a análise da luteinização, foram utilizados cultivo de células da granulosa transfectadas por lipossomos com vetores portando os genes *GDF9* e *BMP15*, com coleta de meio e células obtidas diariamente durante 21 dias para dosagens de hormônios esteróides e análise da expressão gênica. Como marcador do processo de luteinização foi utilizado o gene *Star*. A partir do mRNA das células foi possível verificar a expressão do *GDF9*, *BMP15* e de seus respectivos receptores (*ALK5*, *ALK6* e *BMPRII*). A

análise da atividade esteroidogênica das células transgênicas demonstrou que a presença de *GDF9* e *BMP15* exerce inibição na produção do hormônio progesterona. O gene *StAR*, principal fator limitante da esteroidogênese, foi inibido após o pico de produção de progesterona, o que indicou uma provável atuação do *GDF9* e *BMP15* por meio desta via. Esse estudo aborda novas informações, que contribuem para o entendimento dos mecanismos moleculares e parácrinos pelos quais o ovócito é capaz de inibir a luteinização das células da granulosa, antes do início dos processos de maturação ovocitária e ovulação iniciados pelo pico de LH.

Palavras chave: células transgênicas, superfamília TGF $\beta$ , foliculogênese, reprodução animal

**ABSTRACT****EXPRESSION OF *GROWTH AND DIFFERENTIATION FACTOR 9 (GDF9)* AND *BONE MORPHOGENETIC PROTEIN 15(BMP15)* AND THEIR EFFECT ON *IN VITRO* LUTEINIZATION OF BOVINE GRANULOSA CELLS**

Fernanda Paulini<sup>1</sup>, Eduardo de Oliveira Melo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>School of Agronomy and Veterinary Medicine - UnB, Brasília, DF, <sup>2</sup>Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasília, DF

Granulosa cell culture is carried out to establish a similar steroidogenesis environment found in ovarian follicles. Somatic follicular cells spontaneously luteinize and modify their steroidogenesis activity when the oocyte is removed in the same way it happens *in vivo*. The *GDF9* and *BMP15* are oocyte secreted factors that have an important role on the luteinization of granulosa cells, but their effects are not totally understood. With the culture of transgenic bovine granulosa cells this work aimed to express the genes *GDF9* and *BMP15* and evaluate their effects on the luteinization process. Samples of cells and culture medium were obtained during 21 consecutive days to analyze the steroidogenic hormones concentration and gene expression. To confirm the expression of *GDF9*, *BMP15* and their respective receptors (*ALK5*, *ALK6* e *BMPRII*) the cDNA were amplified by PCR. The analysis of steroidogenic activity of transgenic cells demonstrated that the presence of *GDF9* e *BMP15* inhibits the production of progesterone and *Star* gene expression. The *Star* gene is the most limiting factor of steroidogenesis, and was used as a molecular marker of the luteinization process. This indicates that the inhibitory effect of *GDF9* and *BMP15* on the steroidogenesis use the

*STAR* pathway. This study shed light in the molecular and paracrine mechanisms, by which the oocyte can inhibit the luteinization of granulosa cells before the induction of maturation and ovulation by the LH peak.

Keywords: transgenic cells, TGF $\beta$  superfamily, folliculogenesis, animal reproduction

## **CAPÍTULO 1**

## 1 INTRODUÇÃO

Estudos com cultivo *in vitro* de células da granulosa indicam que a remoção do ovócito do folículo ovariano resulta na luteinização espontânea destas células, alterando seu padrão esteroidogênico (Lanuza et al, 1998; Tsafirri & Pomerantz, 1984). Tais eventos ocorrem pela perda da sinalização entre ovócito e as células da granulosa.

Um dos fatores que determina o decréscimo da produção de estradiol e o incremento de progesterona, à medida que ocorre a luteinização, é o tempo de cultivo das células da granulosa (Luck et al., 1990; Hirshfield, 1991; Gong et al., 1994; Vernon & Spicer, 1994). Neste processo de luteinização existe um padrão de diferenciação celular que indica que o sistema de cultivo é apropriado para o estudo destas células (Gutiérrez et al., 1997).

As células da granulosa sofrem ações endócrinas durante o processo de desenvolvimento folicular, que estão bem caracterizadas. Entretanto, fatores de sinalização intraovarianos, envolvidos com o desenvolvimento e diferenciação do folículo, ainda não estão completamente elucidados (Roberts & Echaternkamp, 1994; Gutiérrez et al., 1997). Estudos recentes sobre a comunicação intrafolicular entre as células germinativas e células somáticas revelaram a secreção de fatores pelo ovócito, capazes de atuar diretamente nos processos coordenados de maturação folicular através de uma sinalização parácrina (Li et al., 2008b).

Dentre os fatores secretados pelo ovócito, se destacam os membros da superfamília TGF $\beta$  e dentre estes, o *GDF9* (*Growth and Differentiation Factor 9*) e *BMP15* (*Bone Morphogenetic Protein 15*), que são expressos em todos os estágios do desenvolvimento folicular na espécie bovina (Juengel & McNatty, 2005). Esses fatores são fundamentais para ativação dos folículos primordiais e posterior desenvolvimento e diferenciação folicular. Além disso, estão envolvidos nas etapas finais do processo de

maturação e nos eventos que antecedem a ovulação como, por exemplo, a expansão das células do *cumulus oophorus* (Dong et al., 1996; Hanrahan et al., 2004; Yoshino et al., 2006).

Os fatores secretados pelo ovócito mediam a proliferação celular e a esteroidogênese, sendo indicados como inibidores ativos da luteinização. A presença do *GDF9* e *BMP15* inibe a produção de hormônios esteróides e incrementa a propagação celular (Scaramuzzi et al., 1993). O aumento da síntese de progesterona associado com a transição do estágio gonadotrofina-responsivo para o estágio gonadotrofina-dependente *in vivo*, indica a tendência das células da granulosa de ruminantes em se luteinizar (Campbell, 1988; 1996). Portanto, o bloqueio da luteinização das células somáticas do folículo parece ser exercido de forma ativa por fatores parácrinos secretados pelo ovócito durante todo curso da foliculogênese. Atualmente, parte desses fatores estão sendo descritos e suas identidades conhecidas, embora muitos estudos ainda tornam-se necessários para se ter um painel mais claro de como o desenvolvimento folicular é regulado ao nível parácrino.

## 1.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi expressar os genes *GDF9* e *BMP15* *in vitro* e avaliar seus efeitos no processo de luteinização em células da granulosa bovinas.

## 1.2 Objetivos Específicos

- a) Clonar o *GDF9* e *BMP15* em vetores de expressão;
- b) Estabelecer linhagens de células bovinas transgênicas;
- c) Avaliar a expressão do *GDF9* e *BMP15* e seus respectivos receptores;
- d) Avaliar o processo de esteroidogênese.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Desenvolvimento folicular

Os folículos são unidades morfofuncionais do ovário, constituídos por um ovócito circundado de células somáticas. São classificados de acordo com o estágio de progressão, em folículos pré-antrais não cavitários, que constituem aproximadamente 95% de toda população folicular, e em folículos antrais cavitários (Figueiredo et al., 2007).

A ovogênese e a foliculogênese são processos coordenados que iniciam-se durante a vida fetal, quando as células germinativas se diferenciam em ovogônias e se proliferam através de mitoses, para em seguida entrar em meiose e se tornar um ovócito primário, que é retido no estágio de prófase I da meiose (Austin & Short, 1982). Antes do início da puberdade, a maioria dos folículos primordiais em crescimento degeneram devido às baixas concentrações de hormônios hipofisários, que faz com que estes folículos não tenham estímulo necessário para a ovulação. No início da puberdade, por ação hormonal, há a retomada e finalização da meiose I (Skinner 2005, Hutt et al. 2006).

Os folículos podem ser classificados em três estágios de desenvolvimento de acordo com seu tamanho e dependência em relação aos hormônios gonadotrofinas. O primeiro estágio é independente de gonadotrofinas, no qual há a ativação dos folículos primordiais circundados apenas por uma camada de células achatadas, que são precursoras da granulosa. Após a ativação os folículos primordiais se diferenciam em folículos primários, quando a células precursoras da granulosa assumem uma morfologia cuboidal. Na última etapa do primeiro estágio, a camada única de células cuboidais entra em divisão e diferenciação, formando várias camadas de células da granulosa e o folículo passa a ser denominado de

secundário (Braw-Tal, 2002). O segundo estágio é responsivo, mas não dependente de gonadotrofinas, nele ocorre a transição de folículos secundários (pré-antrais) para o estágio antral e há um incremento no número de células da granulosa e no tamanho dos ovócitos. Aqui há uma atuação intensa dos fatores de crescimento protéicos de ação parácrina da superfamília de fatores de crescimento transformadores  $\beta$  (TGF $\beta$ ), envolvidos diretamente com a proliferação das células somáticas. As células originadas da camada folicular de células da granulosa diferenciam-se em dois tipos: células do *cumulus* e células da granulosa murais, sendo que o desenvolvimento do ovócito e células somáticas são regulados de maneira recíproca (Gillot et al., 2008). No terceiro estágio há dependência de gonadotrofinas, os folículos continuam a crescer após a formação do antro até o recrutamento, seleção, maturação e ovulação (Cattanach et al., 1977; Kumar et al., 1997; McGee & Hsueh, 2000).

O folículo antral é caracterizado pela formação de multicamadas de células da granulosa e pela sua diferenciação. Essas células diferenciadas secretam um fluido, denominado de fluido folicular, que culmina com a formação de um espaço intersticial nomeado de antro. O fluido folicular é repleto de substâncias derivadas do sangue ou secreção de células foliculares como gonadotrofinas, esteróides e fatores de crescimento protéicos (Van der Hurk & Zhao, 2005).

A foliculogênese e a ovogênese são processos coordenados por sinais endócrinos, parácrinos e substâncias que trafegam entre as células do cumulus e o ovócito pelas junções intercomunicantes. O ovócito possui papel essencial na sinalização das células da granulosa foliculares, pela secreção de fatores que atuam nas células somáticas, e estimulam o crescimento do ovócito, resultando em ovócitos maduros e competentes para a fertilização e desenvolvimento embrionário (Hickey et al., 2005; Figueiredo et al., 2007). Através destes sinais, o desenvolvimento é regulado pelas células da granulosa e do *cumulus* de maneira que nenhum folículo seja formado sem um ovócito. A secreção desses fatores induz a formação de folículos primordiais, conduz a proliferação das células somáticas, regula a esteroidogênese e mantém a arquitetura no desenvolvimento do folículo (Amleh & Dean, 2002).

### 2.1.1 Interação entre ovócito, células do *cumulus oophorus*, granulosa e teca

Com o crescimento folicular e a formação do antro, as células da granulosa são separadas em tipos anatômicos e funcionalmente distintos: as células do *cumulus*, que são íntimas e possuem contato metabólico com o ovócito, e as células da granulosa murais, que são a linhagem celular da parede do folículo e formam um epitélio estratificado com a lâmina basal. Este epitélio é circundado pelas células mesenquimais que irão desenvolver-se em teca interna e teca externa após a transição dos folículos para o estágio secundário (Erickson et al., 1985; revisado por Eppig et al., 1997).

Nas células especializadas do *cumulus* há projeções citoplasmáticas que penetram na membrana do ovócito através da zona pelúcida, formando o complexo *cumulus oophorus* (Albertini et al., 2001). As junções intercomunicantes permitem a transferência de moléculas de pequeno peso molecular entre as células do *cumulus* e o ovócito, enquanto que moléculas grandes são transportadas por endocitose mediada por receptores. Este modo de comunicação bidirecional entre células germinativas e somáticas é essencial para o desenvolvimento, maturação e disseminação de sinais endócrinos e parácrinos que atuarão no ovócito e nas células do *cumulus* (Figura 2.1) (Vanderhyden et al., 1992; Simon et al., 1997; Daikoku & Dey, 2008; Orisaka et al., 2009).

Durante muito tempo o controle da foliculogênese foi atribuído aos fatores endócrinos, através de mecanismos mediados pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal com ação direta no sistema reprodutivo. Tal controle é exercido pelas ações tecido-específicas de hormônios protéicos e esteróides, fatores de crescimento, citocinas e prostanóides. A biologia do ciclo estral bovino foi descrita exaustivamente em uma série de artigos científicos e livros texto específicos (Roche et al., 1998; Wiltbank et al., 2002; Binelli et al., 2006; Moore & Thatcher, 2006). Nesta visão, os eventos que ocorrem durante o ciclo estral são regulados basicamente pela interação dos hormônios liberador de gonadotrofinas (GnRH), folículo estimulante (FSH), luteinizante (LH), estradiol (E<sub>2</sub>) e progesterona (P<sub>4</sub>) (Hafez & Hafez, 2004). O GnRH é produzido pelo hipotálamo e regula a liberação das gonadotrofinas. O FSH e o LH são produzidos pela glândula hipófise anterior e são responsáveis pelo desenvolvimento folicular e ovulação (Valle & Dode, 1991; Hafez & Hafez, 2004).

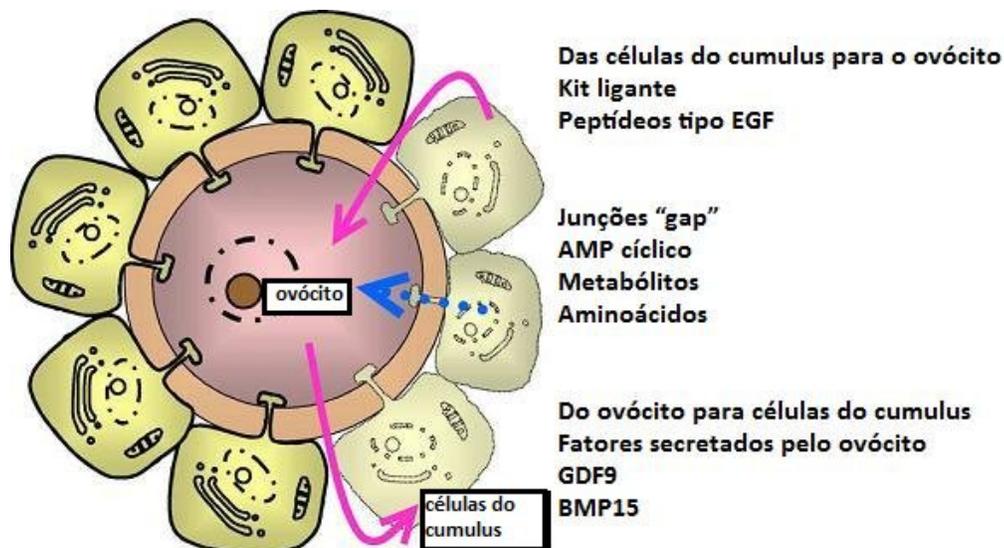


Figura 2.1 - Comunicação entre ovócito e células da granulosa para crescimento e desenvolvimento ovocitário e folicular. Sinalização parácrina (rosa); junções "gap" com troca de pequenas moléculas regulatórias (azul) (Adaptado de Sutton et al., 2003).

Entretanto, desde que as ações dos hormônios secretados pelo hipotálamo (GnRH) e hipófise anterior (FSH e LH) foram bem caracterizadas, surgiram novas pesquisas com foco na regulação de proteínas sinalizadoras dentro dos ovários, que possuem ações no desenvolvimento folicular através de interações estabelecidas entre as células da granulosa e fatores secretados pelo ovócito (Richards, 1994; Knight & Glister, 2001; Cortvrindt & Smitz, 2002; Webb et al., 2003).

Os fatores secretados pelo ovócito regulam a foliculogênese pela modulação do crescimento e diferenciação celular, possuem ação mitogênica e interagem com hormônios que regulam as células somáticas, como o FSH, o fator de crescimento semelhante à insulina - I (IGF-I) e andrógenos (Armstrong et al., 1996; Lanuza et al., 1998; Li et al., 2000; Hickey et al., 2004). Apesar dos processos celulares e moleculares envolvidos nessas interações serem pouco esclarecidos, é evidente que a comunicação entre o ovócito e as células somáticas ocorre por sinalização parácrina intermediada pelos fatores secretados pelo ovócito (Hsueh et al., 1984; Dong et al., 1996; McNatty et al., 2004).

### 2.1.2 Maturação ovocitária

A retirada do complexo ovócito-*cumulus oophorus* do ambiente folicular e seu cultivo *in vitro* ocasionam a maturação ovocitária pela interrupção do contato com as células da granulosa murais do folículo (Pincus & Enzmann, 1935; Downs, 1993; Byskov et al., 1997).

Acredita-se que, o reinício da meiose ocorre quando o citoplasma do ovócito está completamente maduro, o que promove a descondensação da cromatina e desaparecimento da membrana nuclear, fazendo com que a maturação nuclear, que estava bloqueada na prófase I da meiose, progrida até a metáfase II, no qual é bloqueada novamente e só será retomada após a fecundação (Edwards, 1965; Kubelka et al., 1988; Cha et al., 2000). A competência meiótica ou ovocitária é a habilidade do ovócito de completar a meiose que é adquirida durante a foliculogênese. Ovócitos sofrem maturação nuclear, citoplasmática e molecular, nos quais mudanças como o rearranjo de organelas e síntese de proteínas e RNA mensageiro (mRNA) são cruciais para fertilização e posterior desenvolvimento embrionário (Wu et al., 1996; Fair et al., 1997). A competência citoplasmática é definida como o evento que prepara o ovócito para a fertilização e posterior desenvolvimento, como a habilidade do ovócito em liberar íons cálcio e a redistribuição das organelas para o desenvolvimento embrionário inicial (Eppig et al., 1998; Eichenlaub-Ritter & Peschke, 2002; Ducibella et al., 2006).

O ovócito induz, através de sinalizadores protéicos, a expressão de genes associados às células do *cumulus*, que por sua vez, atuarão novamente sobre o ovócito estimulando seu crescimento e auxiliando na sua posterior maturação, num sistema de *feed-back* positivo. A expansão do complexo *cumulus oophorus* facilita a maturação, a liberação do ovócito para a cavidade abdominal, a captura do ovócito pelas fimbrias do oviduto e a penetração do espermatozóide (Fulop et al., 2003).

Durante a técnica de maturação *in vitro*, a ausência de fatores parácrinos secretados pelas células foliculares e ovócito, tem influência negativa sobre o processo de maturação nuclear. Portanto, a maturação *in vitro* pode ser um modelo adequado para testar moléculas candidatas (proteínas, hormônios, esteróides, etc.) à melhoria da maturação ovocitária (Romero & Smitz, 2008).

A identidade dos fatores parácrinos secretados pelo ovócito que regulam a função das células da granulosa está sendo cada dia mais esclarecida. Dentre eles, o *GDF9* e a

proteína morfogenética óssea 15 (*BMP15*) vêm-se mostrando fundamentais para o desenvolvimento, diferenciação folicular e também para maturação do ovócito e ovulação. A atuação do *GDF9* e *BMP15* nesses processos é evidenciada por defeitos reprodutivos em animais com mutações nesses genes (revisado por McNatty et al., 2004) e pela habilidade das formas recombinantes em imitar a ação do ovócito nas células da granulosa e do *cumulus in vitro* (revisado por Gilchrist et al., 2004).

## 2.2 Superfamília dos Fatores de Crescimento Transformadores $\beta$ - TGF $\beta$

A superfamília TGF $\beta$  possui genes descritos em diversas espécies de animais vertebrados e é dividida em duas ramificações, de acordo com a origem e estrutura genética (Hogan, 1996; Massagué, 1998). Embora exista diversidade entre as ramificações BMP e TGF $\beta$ , há efeitos de complementariedade (Massagué, 1998; Chang et al., 2002). O envolvimento dos membros desta superfamília na regulação ovariana, diferenciação celular e fertilidade têm impulsionado inúmeras pesquisas (Massagué et al., 1997; Lau & Matzuk, 1999; Juengel & McNatty, 2005).

A estrutura molecular dos membros da superfamília TGF $\beta$  é tridimensional, com dois filamentos e uma hélice que é estabilizada com três pontes de dissulfeto intra e intermolecular. Diferentes da maioria dos membros desta superfamília, que possui 7 cisteínas, o *GDF9* e *BMP15* possuem apenas 6, que juntas formam um “nó de cisteína” (Daopin et al., 1992; Schlunegger & Grutter, 1992; Hogan, 1996; Massagué, 1998; Shimasaki et al., 2004).

A estrutura gênica da subfamília BMP (onde se encontram o *GDF9* e *BMP15*) se assemelha à superfamília TGF $\beta$ . O *GDF9* e *BMP15* têm dois exons separados por um único intron, que codificam proteínas compostas de um peptídeo sinal, uma pró-região e um peptídeo maduro. A região do peptídeo sinal é codificada pelo primeiro exon, o pré-peptídeo é codificado pelo primeiro e segundo exon e a região madura pelo segundo exon (Massagué et al., 1994; Dube et al., 1998; McGrath et al., 1995). No *GDF9* e *BMP15* a região madura interage com ela mesma, constituindo homodímeros, ou com regiões maduras de outros membros da superfamília, formando heterodímeros. Por não possuírem a sétima cisteína, o *GDF9* e *BMP15* não estão aptos a fazer ligações colaventes entre seus dímeros, que são

unidos de maneira mais dinâmica, por ligações eletrostáticas e hidrofóbicas (Wang et al., 1990; Jones et al., 1994; Chang et al., 2002).

A expressão gênica ocorre quando o mRNA é transcrito a partir da molécula de DNA, para em seguida ser traduzido em proteína. Os fatores TGF $\beta$  são sintetizados para dentro do retículo endoplasmático rugoso como precursores pré-peptídicos, formados pela pró-região e o domínio bioativo maduro (Chang et al., 2002). O processamento pós-traducional conduz à liberação de moléculas bioativas, no qual é removido o peptídeo sinal, ocorrem dimerização e clivagem proteolítica específica no sítio conservado para remoção da pró-região, glicosilação e liberação do fator ativo para o exterior da célula, o que pode ser observado na Figura 2.2 (Gentry et al., 1988; Schultz-Cherry et al., 1994; Saharinen et al., 1999; Chang et al., 2002; Liao et al., 2003).

A sequência de aminoácidos do *GDF9* contém quatro sítios ligados à glicosilação, um deles situado na região madura, enquanto que o *BMP15* é composto por cinco sítios de glicosilação, dois situados na região madura (McPherron & Lee, 1993; Massagué et al., 1994; McGrath et al., 1995; Dube et al., 1998).

Estudos *in vitro* realizados com *GDF9* e *BMP15* demonstram que as glicosilações são fundamentais para o reconhecimento dos fatores pelos seus receptores e, conseqüentemente, para sua bioatividade. Portanto, sistemas de clonagem e expressão do *GDF9* e *BMP15* em bactérias são incapazes de produzir esses fatores com atividade biológica, pelo fato de bactérias não possuírem a maquinaria celular para o processamento pós-traducional e glicosilação, o que não permite a formação de dímeros que darão origem aos hormônios ativos (Shimasaki et al., 2004).

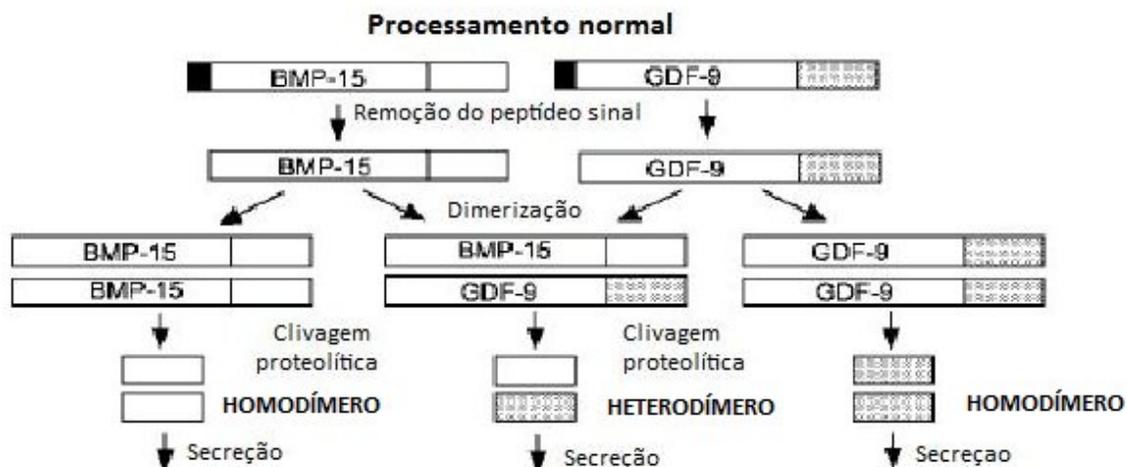


Figura 2.2 - Processamento da secreção do *GDF9* e *BMP15*, com formação de homodímeros e heterodímeros (Adaptado de Shimasaki et al., 2004).

### 2.2.1 Proteínas Morfogênicas Óssea - BMPs

A denominação proteína morfogenética óssea (BMP) foi primeiramente utilizada em 1965 para componentes ativos da desmineralização óssea, e foi classificada na superfamília  $TGF\beta$  em 1986 (Urist, 1965; Urist et al., 1973; Wozney et al., 1988). A presença de um sistema funcional dos BMPs nos ovários mamíferos foi observada posteriormente por Shimasaki e colaboradores (1999). Atualmente, dentro da subfamília BMP são conhecidos 12 diferentes BMPs e 8 GDFs (Lehmann et al., 2003).

Muitas das proteínas desta subfamília são expressas pelos ovócitos, células da granulosa e da teca, e funcionam como reguladores intraovarianos da ativação dos folículos primordiais, proliferação das células somáticas do folículo, esteroidogênese e maturação ovocitária (revisado por Drummond et al., 2002; Souza et al., 2002; Knight & Glister, 2003).

O mRNA do *BMP6*, *GDF9* e *BMP15* foram encontrados em ovócitos de diversas espécies. Nas células da granulosa foi observada a expressão do mRNA do *BMP2* e *BMP6*, e nas células da teca, foram detectados *BMP3b*, *BMP4*, *BMP6* e *BMP7*, o que indica que todos esses fatores participam da comunicação bidirecional entre as células somáticas foliculares e o ovócito (Lyons et al., 1989; Hino et al., 1996; Jaatinen et al., 1996; Takao et al., 1996; Dube et al., 1998; Shimasaki et al., 1999; Erickson & Shimasaki, 2003).

### 2.2.2 Fator de Crescimento e Diferenciação 9 - *GDF9*

O *GDF9* foi detectado no cromossomo 5 em ovinos e é expresso exclusivamente pelos ovócitos (McPherron & Lee 1993). Este fator foi relacionado por sua similaridade ao *BMP15*, sendo um membro da subfamília *BMP* (McGrath et al., 1995; Newfeld et al., 1999; Sadighi et al., 2002; Vitt et al., 2002).

O maior número de investigações acerca deste gene ocorreu com a descoberta de que a deleção do *GDF9* causou um bloqueio no desenvolvimento de folículos pré-antrais e consequentemente a infertilidade de camundongos (Dong et al., 1996). Em 2004, Mazerbourg e colaboradores descobriram que o *GDF9* está envolvido no recrutamento inicial e na progressão de folículos primordiais até o estágio pré-antral. Deste modo, o *GDF9* é um fator de crescimento e diferenciação celular, que atua nas células somáticas do folículo de maneira parácrina estimulando mudanças na morfologia, expressão gênica e produção de esteróides. É um fator necessário para o microambiente ótimo ovocitário, no crescimento e na atresia dos folículos ovarianos, para a ovulação, fertilização e reprodução da fêmea (Elvin et al., 1999; Hayashi et al., 1999; Orisaka et al., 2006). O *GDF9* aumenta a expressão dos genes hialurona sintase 2 (*HAS2*), ciclooxigenase 2 (*COX2*), prostaglandinas e gremilina, que são fatores produzidos pelas células do *cumulus*, com funções cruciais para sua expansão que ocorre durante a maturação e ovulação (Buccione et al., 1990; Elvin et al., 1999; Dragovic et al., 2005; Pangas & Matzuk, 2005).

Em ovócitos de ovinos, bovinos e suínos, há baixa expressão de mRNA do *GDF9* no estágio de folículo primordial; em camundongos e humanos os níveis desta expressão encontram-se altos em folículos primordiais (McGrath et al., 1995; Fitzpatrick et al., 1998; Aaltonen et al., 1999).

Comparações na sequência madura dos aminoácidos entre humanos e ratos indicam que a proteína *GDF9* é altamente conservada, com 77% de homologia entre ovinos e humanos e 66% entre ovinos e camundongos, o que ressalta a importância deste gene para a reprodução (Bodensteiner et al., 1999; Hayashi et al., 1999).

### 2.2.2.1 Participação na expansão das células do *cumulus*

Os fatores que permitem a expansão do complexo *cumulus oophorus* são essenciais para a ovulação, embora desconhecidos (Fulop et al., 2003). Acredita-se que neste processo há demanda por fatores secretados pelo ovócito, sendo o *GDF9* um forte candidato (Downs, 1989; Buccione et al., 1990; Salustri et al., 1990; Vanderhyden et al., 2003).

Estudos indicam que o *GDF9* recombinante é capaz de mimetizar as ações parácrinas do ovócito e permitir a expansão das células do *cumulus* em camundongos. Na expansão das células do *cumulus* ocorre a formação de uma matriz extracelular que circunda o ovócito, cujo principal componente estrutural é a hialurona sintetase 2 (Elvin et al., 1999). A expressão desta enzima é baixa quando há inativação do *GDF9*, e mesmo com outros fatores envolvidos, isso comprova a participação deste fator na expansão (Su et al., 2004; Dragovic et al., 2005).

Vanderhyden et al. (2003) apontaram que ovócitos de camundongos com o gene *GDF9* inativado têm deficiência em promover a expansão do complexo *cumulus oophorus*. Gui & Joyce (2005) através da inativação da expressão do *GDF9* por RNA interferente introduzido no ovócito, eliminaram a expansão das células do *cumulus* e concluíram que o *GDF9* em camundongos é o único fator permissivo para a expansão. Entretanto, outros trabalhos sugerem que não apenas o *GDF9* está envolvido na regulação da expansão do *cumulus* (Dragovic et al., 2007). Em estudos com desligamento da expressão do *GDF9*, os ovócitos apresentaram desenvolvimento e disposição anormal das organelas e ausência de apoptose das células da granulosa (Carabatsos et al., 1998; Shimasaki et al., 2004). Em outros estudos de inativação do *GDF9*, a foliculogênese foi interrompida no estágio primário, conseqüentemente, não houve a formação de folículos de *Graaf*, ovulações e prenhez (Dong et al., 1996; Elvin et al., 1999). O *GDF9* e o *BMP15* possuem papéis críticos, que podem interferir na função, crescimento e formação das células da granulosa e teca durante o desenvolvimento folicular (Elvin et al., 2000; Vitt & Hsueh, 2001; Wu & Matzuk, 2002).

### 2.2.3 Proteína Morfogenética Óssea 15 - *BMP15*

Além do *GDF9*, em 1998, outro fator de crescimento específico do ovócito foi descrito. Homólogo ao *GDF9*, encontrado em ovócitos de folículos primários de ovelhas, humanos, camundongos, ratos e em folículos primordiais de hamsters, o novo membro da superfamília TGF $\beta$  foi denominado de *BMP15* ou *GDF9B* (Dube et al., 1998; Laitinen et al., 1998; Aaltonen et al., 1999; Jaatinen et al., 1999; Galloway et al., 2000; Eckery et al., 2002).

Assim como o *GDF9*, mRNA e proteínas do gene *BMP15* são encontrados em ovócitos através de toda foliculogênese, com aumento dos níveis de expressão em folículos primários até folículos pré-ovulatórios de camundongos e ratos; entretanto a expressão da proteína em camundongos não ocorre até imediatamente o momento da ovulação (McGrath et al., 1995; Dube et al., 1998; Laitinen et al., 1998; Otsuka et al., 2000; Juengel et al., 2002; Wang & Roy, 2004; Yoshino et al., 2006). No entanto, a proteína *BMP15* foi localizada na hipófise, testículos e outros tecidos de algumas espécies, o que sugere que suas ações não sejam exclusivas ao ovário (Fitzpatrick et al., 1998; Aaltonen et al., 1999; Eckery et al., 2002; Otsuka & Shimasaki, 2002).

Assim como no *GDF9*, a expressão de mRNA *BMP15* não foi observada nos ovócitos antes da formação do folículo, sendo detectados apenas em folículos em crescimento, que indica a função destes fatores na regulação do desenvolvimento folicular de mamíferos (Dube et al., 1998; Laitinen et al., 1998; Juengel & McNatty, 2005). As proteínas *BMP15* são liberadas do ovócito para a matriz extracelular do *cumulus oophorus*, o que constitui uma evidência adicional para o envolvimento do gene *BMP15* neste processo (Guéripel et al., 2006).

O *BMP15* tem como alvo as células da granulosa. Além disso, o estímulo da proliferação dessas células e a regulação diferencial dos hormônios esteróides são apontados como sua primeira função biológica. Assim, o *BMP15* é considerado o primeiro fator de crescimento que pode coordenar a proliferação das células da granulosa e diferenciação da fisiologia reprodutiva normal (Otsuka et al., 2000). A expressão de mRNA e proteínas do *BMP15* é aumentada no momento da expansão do *cumulus*, por isso é possível que o aumento de *BMP15* possa interagir com o *GDF9* e regular a expansão dessas células (Li et al., 2008a;b).

Experimentos *in vitro* indicam que o efeito fisiológico do *GDF9* e *BMP15* depende da espécie de origem dos fatores de crescimento, visto que a fisiologia reprodutiva

entre as espécies é muito variável (McNatty et al., 2005a; b). Entretanto, estudos demonstram que o *GDF9* e o *BMP15* são essenciais para o desenvolvimento folicular das espécies estudadas e mutações nestes genes estão relacionadas à infertilidade, o que têm despertado atenção especial no meio científico (Elvin et al., 2000; McNatty et al., 2003; Di Pasquale et al., 2004; Shimasaki et al., 2004).

### 2.2.3.1 Participação do gene *BMP15* na foliculogênese

A proteína *BMP15* sofre glicosilação em vários sítios aceptores, como no aminoácido N-terminal (ácido piroglutâmico), sítio O-terminal e C-terminal (Saito et al., 2008) após a etapa de tradução. O processamento pós-traducional inadequado, também denominado de processo de maturação, pode gerar aberrações com conseqüências diretas na fisiologia reprodutiva da fêmea. Estas anormalidades fornecem evidências moleculares das interações intracelulares entre *BMP15* e *GDF9* (Hashimoto et al., 2005).

Células humanas (293T) e de hamsters (CHO) transfectadas com *BMP15* de camundongos, ao expressar a proteína são incapazes de secretar o *BMP15*. Entretanto, a proteína do *BMP15* de camundongos é produzida na presença da pró-região do *BMP15* humano, mas quando ocorre o oposto, a pró-região de camundongo fusionada com a região madura do *BMP15* humano, a secreção da proteína *BMP15* é diminuída (Hashimoto et al., 2005). Acredita-se que o heterodímero *GDF9/BMP15* secretado seja importante para a atividade estimulatória de mitogênese das células somáticas do folículo promovida pelo ovócito, o que é alcançado pela sinalização através dos mesmos receptores utilizados pelos homodímeros de *GDF9* e *BMP15* (Gilchrist et al., 2006).

Ao contrário do *BMP15*, o *GDF9* recombinante de camundongos produzido em células de hamster (CHO) transfectadas é facilmente processado e secretado como proteína *GDF9* madura (Elvin et al., 1999). De maneira semelhante, o *GDF9* recombinante de humano e ovino também é processado com facilidade (Liao et al., 2003; McNatty et al., 2005a). Assim, pode ser esperado que diferenças entre a estrutura dos genes de camundongos e humanos tenham conseqüências importantes na função do *BMP15* nestas espécies.

Contudo, a inativação do *BMP15* em fêmeas de camundongos provoca somente sub-fertilidade das mesmas, enquanto que fêmeas de camundongos com *GDF9* desligado são inteiramente inférteis, sendo a foliculogênese detida no estágio primordial

(Dong et al., 1996; Yan et al., 2001; Hanrahan et al., 2004). Entretanto, como veremos em maiores detalhes seguir, mutações que desligam a atividade do *BMP15* levam a esterilidade (quando em homozigose) em ovelhas.

A presença do sistema de retroalimentação regulatória entre ovócito, *BMP15*, *GDF9* e kit ligante nas células da granulosa pode ser o mecanismo de manutenção da expressão de níveis apropriados de *BMP15* e *GDF9* no ovócito, requerido para exercer suas funções fisiológicas (Elvin et al., 1999; Joyce et al., 2000; Otsuka & Shimasaki, 2002).

A inativação da expressão do fator nuclear das células germinativas (GCNF) no ovócito de camundongo induz a superexpressão do *GDF9* e *BMP15* e conduz a hipofertilidade da fêmea, com reduzidos tamanhos de ninhada e ciclo estral prolongado (Lan et al., 2003). Assim, a manutenção de níveis precisos de expressão do *BMP15* e *GDF9* nos ovócitos é essencial para a eficiência da fertilidade da fêmea e correto desenvolvimento folicular.

#### **2.2.4 Mutações no *GDF9* e *BMP15***

Polimorfismo é a ocorrência regular e simultânea de dois ou mais genótipos descontínuos em uma única população, o que representa diferentes versões de uma sequência de DNA (alelos) em um determinado local do cromossomo (*locus*). A base para o polimorfismo entre os alelos são as diferentes mutações que podem ocorrer na sequência de DNA ao longo do tempo durante sua replicação (Lewin, 2001).

Os polimorfismos de troca única de nucleotídeo (SNPs) são uma classe de polimorfismos que surgem a partir de mudanças em um único nucleotídeo de uma determinada sequência de DNA. Os SNPs são mais estáveis do que outros marcadores genéticos e ocorrem com alta frequência, sendo a mais comum forma de variação genética (Wang et al., 1998). Podem ser identificados em regiões codantes ou não codantes. No primeiro caso pode levar ao aumento da variação na sequência de aminoácidos da proteína codificada, e nesse caso são conhecidos como SNPs não sinônimos. Estes SNPs são alvos de interesse por afetarem a função de proteínas codificadas e influenciar o fenótipo, como por exemplo a taxa de ovulação. É estimado que 20-30% de SNPs não sinônimos afetam a função das proteínas (Chasman & Adams, 2001; Sunyaev et al., 2001).

Animais com menor estatura corporal têm sido observados dentre diferentes populações e entre diferentes raças de ovelhas. Estudos genéticos identificaram que a estatura pequena e a taxa de ovulação são determinadas pela ação de genes únicos com efeito maior (*major genes*), denominados genes da fecundidade (*Fec*) (Davis, 2005). A primeira descrição de mutações com incremento na prolificidade em ovinos foi que estas se encontravam no gene ligado ao X. A primeira mutação descrita foi mapeada região 10-cM no centro do cromossomo X de ovelhas no *locus* denominado *FecX*, região que é ortóloga com a humana Xp11.2-11.4. A ligação genética nos estudos encontraram que o gene *BMP15* seria o provável candidato para o fenótipo *FecX*. O subsequente sequenciamento do DNA dessa região, revelou uma mutação no gene *BMP15* (Galloway et al., 2000). O primeiro SNP causador do fenótipo *FecX* foi denominado *Inverdale* e o respectivo *locus* foi denominado *FecX<sup>I</sup>* pelo comitê de nomenclatura genética de ovinos e caprinos em 1990 (Davis et al., 1991). O alelo *FecX<sup>I</sup>* foi primeiramente observado rebanho *Inverdale* de ovelhas Romney na Nova Zelândia, sendo que uma cópia do alelo *FecX<sup>I</sup>* incrementa a taxa de ovulação e acentua a sensibilidade ao LH dos folículos antrais nos ovários (Shackell et al., 1993). Em 1993, uma nova mutação foi encontrada na linhagem de ovelhas *Hanna* que apresentavam o mesmo fenótipo ligado ao X, esse polimorfismo foi denominado *FecX<sup>H</sup>* (Braw Tal et al., 1993).

Um outro SNP foi encontrado num *locus* distinto do *FecX* na linhagem *Booroola* de ovinos da raça merino. Esse SNP foi localizado no receptor *BMPRIIB* ou *ALK6* e o alelo denominado *FecB<sup>B</sup>*. O *locus* desse gene está localizado no cromossomo 6, sendo responsável por um aumento aditivo na taxa de ovulação em ovinos *Booroola* (Mulsant et al., 2001; Wilson et al., 2001; Souza et al., 2003). Posteriormente, uma série de outros SNPs foram detectados em diferentes pontos no gene *BMP15* e um no *GDF9* (denominado *locus FecG*) em ovelhas, como mostra a Tabela 1.1 (Mulsant et al., 2001; Wilson et al., 2001; Souza et al., 2003; Bodin et al., 2007; Ibeagha- Awemu et al., 2008).

Tabela 1.1. SNPs descritos nos genes *BMP15*, *GDF9* e sua respectiva localização (Adaptado de Souza et al., 2007)

Mutação	Gene	Locus gênico	Localização
<i>Galway</i>	<i>BMP15</i>	<i>FecX<sup>G</sup></i>	Pré-peptídeo
<i>Hanna</i>	<i>BMP15</i>	<i>FecX<sup>H</sup></i>	Peptídeo Maduro
<i>Inverdale</i>	<i>BMP15</i>	<i>FecX<sup>I</sup></i>	Peptídeo Maduro
<i>Lacaune</i>	<i>BMP15</i>	<i>FecX<sup>L</sup></i>	Peptídeo Maduro
<i>Belclare</i>	<i>BMP15</i>	<i>FecX<sup>B</sup></i>	Peptídeo Maduro
Alta fertilidade	<i>GDF9</i>	<i>FecG<sup>H</sup></i>	Peptídeo Maduro
<i>Booroola</i>	<i>ALK6/BMPRIIB</i>	<i>FecB<sup>B</sup></i>	Peptídeo Maduro

Animais heterozigotos ou homozigotos para a mutação no *ALK6* têm a taxa de ovulação maior do que animais sem mutações, sendo o efeito do alelo *FecB<sup>B</sup>* aditivo sobre a taxa de ovulação (Souza et al., 2003). Entretanto, animais homozigotos para as mutações descritas no *BMP15* ou *GDF9* são estéreis devido à interrupção no desenvolvimento folicular em seu estágio primário de crescimento, sendo que a elevada taxa de ovulação só se manifesta quando os alelos apresentam-se em heterozigose (Davis et al., 1992; Braw-Tal et al., 1993). As mutações no *BMP15* e *GDF9* resultam em níveis reduzidos de proteína madura ou ligação alterada aos seus respectivos receptores, encontrados na superfície das células da granulosa e *cumulus* (Liao et al., 2003; 2004).

Sem o *BMP15* ou *GDF9*, os ovócitos continuam a crescer na ausência da proliferação das células da granulosa até se tornarem incapazes de serem suportados pelas células da granulosa residuais, e degeneram ainda na fase de folículo primário (Galloway et al., 2000). Curiosamente, embora a ausência de *BMP15* ou *GDF9* bloqueie o crescimento folicular em homozigose, a inativação de uma só cópia dos alelos incrementa a taxa de ovulação, o que confere vantagem fecundativa na heterozigose (Galloway et al., 2000, Galloway et al., 2002, Gemmel & Slate, 2006 ).

Quando as mutações *Hanna* e *Inverdale* são combinadas em heterozigose, a descendência carrega ambas as mutações exibindo o mesmo fenótipo de infertilidade quando a cada mutação encontra-se em homozigose (Galloway et al., 2000).

Outras mutações no gene *BMP15* foram identificadas em diferentes linhagens de ovelhas com alterações na fertilidade, como a mutação *Galway (FecX<sup>G</sup>)*, que é a única, descrita até o presente momento, situada na região que codifica o pré-peptídeo do gene *BMP15* (Galloway et al., 2000). Também foi observado que os efeitos das mutações no *GDF9* e *BMP15* no mesmo animal são aditivos (Hanrahan et al., 2004).

Mutações no gene *GDF9* e *BMP15* também são associadas com várias anormalidades reprodutivas em ovinos e humanos. A expressão aberrante do *GDF9* está associada com a síndrome do ovário policístico e falha ovariana prematura em mulheres (Teixeira Filho et al., 2002; Dixit et al., 2005; Laissue et al., 2006). Para obter uma ovulação normal na espécie humana duas cópias funcionais do *BMP15* são requeridas, visto que a presença de uma mutação heterozigótica é suficiente para a falha ovariana prematura, falha hipergonadotrófica idiopática e gêmeos dizigóticos (Di Pasquale et al., 2004, 2006; Laissue et al., 2006; Dixit et al., 2006; Palmer et al., 2006; Mottershead et al., 2008). As mulheres com síndrome do ovário policístico, que carregam genótipos heterozigotos, apresentam efeitos protetores contra a ausência de ovulação e infertilidade. Gonzáles e colaboradores (2008)

associaram 3 marcadores ligados ao gene *BMP15* com alta produção de folículos em mulheres submetidas a estímulo com FSH recombinante.

A importância relativa de *BMP15* e *GDF9* nos eventos regulatórios da foliculogênese pode ser diferente entre camundongos e ovelhas. Essas distinções podem estar envolvidas na natureza mono *versus* poliovulatória desses animais (Yan et al., 2001; Galloway et al., 2002). Entretanto, como sugerido por Liao e colaboradores (2003) é possível que essas discrepâncias sejam causadas pela natureza das mutações no gene *BMP15*, um único ponto de mutação em ovelhas *versus* a deleção do segundo exon inteiro em camundongos. De acordo com esse modelo, a deleção do segundo exon inteiro do *BMP15* nos camundongos não pode inibir o processamento e secreção do *GDF9* porque o peptídeo feito pelo primeiro exon é muito mais curto e forma heterodímeros com *GDF9*. Se verdade, isso pode explicar a relativa normalidade na foliculogênese observada em camundongos com o *BMP15* desligado (Shimasaki et al., 2004).

Ainda não se sabe por que os animais heterozigotos para as mutações são mais bem adaptados do que os homozigotos, mas os polimorfismos documentados nos genes *BMP15* e *GDF9* representam um dos melhores exemplos de vantagem heterozigótica já descrito, com a base genética, aptidão diferencial e mecanismos de seleção bem entendidos (Davis, 2005; Hanrahan et al., 2004).

### 2.3 Receptores e vias de ativação da Superfamília TGF $\beta$

O início da cascata sinalizadora da superfamília TGF $\beta$  ocorre pela união dos ligantes com receptores específicos serina/treonina *kinase* tipo I e tipo II, que induz a fosforilação de um substrato intracelular sinalizador denominado Smad (Kawabata et al., 1998; Massagué, 1998). As proteínas Smad são uma família de fatores de transcrição encontrados em vertebrados, insetos e nematóides (Heldin et al., 1997; Massagué, 1998), sendo os únicos substratos de receptores da superfamília TGF $\beta$  com habilidade de propagar sinal e consideradas essenciais para a sinalização da superfamília TGF $\beta$  (Heldin et al., 1997; Massagué, 1998; Derynck, 1998).

A interação do *BMP15* e *GDF9* com as células-alvo de mamíferos acontecem via receptores de membrana da superfamília TGF $\beta$ , dos quais existem sete receptores tipo I (*ALK1-7*) e cinco tipos conhecidos de receptores tipo II (*Act RII*, *Act RIIB*, *AMHRII*, *BMPRII*

e *TGFβRII*). O *BMP15* se une ao receptor BMP tipo IB (*ALK6*) e ao *BMPRII*, enquanto que o *GDF9* se liga ao receptor tipo I TGFβ (*ALK5*) (Moore et al. 2003; Mazerbourg et al. 2004) e ao *BMPRII* (Vitt et al. 2002). Quando unidos aos ligantes, estes agem como fatores conjuntos trazendo dois receptores tipo I e dois receptores tipo II, num complexo heterotetramérico (Franzen et al., 1993). Neste complexo, receptores tipo II exercem a função de ativar o receptor tipo I pela fosforilação de uma região regulatória intracelular. O receptor tipo I ativado, por sua vez, fosforila as proteínas Smad que propagam o sinal até o núcleo da célula (Heldin et al., 1997; Massagué, 2000; Miyazono, 2000; ten Dijke et al., 2002).

A expressão do mRNA do gene *ALK5* foi observada em muitas células nos ovários incluindo o ovócito, células da granulosa e da teca de muitas espécies inclusive humanos (Juneja et al., 1996; Roy & Kole, 1998; Qu et al., 2000; Juengel et al., 2004). O *ALK5* foi encontrado em ovócitos de todos os tamanhos foliculares em humanos, ovelhas e camundongos (Juneja et al., 1996; Roy & Kole, 1998; Qu et al., 2000; Juengel et al., 2004). Em células da granulosa, foi observado em folículos pré-antrais de todas as espécies com expressão observada no estágio primordial em camundongos, primordial para primário em humanos e em folículos pré-antrais em ovelhas (Juneja et al., 1996; Roy & Kole, 1998; Qu et al., 2000; Juengel et al., 2004). O receptor *BMPRII* ou *ALK6* é expresso pelas células da granulosa a partir do primeiro estágio até o de folículo antral tardio e em menor extensão pelas células da teca em ovinos e folículos antrais de bovinos (Wilson et al., 2001; Souza et al., 2002; Glister et al., 2004). O *BMPRII* é expresso nas células da granulosa nos estágios iniciais da foliculogênese em folículos primordiais de ruminantes e folículos primários pré-antrais de roedores e continua sendo expresso em todos os estágios subsequentes da foliculogênese (Juengel & McNatty, 2005)

As proteínas Smads específicas (R-Smad) são ativadas pela fosforilação catalisada pelos receptores tipo I. Estes Smads incluem Smad 1, 2, 3, 5 e 8. Uma vez ativada, as moléculas R-Smad interagem com outra molécula Smad denominada Smad 4, que é um parceiro comum para todos os R-Smads e conhecida como Smad comum (Co-Smad). Esse complexo Smad/Co-Smad se transloca ao núcleo para interagir com os fatores de transcrição específicos que regulam a expressão de genes alvo (Lagna et al., 1996; Nishimura et al., 1998).

Além de R-Smads e Co-Smads, os I-Smads (Smad7 e Smad6) são de uma subclasse distinta de Smads que antagoniza a transdução de sinal dos TGFβ. Smad7 interage com todos os receptores ativados tipo I para inibir a ativação dos R-Smads e a modulação transcricional (Hayashi et al., 1997; Nakao et al., 1997; Itoh et al., 1998; Souchelnytskyi et al.,

1998). No entanto, o Smad6 compete com os R-Smads para a formação do complexo com o Smad4, assim inibe o caminho BMP de sinalização (Hata et al., 1998; Souchelnytskyi et al., 1998; Ishisaki et al., 1999).

No estado basal, os Smads são retidos no citoplasma, mas ao serem fosforiladas pelo receptor tipo I estas formam dímeros com a Co-smad. O complexo Smad/Co-smad é então translocado para núcleo e passam a interagir com um grupo de proteínas parceiras (fatores de transcrição) que são específicas para um tipo celular. Esse conjunto de proteínas determina a sequência de DNA que o complexo Smad irá unir-se, os co-ativadores transcripcionais ou co-repressores irão recrutar os outros fatores de transcrição que irão cooperar, como pode ser observado na Figura 2.3. A mistura de Smad ativados, parceiros e reguladores estão presentes numa determinada célula durante todo o tempo de estímulo do TGF $\beta$ , modulando da resposta do sinal de acordo com o contexto celular (Massagué & Wotton, 2000).

O *BMP15* utiliza o caminho clássico da via BMP de transdução de sinal, unindo-se ao *BMPRII* e *ALK6* e ativando as Smads 1/5/8 (Moore et al., 2003; Shimasaki et al., 2004), enquanto o *GDF9* utiliza o caminho TGF $\beta$ -activina se ligando ao *BMPRII* e *ALK5*, ativando as Smads 2/3 (Vitt et al., 2002, Kaivo-Oja et al., 2003, Roh et al., 2003, Mazerbourg et al., 2004).

As vias clássicas BMP e TGF $\beta$ - activina também podem ser inibidas pelo antagonista denominado *BAMBI*. Esse inibidor é idêntico ao receptor do tipo I, exceto pela ausência do domínio intracelular de serina/treonina *kinase*. Como a *BAMBI* não possui a capacidade de transmitir o sinal da via, devido à falta do domínio *kinase* intracelular, é evidente que *BAMBI* compete com os receptores tipo I pela união ao ligante e inibe a sinalização de TGF $\beta$ , activinas e BMPs (Onichtchouk et al., 1999; Grotewold et al., 2001).

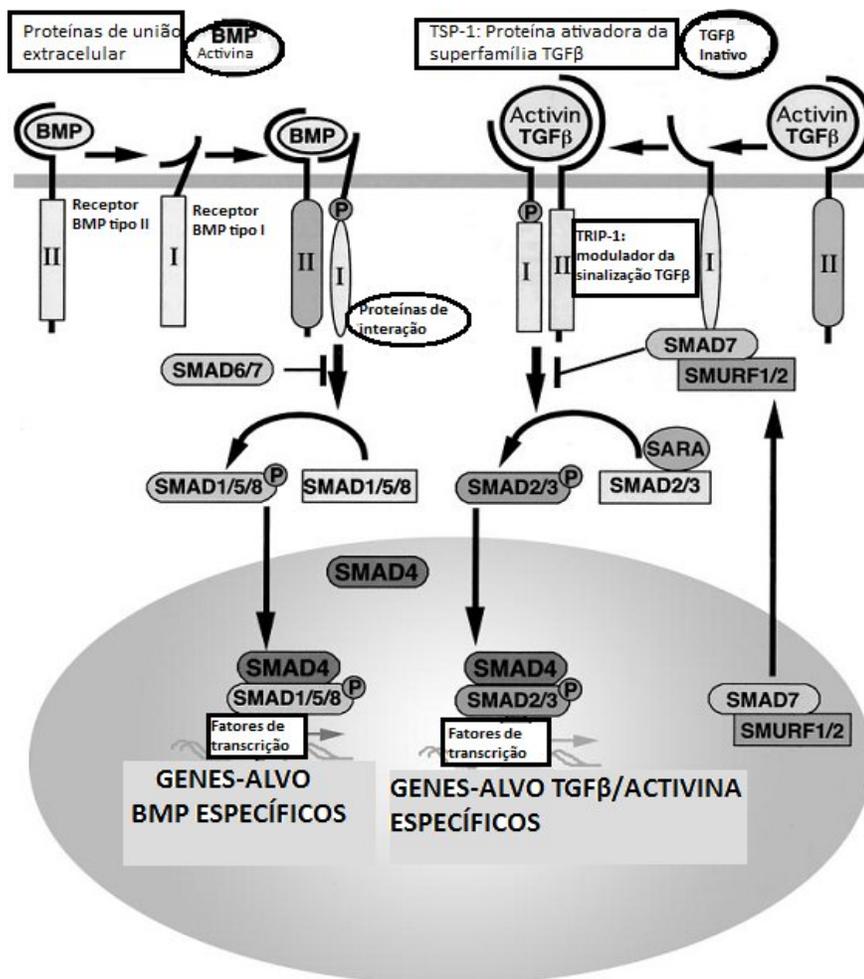


Figura 2.3 - A regulação da transdução de sinal da superfamília TGFβ nos múltiplos níveis (Adaptado de Chang et al., 2002).

Receptores TGFβ- activinas permanecem ativos pelo menos 3 a 4 horas após a união com o ligante, mantendo ativação do receptor do complexo Smad no núcleo. Muitos genes são ativados em resposta aos ligantes TGFβ, enquanto outros têm a transcrição reprimida (Inman et al., 2002). Provavelmente os níveis exatos de sinalizadores e a proporção de receptores diferentes tipo I e tipo II para a transdução de sinal irão regular a sinalização de ligantes TGFβ. Alternadamente, os níveis exatos de receptores requeridos podem ser modificados pela expressão de receptores acessórios, como betaglicanos (os receptores TGFβ tipo III), endoglicanos ou criptos (Lopez-Casillas et al., 1993; Lux et al., 1999; Reissman et al., 2001; Bianco e al., 2002). Essa enorme complexidade de ligantes, receptores e sinalizadores internos, fazem com que o entendimento do sistema de sinalização dos membros da superfamília TGFβ seja uma tarefa extremamente laboriosa e ainda incompleta.

## 2.4 Esteroidogênese

Esteroidogênese é a produção de hormônios através da conversão enzimática do colesterol pelas células da granulosa e teca, sendo o estradiol o principal esteróide produzido pelas células da granulosa antes da sua diferenciação terminal em corpo lúteo (Richards et al., 1995; Fitzpatrick et al., 1997). A regulação da síntese e secreção de esteróides envolve interações entre fatores sistêmicos, autócrinos e parácrinos; secretados pelas células da teca, granulosa e ovócitos (Souza et al., 2003).

O papel do ovócito na modificação da esteroidogênese folicular foi proposto há 40 anos, quando El-Fouly e colaboradores (1970) apontaram que a remoção *in vivo* do ovócito resultou na luteinização prematura do folículo e no incremento dos níveis de progesterona. Moléculas derivadas do ovócito atuam dentro do folículo para inibir a luteinização prematura e biosíntese da progesterona (Falck, 1959; El-Fouly et al., 1970; Erickson & Shimasaki, 2000).

As investigações da esteroidogênese são usualmente realizadas através de cultivos de células foliculares *in vitro*, devido ao alto custo dos estudos *in vivo* e limitações metodológicas. Neste sentido é importante que durante o cultivo *in vitro* as características morfológicas, bioquímicas e moleculares das células sejam preservadas (Roberts & Echterkamp, 1994; Campbell et al., 1996).

O tempo de cultivo de células da granulosa determina o decréscimo de estradiol e o incremento de progesterona, à medida que ocorre a luteinização (Luck et al., 1990; Hirshfield, 1991; Gong et al., 1994; Vernon & Spicer, 1994). Neste processo ocorre a diferenciação celular que se dá de forma padrão e indica que o sistema de cultivo é apropriado para o estudo destas células (Gutiérrez et al., 1997).

A produção de progesterona pode ser oriunda de células da granulosa murais ou células do *cumulus*. A primeira possui grande capacidade proliferativa e a segunda baixa capacidade esteroidogênica (Shimada et al., 2006). Além disso, células da granulosa murais possuem maior capacidade de expressão de receptores de LH, do que as células do *cumulus*, íntimas ao ovócito (Peng et al., 1991; Whitelaw et al., 1992).

Ao comparar o co-cultivo de células da granulosa com ovócitos, complexos *cumulus oophorus* intactos e ovocitectomizados de camundongos, Vanderhyden et al. (1992) e Li et al. (2000) observaram no primeiro cultivo que fatores secretados pelo ovócito influenciaram a proliferação celular, inibiram a esteroidogênese e suprimiram a formação de

receptores de LH. Em outros estudos, a secreção de estrógeno foi elevada em complexos *cumulus oophorus* ovocitotomizados comparados com complexos intactos (Vanderhyden & Tonary, 1995; Vanderhyden & Macdonald, 1998).

Nestes trabalhos a secreção de progesterona, induzida pelo FSH, foi inibida, semelhante a outros trabalhos em camundongos (Vanderhyden et al., 1993), suínos (Coskun et al., 1995) e bovinos (Li et al., 2000). Da mesma forma, com exceção de camundongos, a síntese de estrógeno foi inibida pela presença do ovócito.

### 2.4.1 Enzimas da esteroidogênese

Nos ovários, as enzimas esteroidogênicas pertencem a dois grupos distintos: citocromos P450, representados pelo P450 *side chain cleavage* (P450<sub>scc</sub> ou *CYP11A1*), 17 $\alpha$ -hidroxilase (*CYP17*) e P450 aromatase (P450<sub>arom</sub> ou *CYP19*); e os esteróides oxirredutases, representados pela 3 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase (3 $\beta$  HSD) e 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase (17 $\beta$  HSD), que podem ser observados na Tabela 1.2. A esteroidogênese é regulada pelo transporte de colesterol para o interior da membrana interna da mitocôndria através da proteína regulatória aguda da esteroidogênese (*Star*), seguida da sua conversão em pregnenolona pela enzima citocromo *CYP11A1*, que é expressa nas células da teca e da granulosa (Hanukoglu, 1992).

Tabela 1.2. Denominação das enzimas esteroidogênicas

Denominação Comum	Denominação Antiga	Denominação Usual
Enzima <i>side chain cleavage</i>	P450 <sub>scc</sub>	<i>CYP11A1</i>
3 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase	3 $\beta$ HSD	3 $\beta$ HSD
17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase	17 $\beta$ HSD	17 $\beta$ HSD
17 $\alpha$ -hidroxilase/17-20 liase	P450 <sub>cyp17</sub>	<i>CYP17</i>
Aromatase	P540 <sub>arom</sub>	<i>CYP19</i>

Nas células da teca, a pregnenolona é metabolizada em dehidroepiandrosterona pela enzima 17 $\alpha$ -hidroxilase (*CYP17*) e então em androstenediona com participação da 3 $\beta$  HSD. A androstenediona migra para as células da granulosa, onde é convertida em estrona pela *CYP19* e em seguida em estradiol pela 17 $\beta$  HSD, como é mostrado na Figura 2.4.

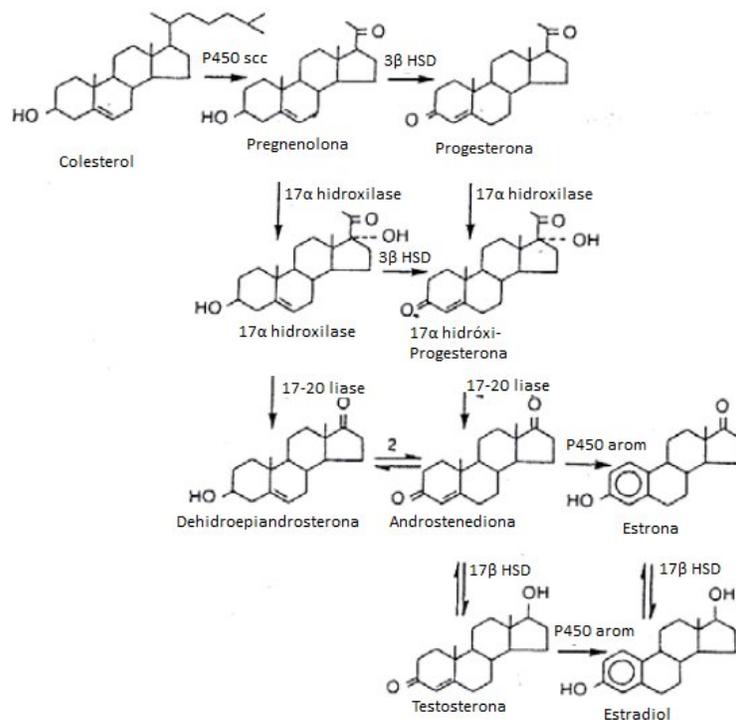


Figura 2.4 – Modelo bioquímico da esteroidogênese *in vivo* (Adaptado de Williams & Larsen, 2003).

A atividade esteroidogênica das células da granulosa e da teca responde principalmente aos hormônios FSH e LH. Esses hormônios exercem seus efeitos nas células através da ativação da adenilato ciclase, o que leva ao aumento intracelular do AMP cíclico que age como segundo mensageiro, induzindo a expressão das enzimas esteroidogênicas (Strauss & Hsueh, 2001).

A produção final de estrógenos ocorre graças à cooperação endócrina entre as células da granulosa e teca, modelo conhecido como “duas células-dois hormônios” (Ojeda, 1996) (Figura 2.5). As células da teca sob ação do LH, e suporte de FSH, produzem andrógenos que são utilizados pelas células da granulosa para a produção de estrógenos, via reação de aromatização (Williams & Larsen, 2003). Um único tipo celular não seria suficiente para a produção de esteróides, sendo necessário a complementariedade entre células (Sahmi et al., 2004).

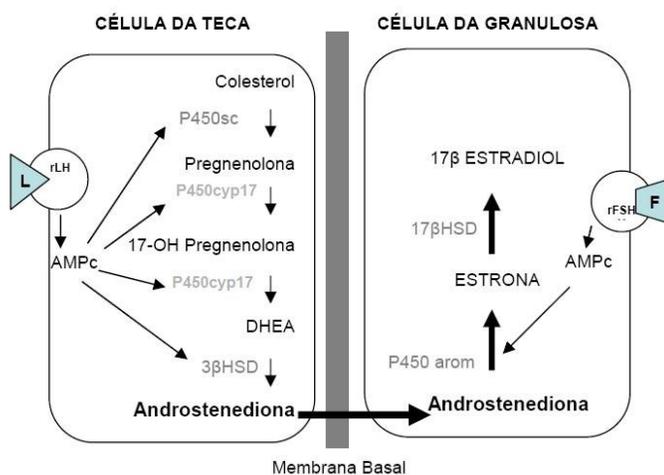


Figura 2.5 - Atividade esteroidogênica das células da granulosa e da teca, correspondentes aos hormônios gonadotróficos, FSH e LH no foliculo ovariano (Adaptado de Ojeda, 1996).

L: LH, F: FSH, r: receptor.

Entretanto, experimentos com camundongos hipofisectomizados demonstraram que a ovulação pode ser induzida pelo FSH recombinante, sem a presença de LH, o que indica que a produção de estrógenos pelas células da granulosa tem dependência principalmente pela ação do FSH (Galway et al., 1990; Wang & Greenwald, 1993; Pakarainen et al., 2005).

Em qualquer estágio do desenvolvimento folicular, apenas as células da granulosa sofrem influência do FSH, devido à presença de receptores específicos. Esse hormônio conduz a proliferação celular e expressão de enzimas esteroidogênicas. Neste sentido, promove a síntese de estradiol e a habilidade dessas células em sintetizar progesterágenos (Ojeda, 1996).

#### 2.4.2 Ações dos fatores secretados pelo ovócito na esteroidogênese e cultivo *in vitro* de células

Os fatores pertencentes à superfamília TGF $\beta$  possuem funções importantes na regulação da vida animal, como em etapas da embriogênese, crescimento, cicatrização, inflamação tecidual e foliculogênese. Alguns membros desta superfamília, produzidos pelos ovócitos, são o *BMP2*, *4*, *6* e *7*, além do *BMP15* e *GDF9*, que em condições de cultivo *in vitro*, podem estimular ou inibir a síntese e secreção de progesterona, de estradiol, alterar a

expressão de enzimas esteroidogênicas e de receptores de LH (Dodson & Schomberg, 1987; Adashi et al., 1989; Kubota et al., 1994; Elvin et al., 2000; Fabre et al., 2003; Glister et al., 2004; Otsuka et al., 2001; Juengel et al., 2006).

Os fatores secretados pelo ovócito mediam a proliferação celular e esteroidogênese, sendo inibidores ativos da luteinização. A presença de BMPs incrementa a produção de hormônios esteróides e a propagação celular (Scaramuzzi et al., 1993). O aumento da síntese de progesterona associado com a transição do estágio gonadotrofina-responsivo para o estágio gonadotrofina-dependente *in vivo* e o incremento da secreção *in vitro*, indica a tendência das células da granulosa de ruminantes em se luteinizar (Campbell, 1988; 1996).

O gene fator nuclear das células germinativas (*GCNF*) é secretado pelo ovócito e regula a esteroidogênese nas células somáticas do ovário. O *GDF9* e *BMP15* também são dois genes candidatos a serem reguladores da esteroidogênese, pelo fato de estarem envolvidos na sinalização parácrina em células somáticas adjacentes durante a esteroidogênese (Dong et al., 1996; Elvin et al., 1999; 2000; Otsuka et al., 2000; Solovyeva et al., 2000; Otsuka et al., 2001; Vitt et al., 2000a,b).

Sabe-se que no cultivo *in vitro* de células da granulosa de camundongos, o *GDF9* mantém a produção basal de estradiol e progesterona (Vitt et al., 2000b), no entanto, a ação deste fator na esteroidogênese é potencializada quando não há presença de FSH no cultivo (Elvin et al., 1999; McNatty et al., 2005a,b). O *GDF9* estimula a produção de FSH e inibe a síntese de estradiol, de maneira diferente o *BMP15* diminui a ação do FSH e a produção de progesterona, sem afetar a síntese de estradiol na ausência do *GDF9* (Otsuka et al., 2000; Vitt et al., 2000a; Otsuka et al., 2005). Contudo, quando o *BMP15* e o *GDF9* atuam simultaneamente, as células da granulosa são impedidas de produzir progesterona, estando o FSH presente ou não (Elvin et al., 1999; Vitt et al., 2000b; Juengel & McNatty, 2005; Spicer et al., 2006).

Entretanto, os dados experimentais apontam para uma provável diferença entre as espécies no mecanismo molecular de regulação da produção de progesterona e estradiol pelas células da granulosa (McNatty et al., 2005a,b). Portanto muitos estudos ainda são necessários para o completo esclarecimento da influência dos fatores secretados pelo ovócito na modulação do FSH e LH sobre a esteroidogênese, assim como no processo de luteinização das células do *cumulus*.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALTONEN, J.; LAITINEN, M. P.; VUOJOLAINEN, K.; JAATINEN, R.; HORELLI-KUITUNEN, N.; SEPPA, L.; LOUHIO, H.; TUURI, T.; SJOBERG, J.; BUTZOW, R.; HOVATTA, O.; DALE, L.; RITVOS, O. Human growth differentiation factor 9(GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expected in oocytes during early folliculogenesis. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 84, p. 2744–2750, 1999.

ADASHI, E. Y.; RESNICK, C. E.; HERNANDEZ, E. R.; MAY, J. V.; PURCHIO, A. F.; TWARDZIK, D. R. Ovarian transforming growth factor-beta (TGF beta): cellular site(s), and mechanism(s) of action. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 61, p. 247–256, 1989.

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

AMLEH, A.; DEAN, J. Mouse genetics provides insight into folliculogenesis, fertilization and early embryonic development. **Human Reproduction Update**, v. 8, n. 5, p. 395-403, 2002.

ARMSTRONG, D. T.; XIA, P.; DE GANNES, G.; TEKPETEY, F. R.; KHAMSI, F.; Differential effects of insulin-like growth factor-I and follicle-stimulating hormone on proliferation and differentiation of bovine cumulus cells and granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 331–338, 1996.

AUSTIN, C. R.; SHORT, R. V. **Germ cells and fertilization: Reproduction in mammals**. 2. ed. Cambridge: New York, 1982. 177p.

BIANCO, C.; ADKINS, H. B.; WECHSELBERGER, C.; SENO, M.; NORMANNO, N.; DE LUCA, A.; SUN, Y.; KHAN, N.; KENNEY, N.; EBERT, A.; WILLIAMS, K. P.; SANICOLA, M.; SALOMON, D. S. Cripto-1 activates nodal and ALK4 -dependent and independent signaling pathways in mammary epithelial cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, p. 2586–2597, 2002.

BINELLI, M.; IBIAPINA, B. T.; BISINOTTO, R. S. Bases fisiológicas, farmacológicas e endócrinas dos tratamentos de sincronização do crescimento folicular e da ovulação. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 1-7, 2006.

BODENSTEINER, K. J.; CLAY, C. M.; MOELLER, C. L.; SAWYER, H. R. Molecular cloning of the ovine growth/differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 381–386, 1999.

BODIN, L.; DI PASQUALE, E.; FABRE, S.; BONTOUX, M.; MONGET, P.; PERSANI L.; MULSANT, P. A novel mutation in the bone morphogenetic protein 15 gene causing defective protein secretion is associated with both increased ovulation rate and sterility in lacauene sheep. **Endocrinology**, v.148, p. 393-400, 2007.

BRAW-TAL, R.; MCNATTY, K. P.; SMITH, P.; HEATH, D. A.; HUDSON, N. L.; PHILLIPS, D. J.; MCLEOD, B. J.; DAVIS, G. H. Ovaries of ewes homozygous for the X-linked Inverdale gene (FecXI) are devoid of secondary and tertiary follicles but contain many abnormal structures. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 895-907, 1993.

BRAW-TAL, R. The initiation of follicle growth: the oocyte or the somatic cells? **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 187, p. 11–18, 2002.

BUCCIONE, R.; VANDERHYDEN, B. C.; 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, p. 16–25, 1990.

BYSKOV, A. G.; GUOLIANG, X.; ANDERSENCY. The cortex-medulla oocyte growth pattern is organized during fetal life: An in-vitro study of the mouse ovary. **Molecular Human Reproduction**, v. 39, p. 795–800, 1997.

CAMPBELL, B. **Factors affecting ovulation rate in sheep and cattle**. Sydney: University of Sydney, 1988. Ph.D. thesis- University of Sydney, 1988.

CAMPBELL, B. K.; SCARAMUZZI, R. J.; WEBB, R. Induction and maintenance of oestradiol and immunoreactive inhibin production with FSH by ovine granulosa cells cultured in serum-free media. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 106, p. 7-16, 1996.

CARABATSOS, M. J.; LEVIN, J.; MATZUK, M. M.; ALBERTINI, D. F. Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9- deficient mice. **Developmental Biology**, v. 204, p. 373–384, 1998.

CATTANACH, B. M.; IDDON, C. A.; CHARLTON, H. M.; CHIAPPA, S. A.; FINK, G. Gonadotrophin- releasing hormone deficiency in a mutant mouse with hypogonadism. **Nature**, v. 269, p. 338–340, 1977.

CHA, K.; HAN, S.; CHUNG, H.; CHOI, D.; LIM, J.; LEE, W.; KO, J. J.; YOON, T. K. Pregnancies and deliveries after in vitro maturation culture followed by in vitro fertilization and embryo transfer without stimulation in women with polycystic ovary syndrome. **Fertility and Sterility**, v. 73, p. 978–983, 2000.

CHANG, H.; BROWN, C. W.; MATZUK, M. M. Genetic analysis of the mammalian Transforming Growth Factor-Beta superfamily. **Endocrine Reviews**, v. 23, p. 787–823, 2002.

CHASMAN, D.; ADAMS, R. M. Predicting the functional consequences of non-synonymous single nucleotide polymorphisms: structure-based assessment of amino acid variation. **Journal of Molecular Biology**, v. 307, n. 2, p. 683-706, 2001.

CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. Follicle culture in reproductive toxicology: a tool for in-vitro testing of ovarian function? **Human Reproduction Update**, v. 8, p. 243–254, 2002.

COSKUN, S.; UZUMCU, M.; LIN, Y. C.; FRIEDMAN, C. I.; ALAK, B. M. Regulation of cumulus cell steroidogenesis by the porcine oocyte and preliminary characterization of oocyte-produced factor(s). **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 670–675, 1995.

DAIKOKU, T.; DEY, S. K. Two faces of PTEN. **Nature Medicine**, v. 14, n. 11, p. 1192-1193, 2008.

DAOPIN, S.; PIEZ, K. A.; OGAWA, Y.; DAVIES, D. R. Crystal structure of Transforming Growth Factor Beta-2: an unusual fold for the superfamily. **Science**, v. 257, p. 369–373, 1992.

DAVIS, G. H.; MCEWAN, J. C.; FENNESSY, P. F.; DODDS, K. G.; FARQUHAR, P. A. Evidence for the presence of a major gene influencing ovulation rate on the X chromosome of sheep. **Biology of Reproduction**, v. 44, p. 620-624, 1991.

DAVIS, G. H.; MCEWAN, J. C.; FENNESSY, P. F.; DODDS, K. G.; MCNATTY, K. P.; O, W. S. Infertility due to bilateral ovarian hypoplasia in sheep homozygous (FecXI FecXI) for the Inverdale prolificacy gene located on the X chromosome. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 636-640, 1992.

DAVIS, G. H. Major genes affecting ovulation rate in sheep. **Genetics Selection Evolution**, v. 37, p. S11-S23, 2005.

DERYNCK, R. Smad proteins and mammalian anatomy. **Nature**, v. 393, p. 737-239, 1998.

DI PASQUALE, E.; BECK-PECCOZ, P.; PERSANI, L. Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 75, p. 106-111, 2004.

DI PASQUALE, E.; ROSSETTI, R.; MAROZZI, A.; BODEGA, B.; BORGATO, S.; CAVALLO, L.; EINAUDI, S.; RADETTI, G.; RUSSO, G.; SACCO, M.; WASNIEWSKA, M.; COLE, T.; BECK-PECCOZ, P.; NELSON, L. M.; PERSANI, L. Identification of new variants of human BMP15 gene in a large cohort of women with premature ovarian failure. **The Journal of Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 5, p. 1976-1979, 2006.

DIXIT, H.; RAO, L. K.; PADMALATHA, V.; KANAKAVALLI, M.; DEENADAYAL, M.; GUPTA, N.; CHAKRAVARTY, B.; SINGH, L. Mutational screening of the coding region of Growth Differentiation Factor 9 gene in Indian women with ovarian failure. **Menopause**, v. 12, n. 6, p. 749–754, 2005.

DIXIT, H.; RAO, L. K.; PADMALATHA, V. V.; KANAKAVALLI, M.; DEENADAYAL, M.; GUPTA, N.; CHAKRABARTY, B.; SINGH, L. Missense mutations in the BMP15 gene are associated with ovarian failure. **Human Genetics**, v. 119, p. 408-415, 2006.

DODSON, W. C.; SCHOMBERG, D. W. The effect of transforming growth factor- $\beta$  on follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cells. **Endocrinology**, v. 120, p. 512-516, 1987.

DONG, J.; ALBERTINI, D. F.; NISHIMORI, K.; RAJENDRA KUMAR, T.; LU, N.; MATZUK, M. M. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. **Nature**, v. 383, p. 531-535, 1996.

DOWNS, S. M. Specificity of epidermal growth factor action on maturation of the murine oocyte and cumulus oophorus *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 371-379, 1989.

DOWNS, S. M. Purine control of mouse oocyte maturation: evidence that nonmetabolized hypoxanthine maintains meiotic arrest. **Molecular Reproduction and Development**, v. 35, p. 82-94, 1993.

DRAGOVIC, R. A.; RITTER, L. J.; SCHULZ, S. J.; AMATO, F.; ARMSTRONG, D. R. T.; GILCHRIST, R. B. Role of oocyte-secreted growth differentiation factor 9 in the regulation of mouse cumulus expansion. **Endocrinology**, v. 146, n. 6, p. 2798-2806, 2005.

DRAGOVIC, R. A.; RITTER, L. J.; SCHULZ, S. J.; AMATO, F.; THOMPSON, J. G.; ARMSTRONG, D. T.; GILCHRIST, R. B. Oocyte-secreted factor activation of SMAD 2/3 signaling enables initiation of mouse cumulus cell expansion. **Biology of Reproduction**, v. 76, p. 848-857, 2007.

DRUMMOND, A. E.; LE, M. T.; ETHIER, J. F.; DYSON, M. L.; FINDLAY, J. K. Expression and localization of activin receptors, Smads, and  $\beta$ glycan to the postnatal rat ovary. **Endocrinology**, v. 143, p. 1423-1433, 2002.

DUBE, J. L.; WANG, P.; ELVIN, J.; LYONS, K. M.; CELESTE, A. J.; MATZUK, M. M. The bone morphogenetic protein 15 gene is x-linked and expressed in oocytes. **Molecular Endocrinology**, v. 12, n. 12, p. 1809-1817, 1998.

DUCIBELLA, T.; SCHULTZ, R.; OZIL, J. P. Role of calcium signals in early development. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 17, p. 324-332, 2006.

ECKERY, D. C.; WHALE, L. J.; LAWRENCE, S. B.; WYLDE, K. A.; MCNATTY, K. P.; JUENGEL, J. L. Expression of mRNA encoding Growth Differentiation Factor 9 and bone morphogenetic protein 15 during follicular formation and growth in a marsupial, the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 192, p. 115-126, 2002.

EICHENLAUB-RITTER, U.; PESCHKE, M. Expression in *in vivo* and *in vitro* growing and maturing oocytes: focus on regulation of expression at the translational level. **Human Reproduction Update**, v. 8, n. 1, p. 21-41, 2002.

EDWARDS, R. G. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, sig, rhesus, monkey and human ovarian oocytes. **Nature**, v. 208, p. 349-351, 1965.

EL-FOULY, M. A.; COOK, B.; NEKOLA, M.; NALBANDOV, A. V. Role of the ovum in follicular luteinization. **Endocrinology**, v. 87, p. 288–293, 1970.

ELVIN, J. A.; CLARK, A. T.; WANG, P.; WOLFMAN, N. M.; MATZUK, M. M. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. **Molecular Endocrinology**, v. 13, n. 6, p. 1035-1048, 1999.

ELVIN, J. A.; YAN, C.; MATZUK, M. M. Growth differentiation factor-9 stimulates progesterone synthesis in granulosa cells via prostaglandin E<sub>2</sub>/EP2 receptor pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 18, p. 10288-10293, 2000.

EPPIG, J. J.; CHESNEL, F.; HIRAO, Y.; O'BRIEN, M. J.; PENDOLA, F. L.; WATANABE, S.; WIGGLESWORTH, K. Oocyte control of granulosa cell development: how and why. **Human Reproduction**, v. 12, p. 127–132, 1997.

EPPIG, J. J.; O'BRIEN, M.; PENDOLA, F.; WATANABE, S. Factors affecting the developmental competence of mouse oocytes grown in vitro: follicle-stimulating hormone and insulin. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 1445–1453, 1998.

ERICKSON, G. F.; MAGOFFIN, D. A.; DYER, C. A.; HOFEDITZ, C. The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. **Endocrine Reviews**, v. 6, 371–399, 1985.

ERICKSON, G. F.; SHIMASAKI, S. The role of the oocyte in folliculogenesis. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 11, p. 193–198, 2000.

ERICKSON, G. F.; SHIMASAKI, S. The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 11, p. 9, 2003.

FABRE, S.; PIERRE, A.; PISSELET, C.; MULSANT, P.; LECERF, F.; POHL, J.; MONGET, P.; MONNIAUX, D. The Booroola mutation in sheep is associated with an alteration of the bone morphogenetic protein receptor-IB functionality. **Journal of Endocrinology**, v. 177, p. 435–444, 2003.

FAIR, T.; HULSHOF, S.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Nucleus ultrastructure and transcript activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 46, p. 208-215, 1997.

FALCK, B. Site of production of oestrogen in rat ovary as studied in micro-transplants. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 47, p. 1–101, 1959.

FIGUEIREDO, J. R.; CELESTINO, J. J. H.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, J. R. V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção in vitro de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 143-152, 2007.

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

FITZPATRICK, S. L.; SINDONI, D. M.; SHUGHRUE, P. J.; LANE, M. V.; MERCHENTHALER, I. J.; FRAIL, D. E. Expression of growth differentiation factor-9 messenger ribonucleic acid in ovarian and nonovarian rodent and human tissues. **Endocrinology**, v. 139, p. 2571–2578, 1998.

FRANZEN, P.; ten DIJKE, P.; ICHIJO, H.; YAMASHITA, H.; SCHULZ, P.; HELDIN, C. H.; MIYAZONO, K. Cloning of a TGF- $\beta$  type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF- $\beta$  type II receptor. **Cell**, v. 75, p. 681–692, 1993.

FULOP, C.; SZANTO, S.; MUKHOPADHYAY, D.; BARDOS, T.; KAMATH, R. V.; RUGG, M. S.; DAY, A. J.; SALUSTRI, A.; HASCALL, V. C.; GLANT, T. T.; MIKECZ, K. Impaired cumulus mucification and female sterility in tumor necrosis factor-induced protein-6 deficient mice. **Development**, v. 130, p. 2253–2261, 2003.

GALLOWAY, S. M.; MCNATTY, K. P.; CAMBRIDGE, L. M.; LAITINEN, M. P. E.; JUENGEL, J. L.; JORIKANTA, T. S.; MCLAREN, R. J.; LUIRO, K.; DODDS, K. G.; MONTGOMERY, G. W.; BEATTIE, A. E.; DAVIS, G. H.; RITVOS, O. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. **Nature Genetics**, v. 25, p. 279-283, 2000.

GALLOWAY, S. M.; GREGAN, S. M.; WILSON, T.; MCNATTY, K.P.; JUENGEL, J. L.; RITVOS, O.; DAVIS, G. H. Bmp15 mutations and ovarian function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 191, p. 15-18, 2002.

GALWAY, A. B.; LAPOLT, P. S.; TSAFRIRI, A.; DARGAN, C. M.; BOIME, I.; HSUEH, A. J. Recombinant follicle-stimulating hormone induces ovulation and tissue plasminogen activator expression in hypophysectomized rats. **Endocrinology**, v. 127, p. 3023–3028, 1990.

GEMMEL, N. J.; SLATE, J. Heterozygote advantage for fecundity. **Plos One**, v. 1, p. e125, 2006.

GENTRY, L. E.; LIOUBIN, M. N.; PURCHIO, A. F.; MARQUARDT, H. Molecular events in the processing of recombinant type 1 pre-pro-transforming growth factor  $\beta$  to the mature polypeptide. **Molecular and Cellular Biology**, v. 8, p. 4162–4168, 1988.

GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J.; ARMSTRONG, D. T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 431-446, 2004.

GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J.; MYLLYMAA, S.; KAIVO-OJA, N.; DRAGOVIC, R. A.; HICKEY, T. E.; RITVOS, O.; MOTTERSHEAD, D. G. Molecular basis of oocyte-paracrine signaling that promotes granulosa cell proliferation. **Journal of Cell Science**, v. 119, p. 3811-3821, 2006.

GILLOTT, D. J.; ELDIB, A.; IAMMARRONE, E.; LEUNG, D. Y.; THORNHILL, A. R.; GRUDZINSKAS, J. G. Glycolytic enzyme expression in human granulosa cells. **Fertility and Sterility**, v. 90, p. 1405-1410, 2008.

GLISTER, C.; KEMP, C. F.; KNIGHT, P. G. Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. **Reproduction**, v. 127, p. 239-254, 2004.

GONG, J. G.; MCBRIDE, D.; BRAMLEY, T. A.; WEBB, R. Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin-like growth factor-I and insulin on bovine granulosa cell steroidogenesis in vitro. **Journal of Endocrinology**, v. 143, p. 157–164, 1994.

GÓNZALEZ, A.; RAMÍREZ-LORCA, R.; CALATAYUD, C.; MENDOZA, N.; RUIZ, A.; SÁEZ, M. E.; MÓRON, F. J. Association of genetic markers within the BMP15 gene with anovulation and infertility in women with polycystic ovary syndrome. **Fertility and Sterility**, v. 90, n. 2, p. 447-449, 2008.

GROTEWOLD, L.; PLUM, M.; DILDROP, R.; PETERS, T.; RUETHER, U. Bambi is coexpressed with Bmp-4 during mouse embryogenesis. **Mechanisms of Development**, v. 100, p. 327–330, 2001

GUÉRIPEL, X.; BRUN, V.; GOUGEON, A. Oocyte bone morphogenetic protein 15, but not growth differentiation factor 9, is increased during gonadotropin induced follicular development in the immature mouse and is associated with cumulus oophorus expansion. **Biology of Reproduction**, v. 75, p. 836–843, 2006.

GUI, L. M.; JOYCE, I. M. RNA Interference evidence that Growth Differentiation Factor-9 mediates oocyte regulation of cumulus expansion in mice. **Biology of Reproduction**, v. 72, p. 195–199, 2005.

GUTIÉRREZ, C. G.; CAMPBELL, B. K.; WEBB, R. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of oestradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 608-616, 1997.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. Ed. Manole: Barueri, 2004, 530p.

HANRAHAN, J. P.; GREGAN, S. M.; MULSANT, P.; MULLEN, M.; DAVIS, G. H.; POWELL R.; GALLOWAY, S. M. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*ovis aries*). **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 900-909, 2004.

HANUKOGLU, I. Steroidogenic enzymes: structures, function, and roles in regulation of steroids hormones biosynthesis. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43, p. 779-804, 1992.

HASHIMOTO, O.; MOORE, R. K.; SHIMASAKI, S. Post translation processing of mouse and human BMP-15: potential implication in the determination of ovulation quota. **Proceedings of the National Academy Science**, v. 102, n. 15, p. 5426-5431, 2005.

HATA, A.; LAGNA, G.; MASSAGUE, J.; HEMMATI-BRIVANLOU, A. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. **Genes & Development**, v. 12, p. 186–197, 1998.

HAYASHI, H.; ABDOLLAH, S.; QIU, Y.; CAI, J.; XU, Y. Y.; GRINNELL, B. W.; RICHARDSON, M. A.; TOPPER, J. N.; GIMBRONE, M. A.; WRANA, J. L.; FALB, D. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. **Cell**, v. 89, p. 1165–1173, 1997.

HAYASHI, M.; MCGEE, E. A.; MIN, G.; KLEIN, C.; ROSE, U. M.; VAN DUIN, M.; HSUEH, A. J. W. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. **Endocrinology**, v. 140, n. 3, p. 1236-1244, 1999.

HELDIN, C. H.; MIYAZONO, K.; ten DIJKE, P. TGF- $\beta$  signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. **Nature**, 390, p. 465–471, 1997.

HICKEY, T. E.; MARROCCO, D. L.; GILCHRIST, R. B.; NORMAN, R. J.; ARMSTRONG, D. T. Interactions between androgen and growth factors in granulosa cell subtypes of porcine antral follicles. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 45–52, 2004.

HICKEY, T. E.; MARROCCO, D. L., AMATO, F.; RITTER, J. L.; NORMAN, R. J.; GILCHRIST, R. B.; ARMSTRONG, D. T. Androgens augment the mitogenic effects of oocyte-secreted factors and growth differentiation factor 9 on porcine granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v. 73, p. 825–832, 2005.

HINO, J.; TAKAO, M.; TAKESHITA, N.; KONNO, Y.; NISHIZAWA, T.; MATSUO, H.; KANGAWA, K. cDNA cloning and genomic structure of human bone morphogenetic protein-3B (BMP-3b). **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 223, p. 304–310, 1996.

HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary. **International Review of Cytology**, v. 124, p. 43-101, 1991.

HOGAN, B. L. M. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. **Genes & Development**, v. 10, p. 1580–1594, 1996.

HSUEH, A. J. W.; ADASHI, E. Y.; JONES, P. B. C.; WELSH, T. H. Hormonal regulation of differentiation of cultured ovarian granulosa cells. **Endocrinology Reviews**, v. 5, p. 76–127, 1984.

HUTT, K. J.; MCLAUGHLIN, E. A.; HOLLAND, M. K. Kit ligand and c-Kit have diverse roles during mammalian oogenesis and folliculogenesis. **Molecular Human Reproduction**, v. 12, p. 61–69, 2006.

IBEAGHA-AWEMU, E. M.; KGWATALALA, P.; IBEAGHA, A. E.; ZHAO, X. A critical analysis of disease-associated DNA polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep, and pig. **Mammalian Genome**, v. 19, n. 4, p. 226-245, 2008.

INMAN, G. J.; NICOLA' S, F. J.; CALLAHAN, J. F.; HARLING, J. D.; GASTER, L. M.; REITH, A. D.; LAPING, N. J.; HILL, C. S. SB-431542 is a potent and specific inhibitor of Transforming Growth Factor- $\beta$  Superfamily Type I Activin Receptor-Like Kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. **Molecular Pharmacology**, v. 62, n. 1, p. 65–74, 2002.

ISHISAKI, A.; YAMATO, K.; HASHIMOTO, S.; NAKAO, A.; TAMAKI, K.; NONAKA, K.; ten DIJKE, P.; SUGINO, H.; NISHIHARA, T. Differential inhibition of Smad6 and Smad7 on bone morphogenetic protein- and activin-mediated growth arrest and apoptosis in B cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 13637–13642, 1999.

ITOH, S.; LANDSTROM, M.; HERMANSSON, A.; ITOH, F.; HELDIN, C. H.; HELDIN, N. E.; ten DIJKE, P. Transforming growth factor beta1 induces nuclear export of inhibitory Smad7. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 29195–29201, 1998.

JAATINEN, R.; ROSEN, V.; TUURI, T.; RITVOS, O. Identification of ovarian granulosa cells as a novel site of expression for bone morphogenetic protein-3 (BMP-3/osteogenin) and regulation of BMP-3 messenger ribonucleic acids by chorionic gonadotropin in cultured human granulosa-luteal cells. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 81, p. 3877–3882, 1996.

JAATINEN, R.; LAITINEN, M.; VUOJOLAINEN, K.; AALTONEN, J.; LOUHIO, H.; HEIKINHEIMO, K.; LEHTONEN, E.; RITVOS, O. Localization of growth differentiation factor-9 (GDF-9) mRNA and protein in rat ovaries and cDNA cloning of rat GDF-9 and its novel homolog GDF-9B. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 156, p. 189–193, 1999.

JONES, W. K.; RICHMOND, E. A.; WHITE, K.; SASAK, H.; KUSMIK, W.; SMART, J.; OPPERMANN, H.; RUEGER, D. C.; TUCKER, R. F. Osteogenic protein- 1 (OP-1) expression and processing in Chinese hamster ovary cells: isolation of a soluble complex containing the mature and pro-domains of OP-1. **Growth Factors**, v. 11, p. 215–225, 1994.

JOYCE, I. M.; CLARK, A. T.; PENDOLA, F. L.; EPPIG, J. J. Comparison of recombinant growth differentiation factor-9 and oocyte regulation of KIT ligand messenger ribonucleic acid expression in mouse ovarian follicles. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1669– 1675, 2000.

JUENGEL, J. L.; HUDSON, N. L.; HEATH, D. A.; SMITH, P.; READER, K. L.; LAWRENCE, S. B.; O'CONNELL, A. R.; LAITINEN, M. P. E.; CRANFIELD, M.; GROOME, N. P.; RITVOS, O.; MCNATTY, K. P. Growth Differentiation Factor 9 and Bone Morphogenetic Protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1777–1789, 2002.

JUENGEL, J. L.; BODENSTEINER, K. J.; HEATH, D. A.; HUDSON, N. L.; MOELLER, C. L.; SMITH, P.; GALLOWAY, S. M.; DAVIS, G. H.; SAWYER, H. R.; MCNATTY, K. P. Physiology of GDF9 and BMP15 signaling molecules. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 447–460, 2004.

JUENGEL, J. L.; MCNATTY, K. P. The role of proteins of the transforming growth factor- $\beta$  superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. **Human Reproduction Update**, v. 11, n. 2, p. 144-161, 2005.

JUENDEL, J. L.; READER, K. L.; BIBBY, A. H.; LUN, S.; ROSS, I.; HAYDON, L. J.; MCNATTY, K. P. The role of bone morphogenetic proteins 2, 4, 6 and 7 during ovarian follicular development in sheep: contrast to rat. **Reproduction**, v. 131, p. 501-13, 2006.

JUNEJA, S. C.; CHEGINI, N.; WILLIAMS, R. S.; KSANDER, G. A. Ovarian intrabursal administration of transforming growth factor b 1 inhibits follicle rupture in gonadotropin-primed mice. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1444–1451, 1996.

KAIVO-OJA, N.; BONDESTAM, J.; KAMARAINEN, M.; KOSKIMIES, J.; VITT, U.; CRANFIELD, M.; VUOJOLAINEN, K.; KALLIO, J. P.; OLKKONEN, V. M.; HAYASHI, M.; MOUSTAKAS, A.; GROOME, N. P.; ten DIJKE, P.; HSUEH, A. J.; RITVOS, O. Growth Differentiation Factor-9 induces Smad2 activation and inhibin B production in cultured human granulosa-luteal cells. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, p. 755-762, 2003.

KAWABATA, M.; IMAMURA, T.; MIYAZONO, K. Signal transduction by Bone Morphogenetic Proteins. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 9, p. 49–61, 1998.

KNIGHT, P. G.; GLISTER, C. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. **Reproduction**, v. 121, p. 503–512, 2001.

KNIGHT, P. G.; GLISTER, C. Local roles of TGF-beta superfamily members in the control of ovarian follicle development. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 165–183, 2003.

KUBELKA, M.; MOTLIK, J.; FULKA, J. J.; PROCHAZKA, R.; RIMKEVIKOVA, Z.; FULKA, J. Time sequence of germinal vesicle breakdown in pig oocytes after cycloheximide and p-aminobenzamidine block. **Gamete Research**, v.19, p.423-431, 1988.

KUBOTA, T.; KAMADA, S.; TAGUCHI, M.; ASO, T. Autocrine/paracrine function of transforming growth factor-b 1 in porcine granulosa cells. **Human Reproduction**, v. 9, p. 2118–2122, 1994.

KUMAR, T. R.; WANG, Y.; LU, N.; MATZUK, M. M. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. **Nature Genetics**, v.15, p.201–204, 1997.

LAGNA, G.; HATA, A.; HEMMATI-BRIVANLOU, A.; MASSAGUE, J. Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF- $\beta$  signaling pathways. **Nature**, v. 383, p. 832–836, 1996.

LAISSUE, P.; CHRISTIN-MAITRE, S.; TOURAIN, P.; KUTTENN, F.; RITVOS, O.; AITOMAKI, K.; BOURCIGAUX, N.; JACQUESSON, L.; BOUCHARD, P.; FRYDMAN, R.; DEWAILLY, D.; REYSS, A-C.; JEFFERY, L.; BACHELOT, A.; MASSIN, N.; FELLOUS, M.; VEITIA, R. A. Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. **European Journal of Endocrinology**, v.154, p.739-744, 2006.

LAITINEN, M.; VUOJOLAINEN, K.; JAATINEN, R.; KETOLA, I.; AALTONEN, J.; LEHTONEN, E.; HEIKINHEIMO, M.; RITVOS, O. A novel Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis. **Mechanisms of development**, v. 78, p. 135–140, 1998.

LAN, Z. J.; GU, P.; XU, X.; JACKSON, K.; DEMAYO, F. J.; O'MALLEY, B. W.; COONEY, A. J. GCNF-dependent repression of BMP-15 and GDF-9 mediates gamete regulation of female fertility. **The Embo Journal**, v. 22, n. 16, p. 1-12, 2003.

LANUZA, G. M.; FISCHMAN, M. L.; BARANAO, J. L. Growth promoting activity of oocytes on granulosa cells is decreased upon meiotic maturation. **Developmental Biology**, v. 197, p. 129–139, 1998.

LAU, A. L.; MATZUK, M. M. Transgenic models in the study of reproduction. **Gravitational and space biology bulletin**, v.12, p. 75–82, 1999.

LEHMANN, K.; SEEMAN, P.; STRICKER, S.; SAMMAR, M.; MEYER, B.; SURING, K.; MAJEWSKI, F.; TINSCHERT, S.; GRZESCHIK, K-H.; MULLER, D.; KNAUS, P.; NURNBERG, P.; MUNDLOS, S. Mutations in bone morphogenetic protein receptor 1B cause brachydactyly type A2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 21, p. 12277-12282, 2003.

LEWIN, B. **Genes VII**. Ed. Artmed: São Paulo, 2001, 930p.

LI, R.; NORMAN, R. J.; ARMSTRONG, D. T.; GILCHRIST, R. B. Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 839–845, 2000.

LI, H. K.; KUO, T. Y.; YANG, H. S.; CHEN, L. R.; LI, S. S. L.; HUANG, H. W. Differential gene expression of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 during *in vitro* maturation of porcine oocytes and early embryos. **Animal Reproduction Science**, v.103, p.312–322, 2008a.

LI, Q.; MCKENZIE, L. J.; MATZUK, M. M. Revisiting oocyte–somatic cell interactions: in search of novel intrafollicular predictors and regulators of oocyte developmental competence. **Molecular Human Reproduction**, v. 14, n. 12, p. 673–678, 2008b.

LIAO, W. X.; MOORE, R. K.; OTSUKA, F.; SHIMASAKI, S. Effect of intracellular interactions on the processing and secretion of Bone Morphogenetic Protein-15 (BMP-15) and Growth and Differentiation Factor-9. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 6, p. 3713–3719, 2003

LIAO, W. X.; MOORE, R. K.; SHIMASAKI, S. Functional and molecular characterization of naturally occurring mutations in the oocyte-secreted factors BMP-15 and GDF-9. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 17391–17396, 2004.

LOPEZ-CASILLAS, F.; WRANA, J. L.; MASSAGUÉ, J. Betaglycan presents ligand to the TGF  $\beta$  signaling receptor. **Cell**, v. 73, p. 1435–1444, 1993.

LUCK, M. R.; RODGERS, R. J.; FINDLAY, J. K. Secretion and gene expression of inhibin, oxytocin and steroid hormones during the in vitro differentiation of bovine granulosa cells. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 2, p. 11-25, 1990.

LUX, A.; ATTISANO, L.; MARCHUK, D. A. Assignment of transforming growth factor  $\beta$ 1 and  $\beta$ 3 and a third new ligand to the type I receptor ALK-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 9984–9992, 1999.

LYONS, K. M.; PELTON, R. W.; HOGAN, B. L. M. Patterns of expression of murine Vgr-1 and BMP-2a RNA suggest that transforming growth factor- $\beta$ - like genes coordinately regulate aspects of embryonic development. **Genes Development**, v. 3, p. 1657–68, 1989.

MASSAGUÉ, J.; ATTISANO, L.; WRANA, J. L. The TGF-beta family and its composite receptors. **Trends in Cell Biology**, v. 4, p. 172–178, 1994.

MASSAGUÉ, J.; HATA, A.; LIU, F. TGF- $\beta$  signalling through the Smad pathway. **Trends in Cell Biology**, v. 7, p. 187–192, 1997.

MASSAGUÉ, J. TGF-beta signal transduction. **Annual Review of Biochemistry**, v. 67, p. 753–791, 1998.

MASSAGUÉ, J. How cells read TGF- $\beta$  signals. **Nature reviews: Molecular Cell Biology**, v. 1, p. 169-178, 2000.

MASSAGUÉ, J. WOTTON, D. Transcriptional control by the TGF- $\beta$  /Smad signaling system. **The Embo Journal**, v. 19, n. 8, p. 1745- 1754, 2000.

MAZERBOURG, S.; KLEIN, C.; ROH, J.; KAIVO-OJA, N.; MOTTERSHEAD, D. G.; KORCHYNSKI, O.; RITVOS, O. Growth differentiation factor-9 signaling is mediated by the type I receptor, activin receptor-like kinase 5. **Molecular Endocrinology**, v.18, p.653-665, 2004.

McGEE, E. A.; HSUEH, A. J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrinology Reviews**, v. 21, p. 200–214, 2000.

McGRATH, S. A.; ESQUELA, A. F.; LEE, S. J. Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. **Molecular Endocrinology**, v. 9, p. 131–136, 1995.

McNATTY, K. P.; JUENGEL, J. L.; WILSON, T.; GALLOWAY, S. M.; DAVIS, G. H.; HUDSON, N. L.; MOELLER, C. L.; CRANFIELD, M.; READER, K. L.; LAITINEN, M. P.; GROOME, N. P.; SAWYER, H. R.; RITVOS, O. Oocyte derived growth factors and ovulation rate in sheep. **Reproduction**, v. 61, p. 339–351, 2003.

McNATTY, K. P.; MOORE, L. G.; HUDSON, N. L.; QUIRKE, L. D.; LAWRENCE, S. B.; READER, K.; HANRAHAN, J. P.; SMITH, P.; GROOME, N. P.; LAITINEN, M.; RITVOS, O.; JUENGEL, J. L. The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. **Reproduction Review**, v. 128, p. 379-386, 2004.

McNATTY, K. P.; SMITH, P.; MOORE, L. G.; READER, K.; LUN, S.; HANRAHAN, J. P.; GROOME, N. P.; LAITINEN, M.; RITVOS, O.; JUENGEL, J. L. Oocyte expressed genes affecting ovulation rate. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 234, p. 57-66, 2005a.

McNATTY, K. P.; JUENGEL, J. L.; READER, K. L.; LUN, S.; MYLLYMAA, S.; LAWRENCE, S. B.; WESTERN, A.; MEERASAHIB, M. F.; MOTTERSHEAD, D. G.; GROOME, N. P.; RITVOS, O.; LAITINEN, M. P. E. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function. **Reproduction**, v. 129, p. 473-480, 2005b.

McPHERRON, A. C.; LEE, S. J. GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor- $\beta$  superfamily containing a novel pattern of cysteines **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 3444-3449, 1993.

MIYAZONO, K. TGF- $\beta$  signaling by Smad proteins. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 11, p. 15-22, 2000.

MOORE, R. K.; OTSUKA, F.; SHIMASAKI, S. Molecular basis of Bone Morphogenetic Protein-15 signaling in granulosa cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 1, p. 304-310, 2003.

MOORE, K.; THATCHER, W.W. Major advances associated with reproduction in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 1254-1266, 2006.

MOTTERSHEAD, D. G.; PULKKI, M. M.; MUGGALLA, P.; PASTERNAK, A.; TOLONEN, M.; MYLLYMAA, S.; KORCHYNSKYI, O.; NISHI, Y.; YANASE, T.; LUN, S.; JUENGEL, J. L.; LAITINEN, M.; RITVOS, O. Characterization of recombinant human growth differentiation factor-9 signaling in ovarian granulosa cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 283, p. 58-67, 2008.

MULSANT, P.; LECERF, F.; FABRE, S.; SCHIBLER, L.; MONGET, P.; LANNELUC, I.; PISSELET, C.; RIQUET, J.; MONNIAUX, D.; CALLEBAUT, I.; CRIBIU, E.; THIMONIER, J.; TEYSSIER, J.; BODIN, L.; COGNIE, Y.; CHITOUR, N.; ELSSEN, J. M. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-1B is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. **Proceedings of the National Academy Science**, v. 98, p. 5104-5109, 2001.

NAKAO, A.; IMAMURA, T.; SOUCHELNYTSKYI, S.; KAWABATA, M.; ISHISAKI, A.; OEDA, E.; TAMAKI, K.; HANAI, J.; HELDIN, C. H.; MIYAZONO, K.; ten DIJKE, P. TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. **The Embo Journal**, v. 16, p. 5353-5362, 1997.

NEWFELD, S. J.; WISOTZKEY, R. G.; KUMAR, S. Molecular evolution of a developmental pathway: phylogenetic analyses of transforming growth factor- $\beta$  family ligands, receptors and Smad signal transducers. **Genetics**, v. 152, p. 783-795, 1999.

NISHIMURA, R.; KATO, Y.; CHEN, D.; HARRIS, S. E.; MUNDY, G. R.; YONEDA, T. Smad5 and DPC4 are key molecules in mediating BMP-2- induced osteoblastic differentiation of the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 1872-1879, 1998.

OJEDA, S. R. Female reproductive function. In: GRIFFIN, J. E.; OJEDA, S. R. **Textbook of Endocrine Physiology**. 3 ed. New York: Oxford University Press, 1996. p.165-200.

ONICHTCHOUK, D.; CHEN, Y. G.; DOSCH, R.; GAWANTKA, V.; DELIUS, H.; MASSAGUE, J.; NIEHRS, C. Silencing of TGF- $\beta$  signaling by the pseudoreceptor BAMBI. **Nature**, v. 401, p. 480–485, 1999.

ORISAKA, M.; ORISAKA, S.; JIANG, J. Y.; CRAIG, J.; WANG, Y.; KOTSUJI, F.; TSANG, B. K. Growth Differentiation Factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. **Molecular Endocrinology**, v. 20, n. 10, p. 2456–2468, 2006.

ORISAKA, M.; JIANG, J. Y.; ORISAKA, S.; KOTSUJI, F.; TSANG, B. K. Growth Differentiation Factor 9 promotes rat preantral follicle growth by up-regulating follicular androgen biosynthesis. **Endocrinology**, v. 150, n. 6, p. 2740–2748, 2009.

OTSUKA, F.; YAO, Z.; LEE, T.; YAMAMOTO, S.; ERICKSON, G. F.; SHIMASAKI, S. Bone morphogenetic protein-15: Identification of target cells and biological functions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 50, p. 39523-39528, 2000.

OTSUKA, F.; YAMAMOTO, S.; ERICKSON, G. F.; SHIMASAKI, S. Bone Morphogenetic Protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 14, p. 11387–11392, 2001.

OTSUKA, F.; SHIMASAKI, S. A novel function of Bone Morphogenetic Protein-15 in the pituitary: selective synthesis and secretion of FSH by gonadotropes. **Endocrinology**, v. 146, n. 12, p. 4938-4941, 2002.

OTSUKA, F.; MOORE, R. K.; WANG, X.; SHARMA, S.; MIYOSHI, T.; SHIMASAKI, S. Essential role of the oocyte in estrogen amplification of follicle-stimulating hormone signaling in granulosa cells. **Endocrinology**, v. 146, n. 8, p. 3362-3367, 2005.

PAKARAINEN, T.; ZHANG, F-P.; NUMI, L.; POUTANEN, M.; HUHTANIEMI, I. Knockout of luteinizing hormone receptor abolishes the effects of follicle-stimulating hormone on preovulatory maturation and ovulation of mouse graafian follicles. **Molecular Endocrinology**, v. 19, n. 10, p. 2591-2602, 2005.

PALMER, J. S.; ZHAO, Z. Z.; HOEKSTRA, C.; HAYWARD, N. K.; WEBB, P. M.; WHITEMAN, D. C.; MARTIN, N. G.; BOOMSMA, D. I.; DUFFY, D. L.; MONTGOMERY, G. W. Novel variants in growth differentiation factor 9 in mothers of dizygotic twins. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, p. 4713-4716, 2006.

PANGAS, S. A.; MATZUK, M. M. The art and artifact of GDF9 activity: cumulus expansion and the cumulus expansion-enabling factor. **Biology of Reproduction**, v. 73, p. 582–585, 2005.

PENG, X. R.; HSUEH, A. J. W.; LAPOLT, P. S.; BJERSING, L.; NY, T. Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. **Endocrinology**, v. 129, p. 3200–3207, 1991.

- PINCUS, G.; ENZMANN, E. The comparative behaviour of mammalian eggs in vivo and in vitro. **Journal of Experimental Medicine**, v. 62, p. 665-675, 1935.
- QU, J.; GODIN, P. A.; NISOLLE, M.; DONNEZ, J. Expression of receptors for insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-b in human follicles. **Molecular Human Reproduction**, v. 6, p. 137–145, 2000.
- REISSMANN, E.; JORNVALL, H.; BLOKZIJL, A.; ANDERSSON, O.; CHANG, C.; MINCHIOTTI, G.; PERSICO, M. G.; IBANEZ, C. F.; BRIVANLOU, A. H. The orphan receptor ALK7 and the activin receptor ALK4 mediate signaling by nodal proteins during vertebrate development. **Genes & Development**, v. 15, p. 2010–2022, 2001.
- RICHARDS, J. S. Hormonal control of gene expression in the ovary. **Endocrinology Reviews**, v. 15, p. 725-751, 1994.
- RICHARDS, J. S.; FITZPATRICK, S. L.; CLEMENS, J. W.; MORRIS, J. K.; ALLISTON, T.; SIROIS, J. Ovarian cell differentiation: a cascade of multiple hormones, cellular signals, and regulated genes. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 50, p. 223–254, 1995.
- ROBERTS, A. J.; ECHTERNKAMP, S. E. In vitro production of estradiol by bovine granulosa cells: evaluation of culture condition, stage of follicular development, and location of cells within follicles. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 273-282, 1994.
- ROCHE, J. F.; MIHM, M.; DISKIN, M. G.; IRELAND, J. J. A review of regulation of follicle growth in cattle. **Journal Animal Science**, v. 76, p. 16-29, 1998.
- ROH, J. S.; BONDESTAM, J.; MAZERBOURG, S.; KAIVO-OJA, N.; GROOME, N.; RITVOS, O.; HSUEH, A. J. Growth differentiation factor-9 stimulates inhibin production and activates smad2 in cultured rat granulosa cells. **Endocrinology**, v. 144, p. 172-178, 2003.
- ROMERO, S.; SMITZ, J. Improvement of in vitro culture of mouse cumulus-oocyte complexes using PDE3-inhibitor followed by meiosis induction with epiregulin. **Fertility and Sterility**, v. 90, p. 2133-2137, 2008.
- ROY, S. K.; KOLE, A. R. Ovarian transforming growth factor-b (TGF-b) receptors: in-vitro effects of follicle stimulating hormone, epidermal growth factor and TGF-b on receptor expression in human pré-antral follicles. **Molecular Human Reproduction**, v. 4, p. 207–214, 1998.
- SADIGHI, M.; BODENSTEINER, K. J.; BEATTIE, A. E.; GALLOWAY, S. M. Genetic mapping of ovine growth differentiation factor 9 (GDF9) to sheep chromosome 5. **Animal Genetics**, v. 33, p. 244–245, 2002.
- SAHARINEN, J.; HYYTIAINEN, M.; TAIPALE, J.; KESKI-OJA, J. Latent transforming growth factor-b binding proteins (LTBPs)-structural extracellular matrix proteins for targeting TGFb action. **Cytokine Growth Factor Reviews**, v. 10, p. 99–117, 1999.

- SAHMI, M.; NICOLA, E. S.; SILVA, J. M.; PRICE, C. A. Expression of 17 $\beta$ - and 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases and steroidogenic acute regulatory protein in non-luteinizing bovine granulosa cells in vitro. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 223, p. 43–54, 2004.
- SAITO, S.; YANO, K.; SHARMA, S.; MCMAHON, H. E.; SHIMASAKI, S. Characterization of the post-translational modification of recombinant human BMP-15 mature protein. **Protein Science**, v. 17, p. 362–370, 2008.
- SALUSTRI, A.; YANAGISHITA, M.; HASCALL, V. C. Mouse oocytes regulate hyaluronic acid synthesis and mucification by FSH-stimulated cumulus cells. **Developmental Biology**, v. 138, p. 26–32, 1990.
- SCARAMUZZI, R.; ADAMS, N. R.; BAIRD, D. T.; CAMPBELL, B. K.; DOWNING, J. A.; FINDLAY, J. K.; HENDERSON, K. M.; MARTIN, G. B.; McNATTY, K. P.; McNEILLY, A. S.; TSONIS, C. G. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, p. 459–478, 1993.
- SCHLUNEGGER, M. P.; GRUTTER, M. G. An unusual feature revealed by the crystal structure at 2.2 °A resolution of human transforming growth factor beta 2. **Nature**, v. 358, p. 430–434, 1992.
- SCHULTZ-CHERRY, S.; LAWLER, J.; MURPHY-ULLRICH, J. E. The type 1 repeats of thrombospondin 1 activate latent transforming growth factor-b. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 26783–26788, 1994.
- SIMON, A. M.; GOODENOUGH, D. A.; LI, E.; PAUL, D. L. Female infertility in mice lacking connexin 37. **Nature**, v. 385, p. 525–529, 1997.
- SHACKELL, G. H.; HUDSON, N. L.; HEATH, D. A.; LUN, S.; SHAW, L.; CONDELL, L.; BLAY, L. R.; McNATTY, K. P. Plasma gonadotropin concentrations and ovarian characteristics in Inverdale ewes that are heterozygous for a major gene (FecX1) on the X chromosome that influences ovulation rate. **Biology of Reproduction**, v. 48, p. 1150–1156, 1993.
- SHIMADA, M.; HERNANDEZ-GONZALEZ, I.; GONZALEZ-ROBAYNA, I.; RICHARDS, 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.
- SHIMASAKI, S.; ZACHOW, R. J.; LI, D.; KIM, H.; IEMURA, S.; UENO, N.; SAMPATH, K.; CHANG, R. J.; ERICKSON, G. F. A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 7282–7287, 1999.
- SHIMASAKI, S.; MOORE, R. K.; OTSUKA, G.; ERICKSON, G. F. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 1, p. 72–101, 2004.
- SKINNER, M. K. Regulation of primordial follicle assembly and development. **Human Reproduction Update**, v. 11, p. 461–471, 2005.

SOLOVYEVA, E. V.; HAYASHI, M.; MARGI, K.; BARKATS, C.; KLEIN, C.; AMSTERDAM, A.; HSUEH, A. J.; TSAFRIRI, A. Growth differentiation factor-9 stimulates rat theca-interstitial cell androgen biosynthesis. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1214-1218, 2000.

SOUHELNYTSKYI, S.; NAKAYAMA, T.; NAKAO, A.; MOREN, A.; HELDIN, C. H.; CHRISTIAN, J. L.; ten DIJKE, P. Physical and functional interaction of murine and *Xenopus* Smad7 with bone morphogenetic protein receptors and transforming growth factor-beta receptors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 25364–25370, 1998.

SOUZA, C. J. H.; CAMPBELL, B. K.; MCNEILLY, A. S.; BAIRD, D. T. Effect of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on oestradiol and inhibin A production by sheep granulosa cells, and localization of BMP receptors in the ovary by immunohistochemistry. **Reproduction**, v. 123, p. 363–369, 2002.

SOUZA, C. J.; CAMPBELL, B. K.; MCNEILLY, A. S.; BAIRD, D. T. Bone morphogenetic proteins and folliculogenesis: lessons from the Booroola mutation. **Reproduction**, v. 61, p. 361-370, 2003.

SOUZA, C. J. H.; MELO, E. O.; MORAES, J. C. F.; BAIRD, D. T. **Role of bone morphogenetic proteins in follicle development**. In: Antonio González-Bulnes. (Org.). *Novel Concepts in Ovarian Endocrinology*. 1 ed. Kerala - India: Transworld Research Network, 2007, v. 1, p. 27-42.

SPICER, L. J.; AAD, P. Y.; ALLEN, D.; MAZERBOURG, S.; HSUEH, A. J. Growth differentiation factor-9 has divergent effects on proliferation and steroidogenesis of bovine granulosa cells. **Journal of Endocrinology**, v. 189, p. 329-339, 2006.

STOCK, A. E.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. **Endocrinology**, 132, p. 1108-1114, 1993.

STRAUSS, J. F.; HSUEH, A. J. Ovarian hormone synthesis. In: THE GROOT L. J. **Endocrinology**. 4 ed. Pennsylvania: WB Saunders Company, 2001. p. 2043-2052.

SU, Y. Q.; WU, X.; O'BRIEN, M. J.; PENDOLA, F. L.; DENEGRE, J. N.; MATZUK, M. M.; EPPIG, J. J. Synergistic roles of BMP15 and GDF9 in the development and function of the oocyte–cumulus cell complex in mice: genetic evidence for an oocyte–granulosa cell regulatory loop. **Developmental Biology**, v. 276, p. 64–73, 2004.

SUNYAEV, S.; RAMENSKY, V.; KOCH, I.; LATHE, W.; KONDRASHOV, A. S.; BORK, P. Prediction of deleterious human alleles. **Human Molecular Genetics**, v. 10, n. 6, p. 591-597, 2001.

SUTTON, M. L.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. **Human Reproduction Update**, v. 9, p. 35–48, 2003.

TAKAO, M.; HINO, J.; TAKESHITA, N.; KONNO, Y.; NISHIZAWA, T.; MATSUO, H.; KANGAWA, K. Identification of rat bone morphogenetic protein-3b (BMP-3b), a new member of BMP-3. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 219, p. 656–662, 1996.

TEIXEIRA FILHO, F. L.; BARACAT, E. C.; LEE, T. H.; SUH, C. S.; MATSUI, M.; CHANG, R. J.; SHIMASAKI, S.; ERICKSON, G. F. Aberrant expression of growth differentiation factor-9 in oocytes of women with polycystic ovary syndrome. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 3, p. 1337–1344, 2002.

ten DIJKE, P.; GOUMANS, M. J.; ITOH, F.; ITOH, S. Regulation of cell proliferation by Smad proteins. **Journal of Cellular Physiology**, v. 191, p. 1–16, 2002.

TSAFRIRI, A.; POMERANTZ, S.H. Regulation of the development of meiotic competence and of the resumption of oocyte maturation in the rat. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v. 38, p. 25-43, 1984.

URIST, M. R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, v. 150, p. 893– 899, 1965.

URIST, M. R.; IWATA, H.; CECCOTTI, P. L.; DORFMAN, R. L.; BOYD, S. D.; MCDOWELL, R. M.; CHIEN, C. Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, p. 3511–3515, 1973.

VALLE, E. R.; DODE, M. A. N. Efeito do tempo e da temperatura entre a coleta e a centrifugação, na concentração de progesterona do soro e plasma de vacas Nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, p. 479-485, 1991.

VAN DER HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, p. 1717-1751, 2005.

VANDERHYDEN, B. C.; TELFER, E. E.; EPPIG, J. J. Mouse oocytes promote proliferation of granulosa cells from preantral and antral follicles *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 1196–1204, 1992.

VANDERHYDEN, B. C.; COHEN, J. N.; MORLEY, P. Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis. **Endocrinology**, v. 133, p. 423–426, 1993.

VANDERHYDEN, B. C.; TONARY, A. M. Differential regulation of progesterone and estradiol production by mouse cumulus and mural granulosa cells by a factor(s) secreted by the oocyte. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 1243– 1250, 1995.

VANDERHYDEN, B. C.; MACDONALD, E. A. Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis through follicular development. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 1296-1301, 1998.

VANDERHYDEN, B. C.; MACDONALD, E. A.; NAGYOVA, E.; DHAWAN, A. Evaluation of members of the TGF $\beta$  superfamily as candidates for the oocyte factors that control mouse cumulus expansion and steroidogenesis. **Reproduction**, v. 61, p. 55–70, 2003.

VERNON, R.; SPICER, L. J. Effects of basic fibroblast growth factor and heparin on follicle-stimulating hormone-induced steroidogenesis by bovine granulosa cells. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 2696-2702, 1994.

VITT, U. A.; HAYASHI, M.; KLEIN, C.; HSUEH, A. J. W. Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 370–377, 2000a.

VITT, U. A.; MCGEE, E. A.; HAYASHI, M.; HSUEH, A. J. In vivo treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker *CYP17* in ovaries of immature rats. **Endocrinology**, v. 141, p. 3814-3820, 2000b.

VITT, U. A.; HSUEH, A. J. Stage-dependent role of growth differentiation factor-9 in ovarian follicle development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 183, p. 171–177, 2001.

VITT, U. A.; MAZERBOURG, S.; KLEIN, C.; HSUEH, A. J. Bone morphogenetic protein receptor type II is a receptor for growth differentiation factor-9. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 473–480, 2002.

WANG, E. A.; ROSEN, V.; D'ALESSANDRO, J. S.; BAUDUY, M.; CORDES, P.; HARADA, T.; ISRAEL, D. I.; HEWICK, R. M.; KERNS, K. M.; LAPAN, P.; LUXENBERG, D. H.; MCQUID, D.; MOUTSATSOS, I. K.; NOVE, J.; WOZNEY, J. M. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, p. 2220–2224, 1990.

WANG, X. N.; GREENWALD, G. S. Human chorionic gonadotropin or human recombinant follicle-stimulating hormone (FSH)-induced ovulation and subsequent fertilization and early embryo development in hypophysectomized FSH-primed mice. **Endocrinology**, v.132, p. 2009–2016, 1993.

WANG, D. G.; FAN, J. B.; SIAO, C. J.; BERNO, A.; YOUNG, P.; SAPOLSKY, R.; GHANDOUR, G.; PERKINS, N.; WINCHESTER, E.; SPENCER, J.; KRUGLYAK, L.; STEIN, L.; HSIE, L.; TOPALOGLOU, T.; HUBBELL, E.; ROBINSON, E.; MITTMANN, M.; MORRIS, M. S.; SHEN, N.; KILBURN, D.; RIOUX, J.; NUSBAUM, C.; ROZEN, S.; HUDSON, T. J.; LIPSHUTZ, R.; CHEE, M.; LANDER, E. S. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. **Science**, v. 280, p. 1077-1082, 1998.

WANG, J.; ROY, S. K. Growth differentiation factor-9 and stem cell factor promote primordial follicle formation in the hamster: modulation by follicle-stimulating hormone. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 577–585, 2004.

WEBB, R.; NICHOLAS, B.; GONG, J. G.; CAMPBELL, B. K.; GUTIERREZ, C. G.; GARVERICK, H. A.; ARMSTRONG, D. G. Mechanism regulating follicular development and selection of the dominant follicle. **Reproduction in Domestic Ruminants**, v. 61, p. 71–90, 2003.

WHITELAW, P. F.; SMYTH, C. D.; HOWLES, C. M.; HILLIER, S. G. Cell-specific expression of aromatase and LH receptor mRNAs in rat ovary. **Journal of Molecular Endocrinology** v. 9, p. 309–312, 1992.

WILLIAMS, R. H.; LARSEN, P. R. **Textbook of Endocrinology**. ed. Saunders Company: Philadelphia:, 2003, 750p.

WILSON, T.; WU, X. Y.; JUENGEL, J. L.; ROSS, I. K.; LUMSDEN, J. M.; LORD, E. A.; DODDS, K. G.; WALLING, G. A.; MCEWAN, J. C.; O'CONNELL, A. R.; McNATTY, K. P.; MONTGOMERY, G. W. Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1225–1235, 2001.

WILTBANK, M.C.; GÜMEN, A., SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 21-52, 2002.

WOZNEY, J. M.; ROSEN, V.; CELESTE ,A. J.; MITSOCK, L. M.; WHITTERS, M. J.; KRIZ, R. W.; HEWICK, R. M.; WANG, E. A. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. **Science**, v. 242, p. 1528–1534, 1988.

WU, B.; IGNOTZ, G. G.; CURRIE, B.; YANG, X. Temporal distinctions in the synthesis and accumulation of proteins by oocytes and cumulus cells during maturation in vitro of bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 40, p. 338-344, 1996.

WU, X.; MATZUK, M. M. GDF-9 and BMP-15: oocyte organizers. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, v. 3, p. 27-32, 2002.

YAN, C.; WANG, P.; DEMAYO, J.; DEMAYO, F. J.; ELVIN, J. A.; CARINO, C.; PRASAD, S. V.; SKINNER, S. S.; DUNBAR, B. S.; DUBE, J. L.; CELESTE, A. J.; MATZUK, M. M. Synergistic roles of Bone Morphogenetic Protein 15 and Growth Differentiation Factor 9 in ovarian function. **Molecular Endocrinology**, v. 15, n. 6, p. 854–866, 2001.

YOSHINO, O.; MCMAHON, H. E.; SHARMA, S.; SHIMASAKI, S. A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 28, p. 10678-10683, 2006.

## **CAPÍTULO 2**

## 1 RESUMO

Os sistemas de cultivo de células da granulosa vêm se desenvolvendo com o intuito de assemelhar-se às condições esteroidogênicas encontradas *in vivo* no folículo ovariano. A remoção do ovócito resulta na luteinização espontânea das células somáticas foliculares, com alteração no padrão esteroidogênico, que também acontece quando estas células são colocadas em cultivo. Os fatores secretados pelo ovócito *GDF9* e *BMP15* possuem uma atuação importante, entretanto, ainda não totalmente esclarecida durante o processo de luteinização das células da granulosa. Com este trabalho objetivou-se expressar os genes *GDF9* e *BMP15* em cultivo de células da granulosa bovinas transgênicas e avaliar seus efeitos no processo de luteinização. Para a análise da luteinização, foram utilizados cultivo de células da granulosa transfectadas por lipossomos com vetores portando os genes *GDF9* e *BMP15*, com coleta de meio e células obtidas diariamente durante 21 dias para dosagens de hormônios esteróides e análise da expressão gênica. Como marcador do processo de luteinização foi utilizado o gene *Star*. A partir do mRNA das células foi possível verificar a expressão do *GDF9*, *BMP15* e de seus respectivos receptores (*ALK5*, *ALK6* e *BMPRII*). A análise da atividade esteroidogênica das células transgênicas demonstrou que a presença de *GDF9* e *BMP15* exerce inibição na produção do hormônio progesterona. O gene *Star*, principal fator limitante da esteroidogênese, foi inibido após o pico de produção de progesterona, o que indicou uma provável atuação do *GDF9* e *BMP15* por meio desta via. Esse estudo aborda novas informações, que contribuem para o entendimento dos mecanismos moleculares e parácrinos pelos quais o ovócito é capaz de inibir a luteinização das células da granulosa, antes do início dos processos de maturação ovocitária e ovulação iniciados pelo pico de LH.

Palavras chave: células transgênicas, superfamília TGF $\beta$ , foliculogênese, reprodução animal

## ABSTRACT

Granulosa cell culture is carried out to establish a similar steroidogenesis environment found in ovarian follicles. Somatic follicular cells spontaneously luteinize and modify their steroidogenesis activity when the oocyte is removed in the same way it happens *in vivo*. The *GDF9* and *BMP15* are oocyte secreted factors that have an important role on the luteinization of granulosa cells, but their effects are not totally understood. With the culture of transgenic bovine granulosa cells this work aimed to express the genes *GDF9* and *BMP15* and evaluate their effects on the luteinization process. Samples of cells and culture medium were obtained during 21 consecutive days to analyze the steroidogenic hormones concentration and gene expression. To confirm the expression of *GDF9*, *BMP15* and their respective receptors (*ALK5*, *ALK6* e *BMPRII*) the cDNA were amplified by PCR. The analysis of steroidogenic activity of transgenic cells demonstrated that the presence of *GDF9* e *BMP15* inhibits the production of progesterone and *Star* gene expression. The *Star* gene is the most limiting factor of steroidogenesis, and was used as a molecular marker of the luteinization process. This indicates that the inhibitory effect of *GDF9* and *BMP15* on the steroidogenesis use the *Star* pathway. This study shed light in the molecular and paracrine mechanisms, by which the oocyte can inhibit the luteinization of granulosa cells before the induction of maturation and ovulation by the LH peak.

Keywords: transgenic cells, TGF $\beta$  superfamily, folliculogenesis, animal reproduction

### 3 INTRODUÇÃO

A remoção do ovócito do folículo ovariano resulta na luteinização espontânea das células somáticas foliculares, com alteração no padrão esteroidogênico. Isso ocorre devido à perda de sinalização entre o ovócito e as células da granulosa (Lanuza et al, 1998; Tsafirri & Pomerantz, 1984). Nos sistemas *in vitro*, o tempo de cultivo destas células determina o decréscimo de estradiol e o incremento de progesterona, à medida que ocorre luteinização, o que indica que esses sistemas são apropriados para o estudo da esteroidogênese de células da granulosa (Luck et al., 1990; Hirshfield, 1991; Gong et al., 1994; Vernon & Spicer, 1994; Gutiérrez et al., 1997).

No ambiente folicular, as células da granulosa sofrem ações endócrinas bem caracterizadas no processo de desenvolvimento dos folículos ovarianos, entretanto os mecanismos moleculares envolvidos ainda não estão completamente elucidados (Roberts & Echaternkamp, 1994; Gutiérrez et al., 1997). Estudos recentes da comunicação intrafolicular entre as células germinativas e células somáticas revelaram a descoberta de fatores secretados pelo ovócito, capazes de atuar diretamente nos processos coordenados de maturação folicular através de sinalização parácrina (Li et al., 2008).

Dentre os fatores secretados pelo ovócito, se destacam os hormônios *GDF9* (*Growth and Differentiation Factor 9*) e *BMP15* (*Bone Morphogenetic Protein 15*), que na espécie bovina são expressos em todos os estágios do desenvolvimento folicular (Juengel & McNatty, 2005). Esses fatores são fundamentais para ativação dos folículos primordiais e posterior desenvolvimento e diferenciação folicular, estão envolvidos nas etapas finais do processo de maturação e nos eventos que antecedem a ovulação, entre eles a expansão das células do *cumulus oophorus* (Dong et al., 1996; Hanrahan et al., 2004; Yoshino et al., 2006). A presença de *GDF9* e *BMP15* inibe a ação dos hormônios esteróides estradiol e progesterona

e incrementa a propagação celular, o que indica a atuação destes fatores como mediadores da esteroidogênese (Scaramuzzi et al., 1993).

O aumento da síntese de progesterona associado com a transição do estágio gonadotrofina-responsivo para o estágio gonadotrofina-dependente *in vivo* e o incremento da secreção *in vitro* quando as células da granulosa são removidas do ambiente folicular, indicam a tendência das células da granulosa de ruminantes em se luteinizar (Campbell, 1988; Campbell et al., 1996). No entanto, a maior parte dos trabalhos relacionados à atuação dos fatores secretados pelo ovócito é realizada a partir de células de camundongos e humanas, com a adição dos fatores *GDF9* e *BMP15* no meio de cultura. Esses fatores produzidos *in vitro* necessitam ser isolados e purificados, para posteriormente serem adicionados ao meio de cultivo. Entretanto, estudos anteriores mostram o efeito de subprodutos exógenos produzidos durante o processo de isolamento e purificação no cultivo *in vitro* de complexos *cumulus*-ovócito (Hussein et al., 2006).

Dessa forma, neste trabalho o processo de luteinização das células da granulosa foi abordado de maneira alternativa, através de um modelo de cultivo celular com células transgênicas capazes de produzir *GDF9*, *BMP15* e seus receptores. Portanto, essas células seriam aptas a responder a presença desses fatores de maneira autócrina quando cultivadas *in vitro*. Essa abordagem nos permitiu observar o efeito inibitório do *GDF9* e *BMP15* sobre a produção de progesterona, indicando uma provável ação desses hormônios parácrinos no bloqueio do processo de diferenciação das células da granulosa de bovino *in vitro*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento experimental

Para a expressão do *GDF9* e *BMP15* em células bovinas, os genes foram clonados em vetores de expressão, sequenciados e purificados a partir do DNA plasmidial. Após purificação, foram transfectados em cultivo de células bovinas por meio de lipossomos e selecionados com antibiótico.

Para a análise da luteinização, foram utilizados cultivo de células da granulosa transfectadas por meio de lipossomos com *GDF9* e *BMP15*. A partir das células foi realizada a expressão gênica do *BMP15*, *GDF9* e seus receptores, assim como do marcador da luteinização *Star*. Os meios foram utilizados para dosagens hormonais.

Todos os reagentes utilizados foram adquiridos junto à Invitrogen do Brasil, exceto as exceções que estão especificadas no texto.

### 4.2 Colheita dos complexos *cumulus oophorus*

Ovários de fêmeas bovinas foram coletados em abatedouro na região do entorno de Brasília/DF e transportados em solução salina (0,9% de NaCl) acrescida de antibióticos (penicilina G - 100 UI/mL e estreptomicina - 100 µg/mL - Sigma), à temperatura de 35 a 37 °C .

No laboratório, os ovários foram lavados 2 vezes em solução salina (0,9% de NaCl) aquecida a 35-37°C, em seguida realizada a aspiração dos folículos com diâmetro entre 2 e 8mm com agulha de calibre 21G acoplada à seringa de 10mL. O líquido folicular foi depositado em tubo cônico de 15mL (TPP), permanecendo em repouso por 10 minutos. Após este período, o sedimento de cada tubo foi colocado em placa de petri (100 mm) e diluído em meio de lavagem (LAV), composto por TCM-199 Hank's com Hepes ou PBS suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB), 10 UI/mL de penicilina (Sigma) e 50 µg/mL de estreptomicina (Sigma) para a procura dos complexos *cumulus oophorus* sob estereomicroscópio (ZEISS- Stemi SV6). Após a seleção, os complexos *cumulus oophorus* foram depositados em tubos cônicos de 1,5 mL com a solução lavagem, centrifugados, tendo o sobrenadante retirado e lavados com 1mL de PBS, centrifugados, descartado o sobrenadante e adicionado 100µL de Trizol.

#### 4.3 Extração de mRNA e síntese de cDNA

Os complexos *cumulus oophorus* recuperados foram submetidos à extração de mRNA a partir do método fenol-clorofórmio, utilizando-se o reagente Trizol, seguindo os seguintes passos: os tubos contendo os complexos *cumulus oophorus* com Trizol (100µL) foram agitados rapidamente e deixados a temperatura ambiente por 5 minutos. Foi adicionado glicogênio (20µg) e clorofórmio (20µL, Merck). As amostras foram vigorosamente agitadas e incubadas a temperatura ambiente por 2 minutos, centrifugadas a 12000 x g por 15 minutos a 4°C. A fase superior, aquosa, foi separada a qual foi adicionado isopropanol gelado 50µL (Mallinckrodt). O mRNA foi deixado precipitando por no mínimo 16 horas a -20°C, seguido por uma centrifugação a 13000 x g por 10 minutos a 4°C. Os pellets de mRNA foram lavados com 100µL de etanol 75% (Mallinckrodt), centrifugados 7000 x g por 7 minutos, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram secos ao ar, e eluídos em 8µL de água livre de RNase e DNase. Após a extração, as concentrações das amostras de mRNA total foram mensuradas por espectrofotômetro NanoDrop® ND 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) e 1µg foi utilizado para proceder a síntese de cDNA.

Possíveis contaminações com DNA genômico foram removidas pelo tratamento do mRNA com 1 unidade de DNase I e 1 unidade do respectivo tampão da enzima, por 30 minutos a 37 °C. A DNase foi inativada pela adição de 1µL de *stop solution*

por 10 minutos a 65 °C. Imediatamente após o tratamento com DNase, o mRNA foi convertido em DNA complementar (cDNA) através da reação transcrição reversa (RT), utilizando-se 1 µL de *primer Oligo-dT* (500µg/mL), 2µl dNTPs (2,5mM cada), 2µl DTT (0,1M), 1µL RNaseOUT® Recombinant Ribonuclease *Inhibitor* (40U/µL), 2µL de tampão da RT 5X *first strand* e 1µL de *SuperScript III* (200U/µL). As reações foram realizadas a 42°C por 52 minutos, seguida por uma inativação da enzima RT a 70°C por 15 minutos.

#### 4.4 Reação em Cadeia da Polimerase- PCR

Após a síntese do cDNA, os produtos foram submetidos a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) com utilização do GAPDH como gene constitutivo, para avaliar a qualidade do cDNA. Os cDNAs não expressos nestas reações de PCR foram novamente sintetizados. Após a avaliação da qualidade, os peptídeos maduros (ORFs) dos genes *GDF9* e *BMP15* bovinos foram amplificados pela reação de PCR, com utilização do termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf). As condições de amplificação empregadas na PCR foram: 1µL de cDNA, 2 UI de Taq DNA polimerase, 10 µM de cada *primer* específico, 200µM de cada dNTP, 2.0mM de MgCl<sub>2</sub>, 1X tampão da Taq, em volume final de 20µL. As sequências dos *primers* e tamanho dos produtos amplificados estão representados na Tabela 4.1. O programa de PCR utilizado foi: 93°C por 3 min., seguido pelos ciclos descritos na Tabela 4.1, a 94 °C por 30 seg., a temperatura de anelamento específica por 40 seg. e extensão a 72 °C por 1 minuto. A incubação final foi realizada a 72°C por 5 minutos.

Tabela 4.1. Sequência dos *primers* GAPDH, *GDF9* e *BMP15* específicos bovinos (*Bos taurus*)

Genes	Sequência	Tamanho do <i>amplicon</i> (pb)	Temperatura de anelamento(°C)
<b><i>GAPDH</i></b>	F 5'-CCC ATC ACC ATC TTC CAG G-3' R 5'-AGT GAG CTT CCC GTT CAG C-3'	471	57
<b><i>BMP15</i></b>	F 5'-TAG GAT CCA TGG TCC TTC TGA GCA TT-3' R 5'-TGT CAC CTG CAT GTA CAG-3'	1185	60
<b><i>GDF9</i></b>	F 5'-TGA GAT CCA TGG CGC TTC CCA ACA AA-3' R 5'-TGT TAA CGA CAG GTA CAC-3'	1372	55

#### 4.5 Ligação do cDNA ao vetor pGEM®-T Easy

Os cDNAs amplificados *GDF9* e *BMP15* foram purificados separadamente com o kit GenClean III (MP Biomedicals, LLC). Após, foram ligados ao vetor específico para clonagem de produtos de PCR, o pGEM®-T Easy (Promega), seguindo as recomendações do fabricante.

O pGEM®-T Easy (Promega) é um vetor de 3015 pb que possui o gene de resistência a ampicilina (amp) como marca de seleção, a origem de replicação bacteriana (ori), parte do gene *lacZ* que codifica o fragmento amino-terminal da enzima  $\beta$ -galactosidase, sítio múltiplo de clonagem na região codificadora do gene *lacZ* e os promotores T7 e SP6 que flanqueiam a região de clonagem (Figura 4.1).

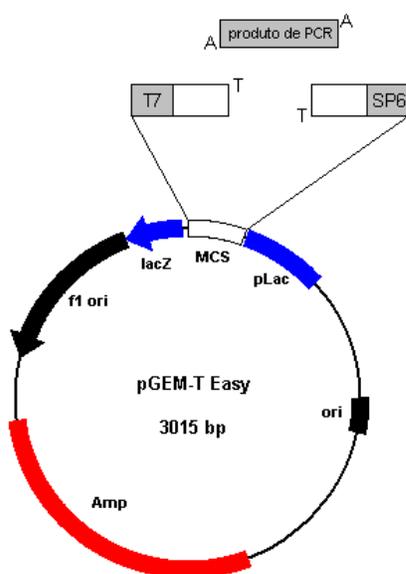


Figura 4.1 Representação esquemática do mapa físico do vetor pGEM®-T Easy.

##### 4.5.1 Clonagem do vetor em bactérias *E. coli* competentes, extração do DNA plasmidial e quantificação

Os sistemas de ligação (insertos amplificados + pGEM®-T Easy) do *GDF9* e do *BMP15* foram transformados em linhagens de células competentes *E. coli* XL1-Blue,

conforme método descrito por Sambrook & Russel (2001), utilizando-se choque térmico para permeabilização temporária das membranas bacterianas ao DNA.

Para seleção das células recombinantes, as bactérias transformadas foram cultivadas em placas de meio LB (Lúria - Bertani) - ágar contendo ampicilina (60 µg/mL - Sigma), uma vez que o plasmídeo utilizado na clonagem apresenta gene de resistência a este antibiótico. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 16 horas e logo após, as colônias selecionadas e cultivadas em 3 mL de meio LB líquido com 100 µg/mL de ampicilina. No dia seguinte, os tubos que apresentaram turbidez foram aliqüotados em tubos de 1,5 mL, para extração do vetor seguindo protocolo de extração de plasmídeos de *E. coli*, baseado na técnica de lise alcalina descrita por Birnboim & Dolly (1979), com algumas modificações.

Depois da extração do DNA plasmidial foi procedida a digestão enzimática do DNA a 37 °C com a endonuclease EcoRI para confirmação do fragmento inserido. Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (10 mg/mL) e fotografados sob luz ultravioleta, para confirmação da presença do vetor e do fragmento. Após, os vetores com os insertos foram purificados o kit GenClean III (MP Biomedicals, LLC) e realizou-se uma nova quantificação utilizando a eletroforese em gel de agarose (1%), corado com brometo de etídeo. Os insertos quantificados foram enviados para seqüenciamento com o *primer* universal T7, de acordo com as recomendações da plataforma de seqüenciamento de DNA da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Após a confirmação das sequências, os vetores pGEM®-T Easy contendo as ORF dos genes *BMP15* e *GDF9* foram digeridos com EcoRI, os produtos separados por eletroforese em gel de agarose e purificados com o kit GenClean III (MP Biomedicals, LLC), com objetivo de inserir os fragmentos de DNA (*GDF9* e *BMP15*) no vetor de expressão para células de mamíferos pCI-Neo® (Promega).

O pCI-Neo® tem 5472 pb, carrega o promotor citomegalovírus humano, para a expressão constitutiva de inserções de DNA clonados em células de mamíferos. Esse vetor também contém o gene neomicina fosfotransferase, um marcador de seleção das células de mamíferos (Figura 4.2).

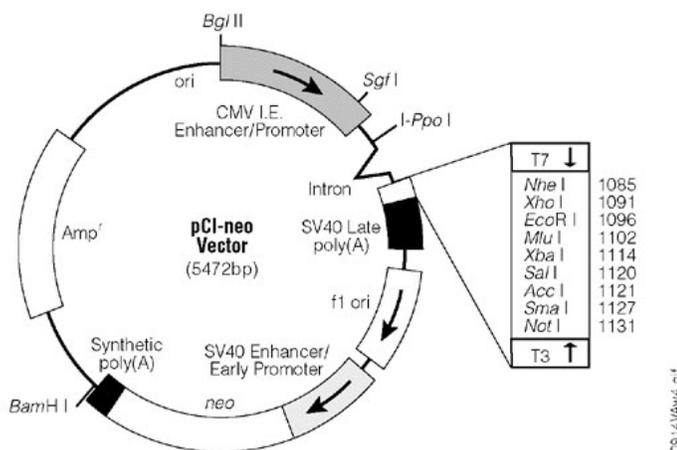


Figura 4.2 Representação esquemática do mapa físico do vetor pCI-Neo.

Para confirmação da clonagem foi utilizada digestão com a endonuclease *HinD* III a 37 °C *overnight*. Após, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (10mg/mL) fotografadas em transiluminador sob luz ultravioleta, como mostra a Figura 4.3.

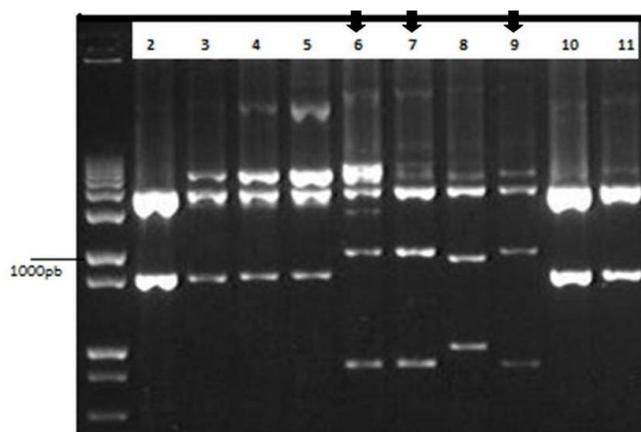


Figura 4.3 Perfil de digestão do DNA plasmidial do clone *BMPI5*. Nos poços de número 2, 3, 4, 5, 10 e 11, são apresentados, os fragmentos de DNA do plasmídeo pCI-Neo intacto e digerido. Os clones com os gene inseridos na orientação correta são mostrados nos poços de número 6, 7 e 9.

Um novo cultivo com os produtos clonados foi realizado, extração do DNA plasmidial e purificação com o kit GenClean III (MP Biomedicals, LLC). As amostras foram

levadas para sequenciamento como descrito anteriormente, para confirmação da clonagem e integridade do DNA.

#### **4.5.2 Purificação de DNA plasmidial**

Após confirmação por sequenciamento da clonagem fragmentos do peptídeo maduro do *BMP15* e *GDF9*, um novo cultivo em 20 mL de meio LB líquido a 37 °C *overnight*, sob agitação de 150 x g foi realizado, em seguida o DNA plasmidial foi purificado com o kit *Purelink HiPure Plasmid DNA Purification* seguindo as recomendações do fabricante. O DNA purificado foi eluído em 200 µL de água MiliQ ultrapura e foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop® ND 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) e armazenado a temperatura de -20 °C.

#### **4.6 Cultura e propagação de células bovinas**

##### **4.6.1 Experimento 1- Expressão do *GDF9* e *BMP15* em cultura de células bovinas**

As células MDBK foram utilizadas para expressão dos genes porque as células da granulosa com aproximadamente 20 dias de cultivo entram em senescência, pela multiplicação natural. Entretanto, inicialmente foram realizados testes para a expressão protéica com as células da granulosa. O cultivo das células foi exatamente como descrito anteriormente, exceto pelo fato de que as células MDBK são incubadas em estufa a 37 °C.

Antes da transfecção, o mesmo procedimento de contagem e disposição das células em placas de 24 poços foi realizado, sendo que foram adicionadas 20.000 células MDBK por poço. Também foram incluídas placas controle, que eram coradas 48 horas após a transfecção. No dia seguinte após a transfecção, as células foram repicadas para garrafas de 25 cm<sup>2</sup> com meio de seleção contendo o antibiótico G418 (500µg/mL). A seleção permaneceu durante 20 dias, controlada pela morte total da garrafa controle com células não transgênicas

mantidas com o antibiótico na mesma concentração. Na ocasião, uma alíquota das células foi ressuspensa em Trizol para extração de mRNA, tratamento com DNase e síntese de cDNA. Outra alíquota foi submetida à extração de DNA pelo método *Salting –out* com pequenas modificações (Biase et al., 2002).

O cDNA foi submetido a PCR com o gene GAPDH, para verificação da qualidade. Após, foram realizadas reações de PCR com o gene Neo (que confere resistência a neomicina), para verificação da inserção do vetor. Com a confirmação da inserção do vetor, foram procedidas reações de PCR com o *GDF9* e *BMP15* nas células provenientes das respectivas garrafas, para confirmação da expressão dos RNAs transgênicos (DNA e mRNA/cDNA), com *primers BMP15* e *GDF9* já apresentados e o *primer Neo* descrito na tabela 4.3.

Tabela 4.2 Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho do *amplicon* em pares de base (pb) e temperatura de anelamento

Genes	Seqüência	Tamanho do <i>amplicon</i> (pb)	Temperatura de anelamento(°C)
<i>NEO</i>	F 5'-GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTG-3' R 5'-TCG ACA AGA CCG GCT TCC ATC-3'	410	56

#### 4.6.1.1 Ensaios de SDS-PAGE e Western Blotting

Passado o período de seleção das células e confirmação da transgenia por meio da amplificação dos genes Neo, *BMP15*, *GDF9* (DNA e cDNA). Foram realizados ensaios de Western Blot para verificação da expressão de proteínas no meio de cultivo, assim como nas células. As células foram centrifugadas, lavadas com PBS e lisadas com 50 µL de tampão de amostra de proteínas (2X + 50 µL de β-mercaptoetanol/mL), que também foi adicionado ao meio de cultivo (proporção 1:1). Em seguida, as amostras foram fervidas durante 5 minutos e levadas imediatamente ao gelo. Foram congeladas em -20C até a eletroforese SDS-PAGE. O sistema de eletroforese de proteínas SDS-PAGE, em condições desnaturantes, segundo o protocolo de Sambrook & Russel (2001). A solução de gel separador a 15% (acrilamida/bis-acrilamida) foi vertida até o nível adequado e, em seguida, coberta com butanol para impedir o contato direto com o ar. Após a polimerização, o butanol foi descartado, a superfície do gel foi lavada com água destilada e a solução do gel concentrador a 5% foi adicionada, sendo o

penete acoplado logo em seguida para a formação dos poços. O sistema de eletroforese foi submetido a uma corrente inicial de 20 mA, para a entrada das amostras no gel, e depois de 30 mA, para a corrida. A eletroforese estendeu-se até a saída do azul de bromofenol, presente no tampão de amostra.

Após a corrida eletroforética, as proteínas do gel de poliacrilamida foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences), utilizando-se o sistema de transferência semi-seca (Sigma). Para montagem do sistema de transferência foram realizados “sanduíches” de papel de filtro embebidos em tampão de transferência (25mM de Tris Base, 192mM de glicina, 20% de metanol, 0,1% SDS), contendo internamente o gel sobre a membrana. Os “sanduíches foram colocados entre os dois eletrodos e o sistema submetido a uma corrente elétrica de 0,5 A e 15V por 1 h e 30 min. A membrana, contendo as proteínas transferidas, foi incubada com a solução de bloqueio (leite em pó desnatado a 8% em TBS-T 1X) sob agitação branda, durante 2 horas. Após o bloqueio, a membrana foi lavada 3 vezes com TBS-T 1X. A membrana foi então incubada, sob agitação branda por 1 hora, à temperatura ambiente, com anticorpo primário específico – *GDF9* e *BMP15* (IgG produzido no laboratório), lavada 3 vezes com TBS-T 1X e incubada sob agitação branda por 1 hora, à temperatura ambiente, com anticorpo secundário anti-IgG de coelho, produzido em cabras conjugados à fosfatase alcalina (Sigma) em uma diluição de 1 : 10000. A membrana foi então submetida a uma última lavagem de 3 vezes com TBS-T 1X. A revelação foi realizada por incubação de 5 a 15min em solução reveladora para *Western Blotting*, contendo 60  $\mu$ L de NBT e 30  $\mu$ L de BCIP, de acordo com as instruções do fabricante. A reação foi bloqueada por meio lavagem da membrana PBS 1X.

#### **4.6.2 Experimento 2- Determinação da concentração dos hormônios estradiol (E<sub>2</sub>) e progesterona (P<sub>4</sub>) nos meios de cultura**

As células da granulosa foram obtidas a partir de folículos ovarianos conforme descrito anteriormente. Após a retirada dos ovócitos da placa de petri, as células da granulosa foram colocadas em tubos cônicos de 1,5 mL, centrifugadas a 1400 x g por 5 minutos e lavadas com PBS, que foi removido e as células ressuspendidas em 1 mL de meio Dubelcco's Minimum Eagle's Medium (DMEM - GIBCO) suplementado com 10 % (v/v) de soro fetal bovino e tamponados com bicarbonato de sódio, com pH ajustado para 7,2. As culturas foram

estabelecidas em garrafas de cultivo celular de 25cm<sup>2</sup>, acrescidas de 3 mL de meio e mantidas a 39 °C em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> em ar. A cada três dias o meio era trocado e as células avaliadas quanto ao seu desenvolvimento, morfologia celular e possível contaminação. No dia da transfecção, as garrafas foram lavadas com 0,5 mL de solução de Tripsina 0,25 %/EDTA 1mM (GIBCO) e mantidas em 1 mL dessa solução, a 39 °C por 10 minutos para suspensão das células.

As células foram então recolhidas em tubos cônicos plásticos 1,5 mL e lavadas com 0,5 mL de meio de cultura DMEM com 10% SFB para neutralização da tripsina. Os tubos foram centrifugados a 1400 x g por 5 min., o sobrenadante descartado e o sedimento eluído com 1 mL de DMEM com 10% de SFB. Uma amostra das células ressuspendidas em meio fresco foi diluída no corante vital azul de tripano a 0,4 % (v/v), na proporção de 1:2 (células: corante), em um volume final de 150 µL. As células mortas apresentaram coloração azul, em função do comprometimento da membrana citoplasmática e influxo do corante, enquanto as células viáveis mantiveram um aspecto translúcido. As células foram observadas em microscópio óptico, as viáveis contadas nos quadrantes da câmara de Neubauer, sendo utilizadas células com aproximadamente 97% de viabilidade.

Após a contagem, as células da granulosa foram adicionadas em placas de 24 poços (27.000 células/poço), com 300µL de DMEM acrescido de 10% de SFB, de modo que atingissem 80- 90% de confluência 16 horas após o plaqueamento. Foram elaboradas 3 placas de 24 poços com células da granulosa para cada réplica e uma placa para controle da transfecção. A fórmula utilizada para contagem foi:

$$\text{Número total de células contadas} \div \text{quantidade de quadrantes contados} \\ \times \text{fator de diluição} \times 10^4 = \text{N}^\circ \text{ de células/mL}$$

#### **4.6.2.1 Transfecção por meio de lipossomos**

A transfecção por lipossomos foi realizada com o reagente *Lipofectamine 2000* de acordo com instruções do fabricante. As células descritas anteriormente foram incubadas a 39 °C em estufa com 5 % de CO<sub>2</sub> durante aproximadamente 16 h. Em tubos de 1,5 mL, foram preparadas as soluções *A* e *B* de transfecção para cada poço. A solução *A* continha 1 µg de

DNA diluído em 220  $\mu\text{L}$  de meio DMEM sem soro fetal bovino e sem antibiótico. A solução *B* era constituída por 1  $\mu\text{L}$  de *Lipofectamine 2000*, diluída em 220  $\mu\text{L}$  de meio de cultura sem soro fetal bovino e sem antibiótico. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, a solução *A* foi adicionada à solução *B*, em um volume final de 440  $\mu\text{L}$ . A solução final foi incubada durante 20 minutos à temperatura ambiente, permitindo a formação dos complexos DNA-lipossomo. Decorrido esse tempo, 220  $\mu\text{L}$  da solução final foi adicionada a cada poço, em duplicata. As placas foram incubadas a 39 °C em estufa durante aproximadamente 3h. Após esse período, a solução de transfecção foi trocada por meio de cultivo com SFB sem antibióticos. A placa controle da transfecção de células da granulosa tinha 2 poços tranfectados com o gene  *$\beta$ -galactosidase*, codificada pelo gene *lacZ*, evidenciando a incorporação dos plasmídeos nas células que confere a cor azul após coloração específica.

Um pré-experimento fundamental para a elaboração do delineamento experimental posterior foi realizado em duplicata. Neste primeiro trabalho foram utilizadas 3 placas de 24 poços, cada uma com 5 poços tranfectados na primeira réplica e 6 poços na segunda, com os genes  *$\beta$ -galactosidase*, *BMP15* e *GDF9*, e uma placa com grupo controle de células não tranfectadas. Entretanto, os meios de cada dia (dia 1 ao dia 5, no primeiro ensaio, e até o dia 6 no segundo) foram retirados e congelados, sem a troca dos meios dos poços dos dias posteriores e as dosagens hormonais foram realizadas com meios congelados, com secreção hormonal acumulada.

Após as dosagens de progesterona dos ensaios-piloto, foi realizado o planejamento e execução do delineamento experimental. No delineamento experimental, descrito no esquema da figura 7, placas de cultivo contendo as células da granulosa foram tranfectadas como descrito anteriormente. Em cada réplica, foram utilizadas 3 placas, uma com o gene *GDF9*, uma com o gene *BMP15*, uma com o gene  *$\beta$ -galactosidase* e uma placa controle que teve os poços corados 48 horas após a transfecção. Durante 12 dias (D) consecutivos (D1 a D12), acrescidos de D15, D18 e D21 após a transfecção as placas tiveram o meio e as células retiradas, iniciando-se no D1, que corresponde ao D2 da incubação celular. As células foram suspensas em 500 $\mu\text{L}$  de Trizol para posterior extração de mRNA e os meios e células armazenados a -80° C. O grupo controle transgênico também foi tranfectado da mesma forma do restante da placa, sendo que o grupo controle não transgênico não tiveram as células tranfectadas. O meio desses grupos também foi congelado a cada dia e toda a placa tinha o meio trocado todos os dias, para dosagens da taxa diária de produção de progesterona (não acumulativas). No dia seguinte a transfecção, foi adicionado

ao meio o antibiótico de seleção (G418- 500  $\mu\text{g/mL}$ ), que permaneceu durante todo o experimento.

As placas foram observadas no microscópio invertido durante todo o experimento, para verificação do comportamento das células e homogeneidade dos grupos, que estavam com 100% de confluência celular no dia seguinte à transfecção.

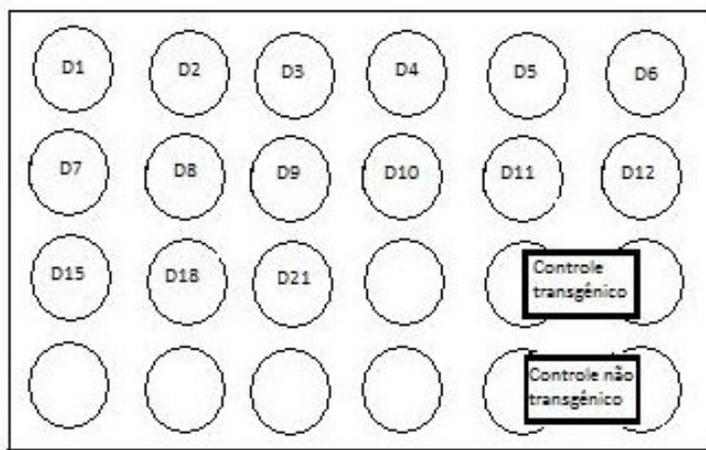


Figura 4.4 Representação esquemática da transfecção das réplicas para avaliação do efeito do *GDF9* e *BMP15* na luteinização.

Após 48 horas de transfecção a placa controle teve os poços das culturas transfectadas lavados 1 vez com 500  $\mu\text{L}$  de PBS 1X e fixados com 200  $\mu\text{L}$  de solução fixadora (paraformaldeído 1M) 7min. a 4 °C. Em seguida, as células foram lavadas uma vez com 500  $\mu\text{L}$  de PBS 1X, e recobertas com 200  $\mu\text{L}$  de solução corante contendo X-gal. As placas foram incubadas por 1 h a 37 °C e observadas em microscópio invertido. As células azuis indicaram a atividade da  $\beta$ -galactosidase nas células transfectadas. Este ensaio foi repetido duas vezes.

#### 4.6.2.2 Expressão gênica nas células da granulosa

Após a remoção do meio para dosagem hormonal, as células foram tratadas com 500 µL do reagente Trizol e armazenadas a -80 °C para posterior extração de mRNA. O mRNA total das células dos dias 1, 12 e 21 (das 3 placas transfectadas em duas réplicas) foi extraído com Trizol de acordo com as recomendações do fabricante. Após a extração, o mRNA foi tratado com DNase antes da síntese de cDNA com transcriptase reversa, conforme descrito anteriormente. Os cDNAs obtidos foram armazenados em congeladores a -20°C até o uso na reação de PCR.

Para avaliação da qualidade do cDNA produzido, foi realizada uma reação de PCR com o gene constitutivo GAPDH. Todos os cDNAs que não tiveram a expressão deste gene foram refeitos. Os cDNAs com qualidade foram utilizados para amplificação por PCR dos genes: *GDF9*, *BMP15*; *BMPRII* que codifica o receptor tipo II do *GDF9* e *BMP15*; *ALK5* que codifica o receptor tipo I específico do *GDF9*; *ALK6* que codifica o receptor tipo I específico do *BMP15*; além do gene indicador da esteroidogênese *StAR*. O gene *CYP17* (expresso exclusivamente nas células da teca) foi amplificado para avaliar a pureza do cultivo celular das células da granulosa. As condições do PCR foram semelhantes à descrita anteriormente, todos os genes foram amplificados com 40 ciclos. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), assim como as temperaturas de anelamento específicas para cada gene seguem na Tabela 4.2.

Tabela 4.3 Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho do *amplicon* em pares de base (pb) e temperatura de anelamento

Genes	Seqüência	Tamanho do <i>amplicon</i> (pb)	Temperatura de anelamento(°C)
<b><i>GAPDH</i></b>	F 5'-CCC ATC ACC ATC TTC CAG G-3' R 5'-AGT GAG CTT CCC GTT CAG C-3'	471	57
<b><i>BMPRII</i></b>	F 5'-GCA TTG GCA TCA GTC TCT GT-3' R 5'-CTG CTG CCT CCA TCA TAT TC-3'	118	48
<b><i>ALK5</i></b>	F 5'-TAA TTC CAC GAG ACA GGC CA-3' R 5'-TGC CAG TTC AAC AGG ACC AA-3'	152	47
<b><i>ALK6</i></b>	F 5'-CCA CCA TTG TCC AGA AGA CT-3' R 5'-GGA TCG TCT CTG ATG AGG AA-3'	172	49
<b><i>StAR</i></b>	F 5'-CCG GAA GCT CCT ACA GAC AT-3' R 5'-GAC GCC GAA CCT GGT TAA TC-3'	135	50
<b><i>CYP17</i></b>	F 5'-GGA TGG CAA CCT GAA GTT AG-3' R 5'-AGA GAG AGG CTC GGA CAG AT-3'	109	50

#### 4.6.2.3 Expressão gênica do StAR por meio de PCR em tempo real (qPCR)

Para quantificação relativa do mRNA foi empregada a técnica de PCR em tempo real, usando o termociclador ABI 7500 Fast e o kit Power Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). As reações foram realizadas com um volume final de 25µL e as condições para amplificação do gene StAR foram: 95° C por 10 min.; 40 ciclos (desnaturação: 95° C por 10 seg.; temperatura de anelamento 60° C por 1 minuto), seguido de curva de dissociação padrão. A sequência dos primers utilizada foi a mesma da reação de PCR convencional citada acima. Os dados de fluorescência foram coletados ao final de cada extensão. Cada amostra foi analisada em duplicata e a eficiência dos oligonucleotídeos iniciadores dos genes foram avaliadas pelas curvas de amplificação e dissociação, respectivamente. Os valores de expressão do StAR foram normalizados pela expressão do gene constitutivo GAPDH e quantificados pelo método da Curva Padrão Relativa.

#### 4.6.2.4 Dosagem Hormonal

A concentração do hormônio progesterona foi detectada através da utilização do kit de radioimunoensaio (RIA) da marca Coat-A-Count (DPC-MedLab, Diagnostic Products), que se baseia em tubos revestidos com anticorpos.

O hormônio presente nas amostras compete com o hormônio marcado do kit pelos sítios de ligação livres do anticorpo específico. Neste sistema o anticorpo está ligado à parte interna dos tubos de polipropileno. O complexo antígeno-anticorpo permanece ligado à parede do tubo, e o antígeno livre é decantado. Os tubos são levados a um contador Gamma para determinação da quantidade de P<sub>4</sub>- I<sup>125</sup> ligada ao anticorpo e as contagens são inversamente relacionadas com a quantidade de hormônio presente na amostra. A quantidade de hormônio da amostra é determinada através da comparação das contagens com uma curva de calibração fornecida no kit. As concentrações de progesterona foram realizadas com diluição de 10 vezes utilizando o calibrador A do Kit de RIA, nos meios de cultura D1-D12, D15, D18 e D21 exposto às células transfectadas com os 3 genes (*GDF9*, *BMP15* e *β-galactosidase*), assim como o controle não transfectado, em duas réplicas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Transfecção por lipofecção em células bovinas

A produção *in vitro* de proteínas recombinantes que necessitam de modificações pós-traducionais, como por exemplo, acetilação, metilação, fosforilação, sulfonação e glicosilação são preferencialmente expressas em células de mamíferos, que têm a capacidade de mimetizar os padrões de modificações pós-traducionais. Sistemas de expressão utilizando *E. coli*, por não serem capazes de executar tais modificações não são elegíveis quando se almeja a obtenção de um produto final bioativo (Coloma et al., 2000).

Muitas metodologias foram descritas para a introdução do DNA em células de mamíferos, com o objetivo de ultrapassar a membrana plasmática e nuclear (Labat-Moleur et al., 1996). A baixa eficiência de transfecção, a instabilidade dos genes introduzidos, toxicidade e demais limitações associadas às demais técnicas tornaram a transferência de genes mediada por lipossomos (lipofecção) cada vez mais frequente. Os lipossomos formam complexos espontâneos com o DNA, fundem-se à membrana plasmática e liberam seu conteúdo no interior da célula, que posteriormente será endereçado ao núcleo (Dass, 2004).

As células da granulosa e MDBK utilizadas nos experimentos foram transfectadas por lipossomos com o gene  $\beta$ -galactosidase clonado no vetor de expressão pCI-Neo® (Promega), simultaneamente quando eram realizadas transfecções com o *GDF9* e *BMP15* para avaliar a eficiência do processo. A incorporação dos plasmídeos pelas células confere a cor azul após coloração específica, pela ação hidrolítica da  $\beta$ -galactosidase sobre o substrato cromogênico sintético X-gal.

Para o estabelecimento do cultivo celular foram utilizados os protocolos de Masters & Stacey (2007). O início das transfecções foi baseado em trabalhos de Oliveira e colaboradores (2005), que priorizou a eficiência de transfecções através de lipossomos em fibroblastos. Como a eficácia inicial das transgenias, verificada através da coloração das células com X-gal foi muito baixa, foram realizadas otimizações e ajustes nos protocolos, com gradientes de lipossomos e DNA, até a obtenção de 80% de transfecção com as células da granulosa bovinas. A avaliação da eficiência de transfecção era estimada pela contagem do número de células azuis em relação ao total de células presentes em um quadrante representativo da placa de cultura. Entretanto, com a observação da senescência das células da granulosa em torno da 25<sup>a</sup> passagem, tornou-se necessário o uso de células de linhagem imortalizada, para o estabelecimento da produção dos hormônios *GDF9* e *BMP15* no laboratório. Para a obtenção de 20% de eficiência nas transfecções com as células MDBK, que apesar de baixo foi o índice mais alto obtido em nossos ensaios, foram necessários muitos ajustes. Outros trabalhos com melhores resultados de transfecções (Lisauskas et al., 2007) utilizavam um tipo diferente de lipossomos, que também foi testado em nosso laboratório sem sucesso. Poucos trabalhos publicados descrevem o uso de lipofecção com a linhagem MDBK, o que dificultou a obtenção de maiores índices. As colorações das células transfectadas encontram-se nas Figuras 5.1 A e B, nas quais estão demonstrados os níveis de sucesso obtidos. No protocolo de transfecção por lipossomos, utilizado pela nossa equipe, a *Lipofectamine 2000* é inserida em uma monocamada de células em confluência de aproximadamente 90%. Passadas 24h da transfecção o acompanhamento do aspecto da cultura é realizado por visualização ao microscópio invertido. De uma forma geral as culturas de MDBK apresentavam, após 24h de transfecção com *Lipofectamine 2000*, uma confluência menor do que a das células granulosa, o que é indicativo de uma maior taxa de morte celular. Isso pode refletir uma possível suscetibilidade das células MDBK a um efeito citotóxico da *Lipofectamine 2000*, o que justificaria a eficiência de transfecção mais baixa nesse modelo.

A relativa toxicidade de lipídeos catiônicos varia de acordo com o tipo celular e com a quantidade de lipídeos utilizada na relação lipídeo- DNA para a formação dos complexos (Patil et al., 2005; Romoren et al., 2005). A toxicidade é atribuída ao excesso de cargas positivas (Dass, 2004), uma vez que ao se utilizar formulações contendo maiores quantidades de lipídeos com cargas neutras e negativas, a toxicidade do complexo mostra-se menor (Patil et al., 2005; Romoren et al., 2005). Ainda não é muito bem compreendido o mecanismo da toxicidade do excesso dessas cargas positivas.

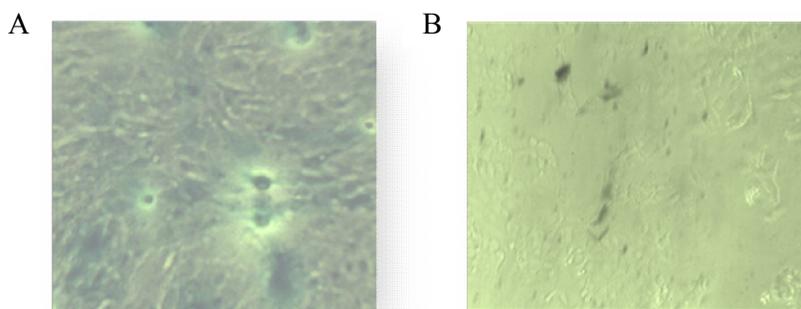


Figura 5.1 Células da granulosa (A) e MDBK (B) transfectadas com o plasmídeo pCMV $\beta$ -gal. Em azul células que expressam a  $\beta$ -galactosidase, o que demonstra a eficiência da transfecção.

## 5.2 Experimento 1 - Expressão do *GDF9* e *BMP15* em cultura de células

### bovinas

Inicialmente foram realizadas transfecções em células da granulosa. Entretanto, o período de seleção com antibióticos foi de 20 dias até a completa morte celular do grupo controle não transfectado e selecionado. Em 20 dias de cultivo, as células da granulosa iniciam a senescência, durante esse período a etapa mitótica cessa, havendo o encurtamento dos telômeros das células, o que resulta em divisões celulares finitas (Ben-Hur et al., 1978; Hamilton et al., 2001). Além do aspecto proliferativo, as células senescentes em cultura são maiores e achatadas, com deficiência das células em replicar seu DNA mesmo sob estímulos de crescimento. A senescência envolve perdas progressivas e irreversíveis das funções celulares, o que aumenta a probabilidade de morte (Comfort, 1979).

Por contornar o problema da senescência do cultivo primário de células da granulosa, foi utilizada uma linhagem de células imortais bovina, denominadas MDBK como modelo para produção *in vitro* dos fatores *GDF9* e *BMP15*. Para confirmarmos a clonagem e expressão dos genes *GDF9* e *BMP15* no genoma das células MDBK, foram realizadas reações de PCR. Para isso, mRNA e DNA genômico das células em cultura foram extraídos, procedido o tratamento com DNase e síntese de cDNA, seguida das ampliações por PCR. Com os DNAs, também foram realizadas reações de PCR para confirmação de inserção do plasmídeo nas células, através do gene Neo, que confere resistência a neomicina à linhagem celular. Após confirmação do inserto dos vetores, foram realizadas reações de PCR para

confirmação da presença do DNA transgênico nas células (*GDF9* e *BMP15*), assim como do mRNA para verificação da sua expressão. Para a análise a síntese protéica a partir dos mRNAs expressos, foram realizados ensaios de Western Blotting com anticorpos capazes de reconhecer a região do peptídeo maduro das proteínas *GDF9* e *BMP15*.

Esses experimentos foram realizados inicialmente com as células da granulosa e em seguida com as células MDBK. A Figura 5.2 mostra a eletroforese da inserção do vetor nas células da granulosa e MDBK, a partir de reações de PCR convencional utilizando o *primer* Neo, que amplifica a zona de resistência à neomicina presente no vetor em que os fragmentos de DNA estão inseridos.

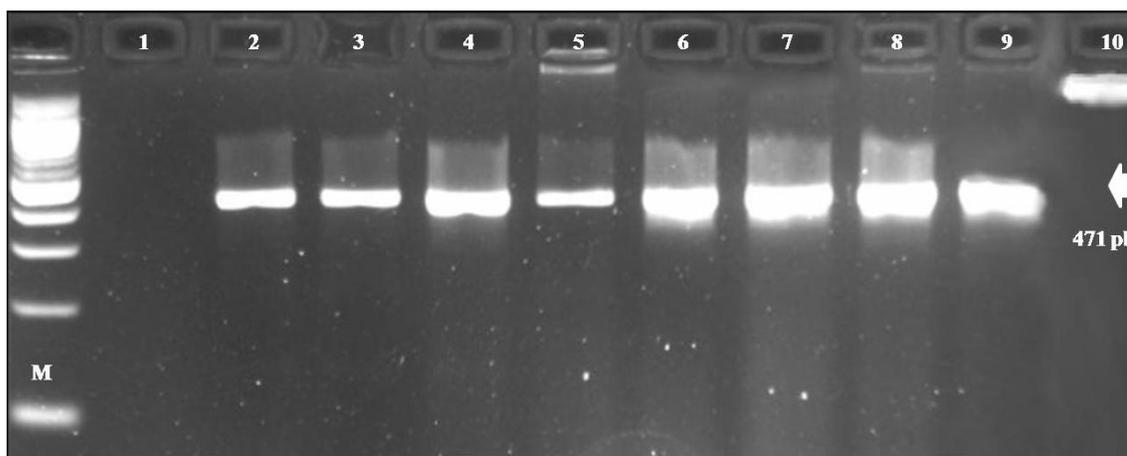


Figura 5.2 Expressão do gene Neo, com 471 pb em células da granulosa e MDBK transfectadas com *GDF9* e *BMP15*. Legenda: M=marcador 100 pb, cDNA/DNA, tipo celular e DNA transfectado. 1= controle negativo da reação, na qual foi adicionada água no lugar do DNA. 2= cDNA granulosa *GDF9*, 3=cDNA MDBK *GDF9*, 4=cDNA granulosa *BMP15*, 5=cDNA MDBK *BMP15*, 6=DNA granulosa *GDF9*, 7=DNA MDBK *GDF9*, 8=DNA granulosa *BMP15*, 9= DNA MDBK *BMP15*, 10=células da granulosa não transgênicas.

A Figura 5.3 refere-se a eletroforese do *GDF9*, a partir de reações de PCR convencional.

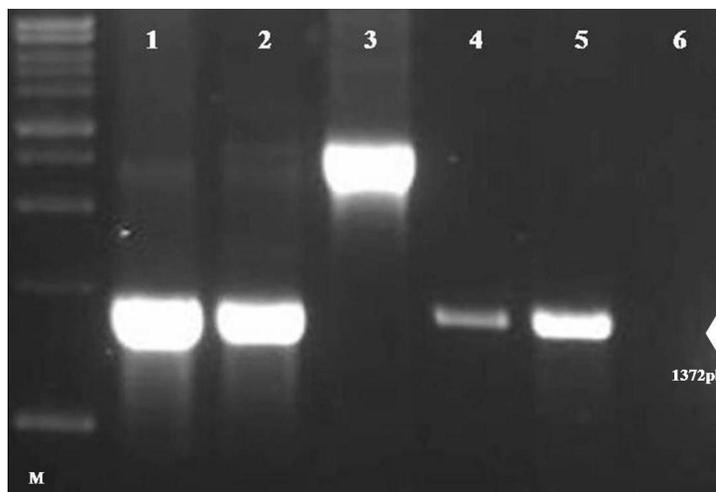


Figura 5.3 Expressão do *GDF9*, com 1372 pb em células da granulosa e MDBK transfectadas. Legenda: M=marcador 1kb, cDNA/DNA e tipo celular. 1= DNA granulosa, 2=DNA MDBK, 3=células da granulosa não transgênicas, 4=cDNA granulosa, 5=cDNA MDBK, 6= controle negativo da reação, na qual foi adicionada água no lugar do DNA

A Figura 5.4 é a eletroforese do *BMP15*, a partir de reações de PCR convencional.

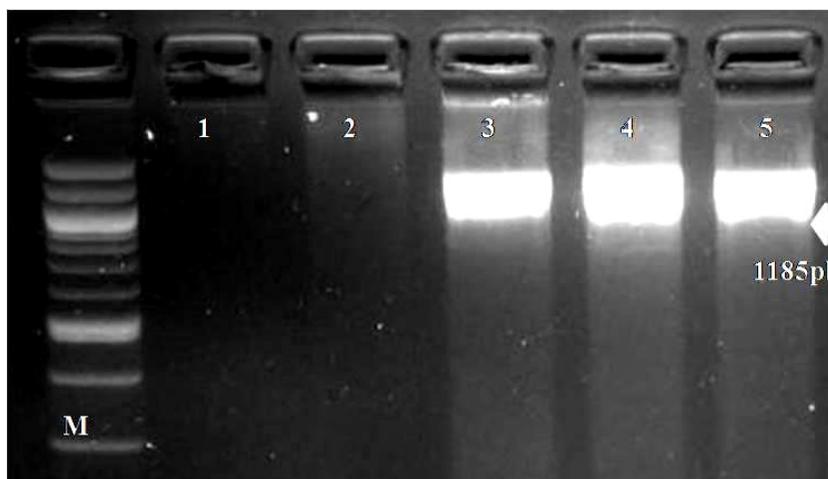


Figura 5.4 Expressão do *BMP15*, com 1185 pb em células da granulosa e MDBK transfectadas. Legenda: M=marcador 100 pb, cDNA/DNA e tipo celular. 1= controle negativo da reação, na qual foi adicionada água no lugar do DNA, 2=cDNA granulosa, 3=cDNA MDBK, 4=DNA granulosa, 5=cDNA MDBK.

As análises eletroforéticas dos géis de agarose corados com brometo de etídeo indicaram que houve inserção do plasmídeo nas células da granulosa e MDBK, transfectadas com *BMP15* e *GDF9*, através da amplificação do gene Neo, que confere resistência ao

antibiótico G418 (Geneticin). No controle não transgênico de células da granulosa, nos géis em que foram utilizados os *primers GDF9* foi observado maior peso molecular, devido ao fato das células não transgênicas serem providas de *exons* e *introns* dos genes *GDF9* e *BMP15* endógenos. Aqui ressaltamos que todas as células possuem os genes *GDF9* e *BMP15*, entretanto apenas em poucos tipos celulares como nos ovócitos esses genes são transcricionalmente ativos e expressam de forma natural, não existindo a expressão desses genes nas células da granulosa. Em relação ao *BMP15* este controle não pôde ser notado porque o *intron* do gene tem maior extensão (>5Kbp), o que provavelmente impediu sua amplificação por PCR convencional.

O fato de o *BMP15* e *GDF9* apresentarem transcrição do DNA em mRNA, confirmou a transgenia e nos indicou que as células estavam transcrevendo ativamente os genes introduzidos, e provavelmente proteínas, o que nos levou a fazer os ensaios de SDS-PAGE e Western Blotting para comprovar a tradução celular.

### 5.2.1 Ensaios de SDS-PAGE e Western Blotting

A partir dos resultados obtidos com a expressão do mRNA das células transgênicas, foi procedido o gel de SDS-PAGE e Western Blotting. As células da granulosa mostraram a expressão das proteínas *GDF9* (Figuras 5.5 A). As células MDBK apresentaram expressão das proteínas *GDF9* e *BMP15*, como mostram as Figuras 5.5 B e 5.6 A e B, respectivamente.

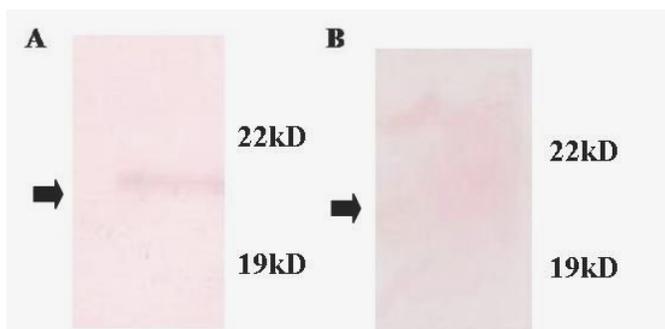


Figura 5.5 A: Expressão de proteínas *GDF9* pelas células da granulosa. B: Expressão de proteínas *GDF9* pelas células MDBK.

Todas as proteínas detectadas nos ensaios de Western Blotting foram provenientes das células adicionadas ao tampão de proteínas. Não foi detectada a expressão das proteínas *GDF9* e *BMP15* nos meios de cultivo das células transgênicas.

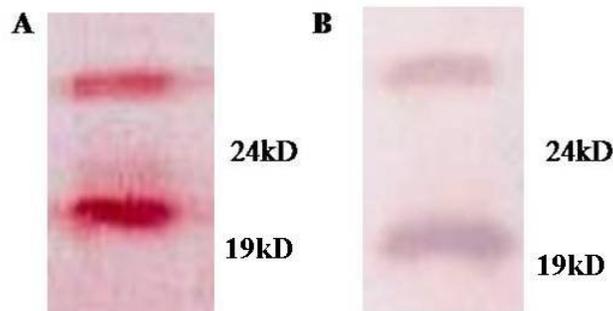


Figura 5.6 A e B: Expressão de proteínas *BMP15* pelas células MDBK.

A presença de uma banda dupla no gel SDS para o *BMP15* é esperada, visto que são duas as isoformas naturais de glicosilação deste gene (Otsuka et al., 2000; Hashimoto et al., 2005) e o fato de o *GDF9* possuir apenas uma isoforma madura explica o aparecimento de uma banda única no gel (Elvin et al., 1999; Hayashi et al., 1999). Desta maneira, foram obtidas as expressões em mRNA e proteínas do *GDF9* e *BMP15* durante o experimento. O fato de não se ter obtido expressão no meio de cultivo, apenas nas células, pode ser explicado por inúmeras razões. O motivo que consideramos mais provável, se deve ao uso de um mosaico de células no que se refere ao evento de inserção das construções gênicas no genoma das células transgênicas. Como cada evento de transfecção é único, muitas das células selecionadas, apesar de transgênicas, expressam pouco ou nada dos hormônios no meio, podendo esta proteína estar sendo degradada, mal processada e as poucas células que secretam bem tornam os hormônios muito diluídos, não sendo detectadas nos ensaios Western Blotting utilizando o meio de cultivo. A maneira mais viável de se resolver esse entrave seria a seleção clonal, no qual as células seriam separadas em linhagens transgênicas únicas e vários clones distintos seriam analisados com o objetivo de isolarmos os clones que melhor expressam as proteínas heterólogas.

A expressão dos genes *GDF9* e *BMP15* tem sido mostrada em cultura de células com várias finalidades científicas. O primeiro laboratório a utilizar a síntese *in vitro* do *GDF9* foi a equipe do Dr. Vitt (2000a), que utilizando ratos foi capaz de descobrir a função biológica deste fator. Através do *GDF9* de camundongos, transfectado por adenovírus em

células HEK293T humanas, foi possível verificar a bioatividade do gene (Mottsherhead et al., 2008). A equipe de McIntosh (2008) obteve sucesso em transfecções por lipofecção, de maneira muito semelhante à utilizada em nosso laboratório, com *GDF9* e *BMP15* de ratos em células HEK293T humanas.

Muitos outros estudos envolvendo a produção de proteínas recombinantes dos genes *GDF9* e *BMP15* foram desenvolvidos por equipes do mundo todo (Hreinsson et al., 2002; Yamamoto et al., 2002; Kaivo-Oja et al., 2003; Gilchrist et al., 2004; Dragovic et al., 2005; McNatty et al., 2005a; Hussein et al., 2005; Yoshino et al., 2006; Sugiura et al., 2007; Yeo et al., 2007). Estudos envolvidos com a elucidação de mecanismos de fosforilação foram realizados nestas células com o *BMP15* e *GDF9* recombinantes humanos por McMahon e colaboradores (2008).

Para corroborar a importância destes fatores, vários ensaios com a utilização de meio condicionado têm sido realizados. Shi e colaboradores (2009) utilizaram *GDF9* no meio de cultura das células para verificar o incremento da activina A, assim como Orisaka e equipe (2009) na avaliação do desenvolvimento de folículos pré-antrais e Hussein e colaboradores (2006) na avaliação do incremento das taxas de produção *in vitro* de embriões bovinos. A descoberta dos receptores do *GDF9* e *BMP15* também ocorreu pelo uso de fatores recombinantes adicionados aos meios de cultivo celular (Mazerbourg et al., 2004), e muitos estudos têm focado os mecanismos de sinalização desses receptores.

A necessidade de se elucidar os enigmas do complexo desenvolvimento folicular, que culminam com a maturação ovocitária e ovulação, tem sido o impulso para inúmeras pesquisas. Entretanto, até o presente momento ainda é inédito a expressão do *GDF9* e *BMP15* bovinos recombinantes produzidos por células bovinas (*Bos indicus*) em linhagens infinitas.

### **5.3 Experimento 2 - Expressão gênica do mRNA da enzima *CYP17* nas células da granulosa: confirmação da pureza do cultivo celular**

A Figura 5.7 mostra a eletroforese em gel de agarose do produto de PCR convencional para a expressão do mRNA do *CYP17*, na investigação de possível contaminação entre células da teca e da granulosa, com utilização de cDNA das células da

granulosa transfectadas com *GDF9*, *BMP15* e  $\beta$ -galactosidase; congeladas para posterior avaliação da esteroidogênese celular.



Figura 5.7 Expressão do gene *CYP17* para confirmação da identidade das células da granulosa. Legenda: M=marcador 100 pb, D=dia, seguido da identificação do DNA transfectado. Teca: expressão de cDNA das células da teca. Réplica 1: 1=D1  $\beta$ -galactosidase, 2=D1 *GDF9*, 3=D12  $\beta$ -galactosidase, 4=D12 *BMP15*, 5=D12 *GDF9*, 6=D21  $\beta$ -galactosidase, 7=D21 *BMP15*, 8=D21 *GDF9*. Réplica 2: 9=D1  $\beta$ -galactosidase, 10=D1 *BMP15*, 11=D1 *GDF9*, 12=D12 *BMP15*, 13=D12 *GDF9*, 14=D21 *BMP15*, 15=D21 *GDF9*. A amostra de número 16 foi o controle negativo da reação de PCR, em que foi utilizado água no lugar de cDNA.

A presença de *amplicons* de *CYP17* nas células da granulosa indicaria contaminação das células, visto que a expressão do *CYP17* é específica às células da teca. Essa contaminação entre células pode ser possível e 39 ciclos de amplificação seria mais que suficiente para detectar mRNA de células da teca, visto que a maioria dos trabalhos utiliza 30 a 32 ciclos (Buratini Jr. et al., 2005; Sahmi et al., 2004). Nossos resultados indicam que não houve contaminação do nosso cultivo de células da granulosa com células da teca.

O comportamento das células da granulosa sob condições definidas *in vitro* permite examinar detalhes das ações de hormônios específicos na esteroidogênese. O estudo da secreção de estradiol e expressão do *CYP19* nas células da granulosa de ruminantes em cultivo *in vitro*, não tem sido possível, pois os níveis de produção de estradiol e os níveis de mRNA do *CYP19* não são detectáveis; ou declinam rapidamente nestas células cultivadas *in vitro* (Henderson & Moon, 1979; Skinner & Osteen, 1988; Voss & Fortune, 1993; Roberts & Echterkamp, 1994; Berndtson et al., 1995; Silva & Price, 2000). Desta maneira, estes estudos estão de acordo com Shimizu et al. (2009), no qual a expressão do *CYP19* nas células da granulosa bovinas diminui com 24 horas de cultivo, consistente com o declínio da concentração de estrógeno no meio.

Estudos de Buratini Jr. e colaboradores (2005) demonstraram que o *CYP19* seria o marcador das células da granulosa de ruminantes, entretanto, com a luteinização, não nos foi possível identificar a presença desse gene com a técnica de PCR convencional, provavelmente devido aos motivos acima relatados.

### 5.3.1 Expressão gênica do mRNA do *GDF9* e *BMP15* na cultura de células da granulosa

A expressão gênica das células da granulosa transfectadas com *GDF9* (placa *GDF9*) e realizado por meio de PCR convencional está demonstrada na Figura 5.8, no qual toda *open reading frame* (ORF) do gene foi amplificada, gerando um *amplicon* com 1372 pb.

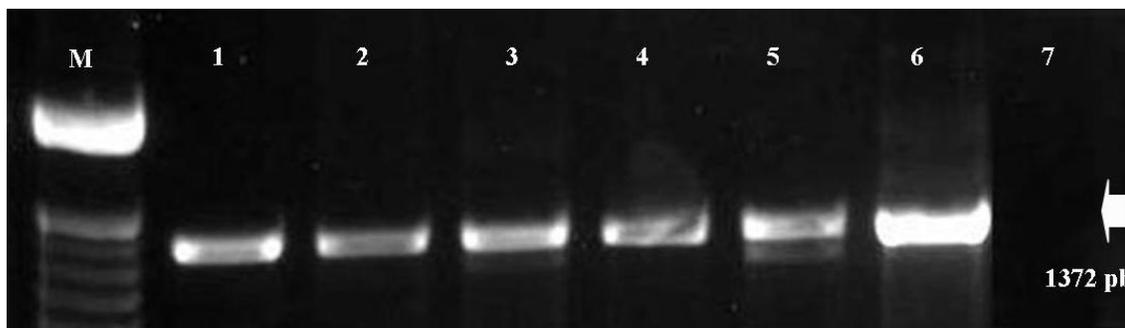


Figura 5.8 Expressão cDNA do gene *GDF9* para confirmação da transgenia das células da granulosa. Legenda: M=marcador de 1kb, D=dia. Réplica 1: 1=D1, 2=D12, 3=D21. Réplica 2: 4=D1, 5=D12, 6=D2, 7= controle negativo da reação de PCR, em que foi utilizado água no lugar de cDNA.

A Figura 5.9 mostra a expressão do mRNA do *BMP15* (placa *BMP15*) realizada por meio de PCR convencional, no qual *open reading frame* (ORF) do gene foi amplificada, gerando um *amplicon* com 1185 pb.

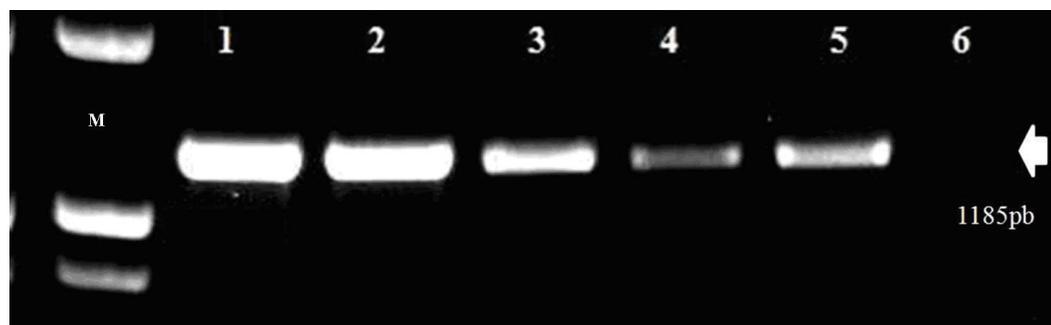


Figura 5.9 Expressão do cDNA do gene *BMP15* para confirmação da transgenia das células da granulosa. 1000 pb= marcador, D=dia. Réplica 1: 1=D12, 2=D21. Réplica 2: 3=D1, 4=D12, 5=D21. A amostra de número 6 foi o controle negativo da reação de PCR, em que foi utilizado água no lugar de cDNA.

Essa expressão comprova que as células utilizadas na avaliação esteroidogênica continham o DNA do *GDF9* e *BMP15* o que as tornavam capazes de expressá-los em mRNA durante todo período do experimento.

### 5.3.2 Expressão gênica dos mRNAs dos receptores do *BMP15* e *GDF9* na cultura de células da granulosa

As Figuras 5.10, 5.11 e 5.12 ilustram as eletroforeses em gel de agarose dos produtos de PCR convencional para a expressão do cDNA do receptor tipo II, denominado *BMPRII* e comum ao *GDF9* e *BMP15*, assim como dos receptores tipo I específicos do *GDF9*, o *ALK5* e específico do *BMP15*, o *ALK6*.

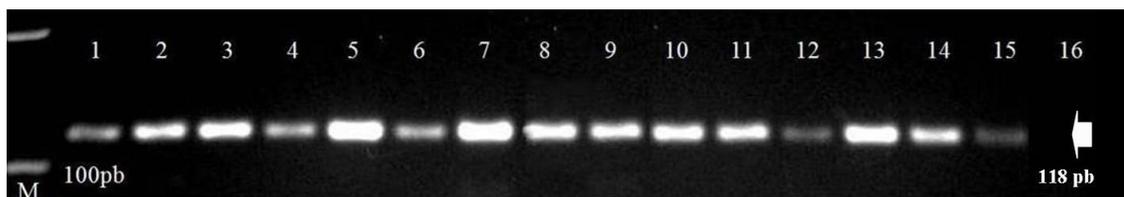


Figura 5.10 Expressão do cDNA do receptor do tipo II comum ao *GDF9* e *BMP15*, *BMPRII*, com 118 pb nas células da granulosa. Legenda: M=marcador 100 pb, D=dia, seguido da identificação do DNA transfecado. Réplica 1: 1=D1 *β-galactosidase*, 2=D1 *GDF9*, 3=D12 *β-galactosidase*, 4=D12 *BMP15*, 5=D12 *GDF9*, 6=D21 *β-galactosidase*, 7=D21 *BMP15*, 8=D21 *GDF9*. Réplica 2: 9=D1 *β-galactosidase*, 10=D1 *BMP15*, 11=D1 *GDF9*, 12=D12 *BMP15*, 13=D12 *GDF9*, 14=D21 *BMP15*, 15=D21 *GDF9*. A amostra de número 16 foi o controle negativo da reação de PCR, em que foi utilizado água no lugar de cDNA.



Figura 5.11 Expressão do cDNA do receptor tipo I específico ao *GDF9*, *ALK5*, com 152 pb nas células da granulosa. Legenda: M=marcador 100 pb, D=dia, seguido da identificação do DNA transfecado. Réplica 1: 1=D1 *β-galactosidase*, 2=D1 *GDF9*, 3=D12 *β-galactosidase*, 4=D12 *BMP15*, 5=D12 *GDF9*, 6=D21 *β-galactosidase*, 7=D21 *BMP15*, 8=D21 *GDF9*. Réplica 2: 9=D1 *β-galactosidase*, 10=D1 *BMP15*, 11=D1 *GDF9*, 12=D12 *BMP15*, 13=D12 *GDF9*, 14=D21 *BMP15*, 15=D21 *GDF9*. A amostra de número 16 foi o controle negativo da reação de PCR, em que foi utilizado água no lugar de cDNA.

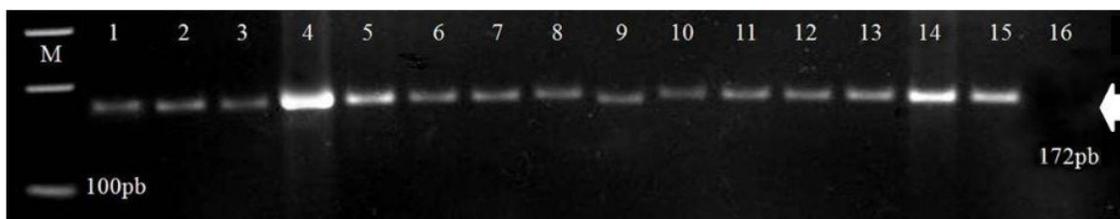


Figura 5.12 Expressão do cDNA do receptor tipo I específico ao *BMP15*, *ALK6*, com 172 pb nas células da granulosa. Legenda: M=marcador 100 pb, D=dia, seguido da identificação do DNA transfetado. Réplica 1: 1=D1 *β-galactosidase*, 2=D1 *GDF9*, 3=D12 *β-galactosidase*, 4=D12 *BMP15*, 5=D12 *GDF9*, 6=D21 *β-galactosidase*, 7=D21 *BMP15*, 8=D21 *GDF9*. Réplica 2: 9=D1 *β-galactosidase*, 10=D1 *BMP15*, 11=D1 *GDF9*, 12=D12 *BMP15*, 13=D12 *GDF9*, 14=D21 *BMP15*, 15=D21 *GDF9*. A amostra de número 16 foi o controle negativo da reação de PCR, em que foi utilizado água no lugar de cDNA.

Os resultados indicam que durante o processo de luteinização as células transgênicas contendo *BMP15* e *GDF9* assim como as células que não expressam *GDF9* ou *BMP15* continuam expressando os receptores *BMPRII*, *ALK5* e *ALK6*.

O padrão de expressão destes receptores foi investigado por Chen et al. (2009) em células da granulosa ovinas. O *BMPRII* e *ALK5* não tiveram expressão diferenciada com ou sem adição de FSH, entretanto, o FSH diminui a expressão do *ALK6* com 48 horas de cultivo. Não há FSH em nossas culturas e o padrão de expressão está de acordo com esses resultados, visto que o FSH atua com regulação mútua ao sistema BMP nos ovários, no qual os receptores BMPs são precisamente controlados no estágio dependente de hormônios durante o desenvolvimento folicular (Jayawardana et al., 2006; Miyoshi et al., 2006; 2007).

Segundo Fatehi et al. (2005) a expressão dos BMPs e receptores *BMPRII* *in vitro* ocorre mutuamente, desta maneira, com nossos resultados podemos afirmar que a expressão de todos os receptores atuam de maneira recíproca com a secreção dos fatores secretados pelo ovócito, o que também foi observado por diversos autores (Juengel & McNatty, 2005; Spicer et al., 2008; Wang & Roy, 2009).

Em nossos sistemas transgênicos, as células que produzem *GDF9/BMP15* são capazes de responder a secreção destes fatores de maneira autócrina via seus respectivos receptores, que continuam sendo expressos durante todo o cultivo. *In vivo* há atuação dos fatores de forma parácrina, visto que são secretados pelo ovócito e atuam nas células da granulosa.

### 5.3.3 Determinação da concentração dos hormônios estradiol (E<sub>2</sub>) e progesterona (P<sub>4</sub>) nos meios de cultura

Em um primeiro experimento, as transfecções foram realizadas em duplicata e os meios de cultura coletados de poços individuais a partir do dia 1 do cultivo (D1) consecutivamente até o quinto (Figura 5.13) e sexto (Figura 5.14) dia de cultivo. Como os meios de cultivo não foram trocados durante o transcorrer do experimento, as análises revelaram a concentração acumulada de progesterona.

No delineamento experimental posterior, a dosagem hormonal não foi cumulativa, visto que os meios de todos os poços eram trocados todos os dias. Isso ocorreu pelo motivo de que o meio de cultura não resiste na estufa por mais de 7 dias sem alterações de osmolaridade e pH, o que comprometeria os resultados. As transfecções subsequentes foram realizadas em duplicata e os meios de cultura coletados de poços individuais a partir do dia 1 do cultivo (D1) consecutivamente até o dia 12, complementando com os dias 15, 18 e 21 e armazenados a -80 °C para subsequente dosagem de P<sub>4</sub> e E<sub>2</sub>, através de kits de radioimunoensaio. As células que tiveram os meios retirados foram ressuspensas em Trizol e congeladas a -80 °C para a expressão gênica da contaminação celular, transgenia e presença dos receptores, e também a expressão do gene *StAR*.

Os níveis de progesterona (ng/mL) das dosagens não cumulativas do segundo experimento são mostrados nas Figuras 5.15 e 5.16. Os níveis de estradiol nos meios de cultura não foram detectados nas amostras, entretanto os controles com líquido folicular fresco apresentaram alta detecção do hormônio, comprovando a eficiência da dosagem com o kit. Este resultado sugere o que foi discutido anteriormente, que com a luteinização os níveis de estradiol declinam rapidamente em cultivo, não sendo possível sua detecção em nosso modelo experimental.

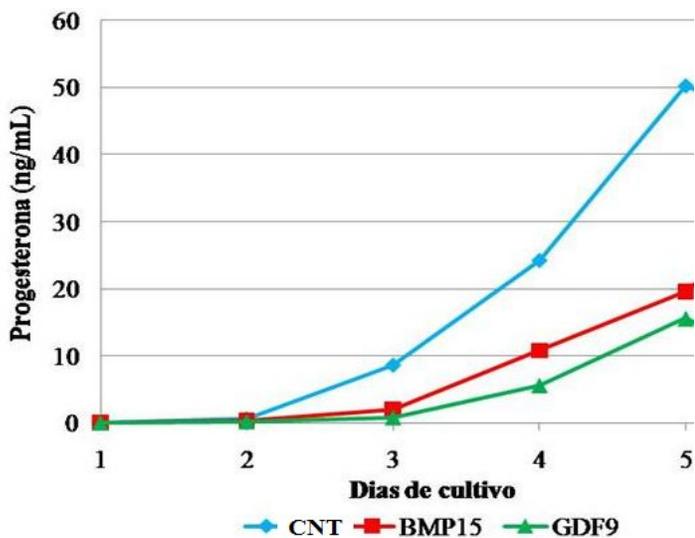


Figura 5.13 Dosagem acumulativa de progesterona em meios de cultura durante 5 dias. Réplica 1. CNT: controle não transgênico, *BMP15*: células transfectadas com *BMP15*, *GDF9*: células transfectadas com *GDF9*.

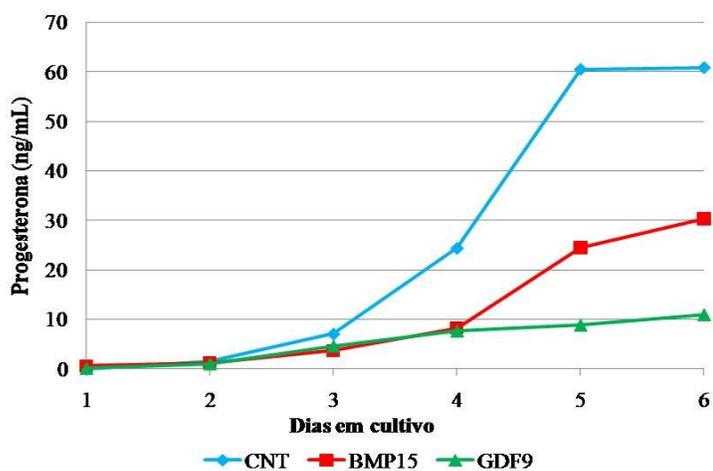


Figura 5.14 Dosagem acumulativa de progesterona em meios de cultura durante 6 dias. Réplica 2. CNT: controle não transgênico, *BMP15*: células transfectadas com *BMP15*, *GDF9*: células transfectadas com *GDF9*.

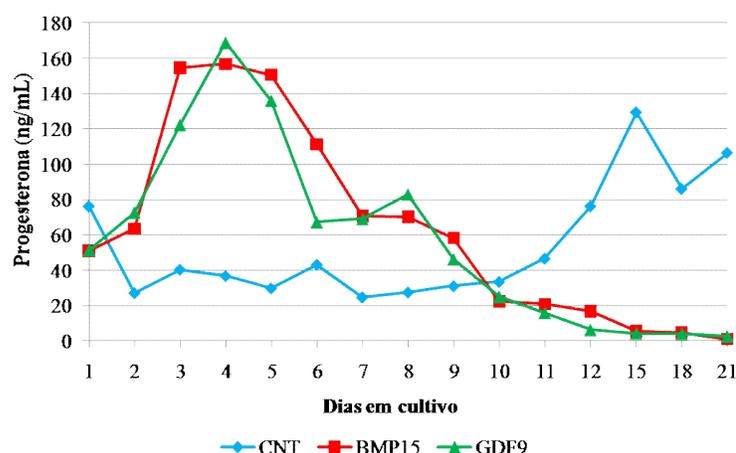


Figura 5.15 Dosagem não acumulativa de progesterona em meios de cultura durante 21 dias. Réplica 1. CNT: controle não transgênico, *BMP15*: células transfectadas com *BMP15*, *GDF9*: células transfectadas com *GDF9*.

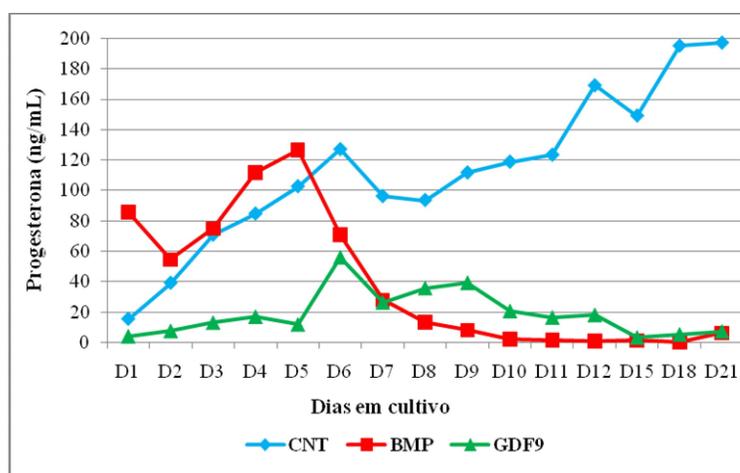


Figura 5.16 Dosagem não acumulativa de progesterona em meios de cultura durante 21 dias. Réplica 2. CNT: controle não transgênico, *BMP15*: células transfectadas com *BMP15*, *GDF9*: células transfectadas com *GDF9*.

A função do ovócito na regulação da esteroidogênese folicular foi sugerida pela primeira vez por El-Fouly e colaboradores (1970), que mostraram a luteinização de foliculos antrais de coelhos *in vivo* após a aspiração do complexo *cumulus oophorus*. Assim, outros autores como Vanderhyden & Macdonald (1998) também relataram que a produção hormonal das células da granulosa durante a foliculogênese era modulada pelo ovócito, que enviaria para as células somáticas um inibidor da produção de progesterona, de acordo com o estágio de desenvolvimento folicular. Desta maneira, esta hipótese há muito tempo é aceita

também pelos estudos de Hillensjo e colaboradores (1981), que afirmavam que células da granulosa removidas do folículo anteriormente ao pico de LH poderiam espontaneamente adquirir as características das células diferenciadas pelo LH (luteínicas), incluindo um aumento da expressão de receptores de LH e habilidade de secretar progesterona quando em cultivo. O tempo de diferenciação das células da granulosa bovinas em sistemas de cultura *in vitro* é semelhante à situação *in vivo*, visto que um período de 4 dias é requerido para as células proliferarem e se diferenciarem *in vitro*, o que corresponde ao tempo necessário desde o recrutamento até o crescimento e diferenciação de folículos ovulatórios bovinos (Meidan et al., 1990; Wathes & Denning- Kendall, 1992; Stock & Fortune, 1993; Turzillo & Fortune, 1993; Adams et al., 1994; Murphy, 2000).

Quando cultivadas *in vitro* em meio de cultura contendo soro e substrato, as células da granulosa diferenciadas se caracterizam pela forma alongada ou aspecto fibroblástico em 24 horas de cultivo, com agrupamentos esticados, formados por células de morfologia esférica que se assemelham às células internas do folículo (Langhout et al., 1991; Shimizu et al., 2009), o que também foi observado em nossos experimentos.

Neste experimento, as células não transgênicas, apresentaram produção de progesterona com níveis crescentes a partir do dia 2 de cultivo nas dosagens com hormônio acumulado e nos dias 1 e 2 nas dosagens com hormônio diário, o que demonstrou luteinização da cultura, com pico no dia 5 na primeira réplica com progesterona acumulada, o que tornou necessário replicar este experimento com 1 dia a mais (6 dias). Entretanto, este platô pode ser considerado adverso, pois segundo Rodway e colaboradores (1999), a progesterona tem um efeito regulador autócrino, ao controlar sua própria síntese pelas células da granulosa, em células com meio acumulativo como neste caso, as células podem ter interrompido a síntese de progesterona em resposta à sua saturação no meio. O meio acumulado pode ocasionar alguns reveses, não somente pelo *feedback* negativo que a produção hormonal exerce sobre as células da granulosa, mas também pela alteração do pH e osmolaridade que podem inviabilizar a síntese máxima do hormônio. Por estes motivos, foi necessária a elaboração destes primeiros experimentos, para o delineamento experimental mais acurado, visto também que o laboratório não tinha estabelecido os sistemas de cultivo de células da granulosa anteriormente.

Nos estudos de Silva & Price (2000) foi observado que a secreção de progesterona aumentou com o tempo de cultivo e atingiu um nível máximo no dia 8, que foi o último dia avaliado da cultura, valores parecidos com os encontrados por nossa equipe. Resultados semelhantes foram divulgados pela equipe de Morán (2000), no qual a

concentração do hormônio aumentou com o tempo de cultivo, com platô no dia 4. Alguns autores concluíram que a síntese de progesterona pelas células da granulosa aumenta durante as primeiras 48 horas de cultivo, o que sugere o início da luteinização (Gutiérrez et al., 1997; Pescador et al., 1999). Outros estudos demonstraram que o sistema de cultura *in vitro* de células da granulosa bovinas é caracterizado pelo declínio acentuado na produção de estradiol relacionado ao período de tempo em cultivo, enquanto que a síntese de progesterona apresenta incremento, que se deve ao início da luteinização (Luck et al., 1990; Gong et al., 1994; Vernon & Spicer, 1994; Campbell et al., 1996; Campbell & Baird, 2001), padrão similar ao observado em células da granulosa de camundongos (Hirshfield, 1991).

Nos experimentos de 21 dias, o primeiro pico de produção de progesterona ocorreu no dia 6, com decréscimo seguido de aumento progressivo até os dias 12, 15 e 18 de cultivo, o que está de acordo com Gutiérrez e colaboradores (1997). Nesse estudo, foi observada uma alta concentração inicial de progesterona (entre 40 e 550ng/mL) em cultura de células não transgênicas, que diverge com os resultados de Pescador e colaboradores (1999), que obtiveram valores entre 500 e 800 ng/mL após 48 horas do início do cultivo e entre 100 a 300 ng/mL após 144 horas de cultivo de células da granulosa de bovinos holandeses, em sistemas de cultura que utilizavam soro em sua constituição.

O meio de cultura trocado todos os dias dispõe de menores interferências, visto que a secreção de progesterona não satura o meio e este está sempre fresco e sem alterações de pH e osmolaridade. Esses achados validam o uso das células da granulosa luteinizadas *in vitro* como modelo para a cultura de células bovinas (Meidan et al. 1990; Montaña et al., 2009), visto que o estudo da função das células da granulosa *in vivo* é complicado pelos efeitos das células da teca, hormônios periféricos e fatores de crescimento. O entendimento da fisiologia celular da granulosa durante o desenvolvimento folicular é limitado ao uso dos sistemas *in vitro*, nos quais as células perdem a habilidade de secretar estradiol e expressar P450arom, e o principal fator limitante encontrado na literatura são as condições de cultura não idênticas (Henderson & Moon, 1979; Skinner & Osteen, 1988; Roberts & Echterkamp, 1994; Berndtson et al., 1995; Berndtson et al., 1996; Vandervoot et al., 2000; Shimada et al., 2006).

Nossos resultados demonstraram que os fatores secretados pelo ovócito (*BMP15* e *GDF9*) exercem influência na luteinização das células da granulosa bovinas cultivadas *in vitro*, em concordância com resultados de Li e colaboradores (2000). Esses fatores também regulam a esteroidogênese das células da granulosa numa maneira dose-dependente em várias espécies. Enquanto a produção de estradiol em células do *cumulus*

*oophorus* de suínos é inibida pelos fatores secretados pelo ovócito (Coskun et al., 1995), é incrementada em células do *cumulus oophorus* de camundongos (Vanderhyden et al., 1993; 1995).

Em nosso estudo, houve um incremento na produção de progesterona sob ação do *BMP15* bovino em células da granulosa transgênicas até os dias 3 e 4 de cultivo, no primeiro experimento com meio fresco e nos dias 5 e 6 em meio com hormônio acumulado, com decréscimo constante nos experimentos com 21 dias de dosagens, enquanto que estudos indicam um grande efeito inibitório do *BMP15* humano na produção de progesterona pelas células da granulosa, no qual o tratamento combinado com *BMP15* e LH (ou FSH) causou uma diminuição na secreção de progesterona (Elis et al., 2007).

Nossos resultados demonstram que as células da granulosa são estimuladas a produzir progesterona quando cultivadas em meio de cultura suplementada com soro bovino, o qual provavelmente lhes forneceu fatores estimuladores da via esteroidogênica e/ou precursores. Entretanto, em células da granulosa transfectadas com *BMP15* a produção inicial de progesterona atinge um platô entre os dias 5 e 6 de cultivo, com meio acumulado, no qual não se sabe se é resultado de saturação deste meio, e picos nos dias 3 e 5 com meio não acumulativo, com decréscimo logo após. As células transfectadas com *GDF9* demonstraram uma maior inibição na secreção de progesterona, com picos nos dias 5 e 6, quando observado o comportamento da síntese hormonal em meio acumulado, e ponto máximo nos dias 4 e 6, com decréscimo logo após e novo pico menor nos dias 8 e 9, não havendo necessariamente um platô da secreção em células não transgênicas quando o meio de cultivo era renovado diariamente, o que é inédito e indica que mesmo após 21 dias as células não transgênicas continuam a aumentar a síntese de secreção de  $P_4$ .

Isto demonstra que o *GDF9* e *BMP15* conseguem atuar no nosso meio de cultura de maneira autócrina, o que difere da sua ação *in vivo*. As células se mostraram responsivas aos fatores, entretanto, esta variabilidade inicial de secreção de progesterona não tem explicação encontrada na literatura e pode ser devido à transfecção das células, visto que estas foram selecionadas com antibiótico até o dia 20 de cultivo e a luteinização inicial pode ser pelo período de tempo necessário para o início da secreção dos genes exógenos transfectados, pelo fato de que as células da granulosa obtiveram elevadas taxas de transfecção. De acordo com Elvin e colaboradores (2000), a produção de progesterona em camundongos não foi incrementada até 12 horas após a adição do *GDF9*, o que corrobora nossos resultados.

O *GDF9* e *BMP15* recombinantes são conhecidos por mediar o desenvolvimento folicular e inibir a esteroidogênese nas células somáticas do ovário (Elvin et al., 1999, 2000; Solovyeva et al., 2000; Vitt et al., 2000a; b; Otsuka et al., 2000, 2001; Yan et al., 2001). Sabe-se por estudos anteriores que ambos os genes estimulam a inibição da produção de progesterona pelas células da granulosa de humanos (Yamamoto et al., 2002; Kaivo-Oja et al., 2003; Morinaga et al., 2004) e ratos (Otsuka et al., 2000; Vitt et al., 2000a; b; Roh et al., 2003; Shimasaki et al., 2004). Em *Bos taurus*, apenas um trabalho provou de maneira parácrina que células da granulosa obtidas de vacas tratadas com *GDF9* tiveram um decréscimo dose-dependente na produção de progesterona e estradiol (Spicer et al., 2006). Já a equipe de Brankin (2003) indicou que essa supressão está ligada ao estímulo da síntese de estradiol pelas células da granulosa em seis dias de cultura *in vitro*, o que não foi constatado em nossos resultados.

É importante ressaltar que todos os trabalhos existentes, estão fundamentados na atuação parácrina dos fatores secretados pelo ovócito nas células da granulosa cultivadas *in vitro*, com a adição do *GDF9* e *BMP15* ao meio de cultivo. Entretanto, a purificação dos fatores através de colunas comerciais para o uso no meio de cultivo pode ser tóxica para as células e assim inibir a esteroidogênese. Outro motivo que nos levou a utilizar o modelo de células transgênicas com atuação autócrina foi devido à concentração dos fatores adicionados ao meio, que exibem grandes variações em diversos trabalhos (Eppig et al., 1997). Assim, nosso estudo foi planejado com a intenção de evitar os efeitos da purificação por colunas e o efeito da variação de concentração, visto que a concentração é constante. Outra fonte de variação observável pode ser devido ao mecanismo molecular de cooperatividade existente entre os fatores de crescimento e diferenciação e as células da granulosa entre diferentes espécies (McNatty et al., 2005a; b; McIntosh et al., 2008).

#### **5.3.4 Expressão gênica dos mRNA do gene *StAR* na cultura de células da granulosa**

A Figura 5.17 mostra a eletroforese do PCR convencional para a expressão do cDNA do gene *StAR*, com *amplicon* de 135 pb, envolvido diretamente com a síntese de progesterona.



Figura 5.17 Expressão do cDNA do gene *StAR*, com 135 pb nas células da granulosa. Legenda: M=marcador 100 pb, D=dia, seguido do DNA transfetado. Réplica 1: 1=D1  $\beta$ -galactosidase, 2=D1 *GDF9*, 3=D12  $\beta$ -galactosidase, 4=D12 *BMP15*, 5=D12 *GDF9*, 6=D21  $\beta$ -galactosidase, 7=D21 *BMP15*, 8=D21 *GDF9*. Réplica 2: 9=D1  $\beta$ -galactosidase, 10=D1 *BMP15*, 11=D1 *GDF9*, 12=D12 *BMP15*, 13=D12 *GDF9*, 14=D21 *BMP15*, 15=D21 *GDF9*. A amostra de número 16 foi o controle negativo da reação de PCR, em que foi utilizado água no lugar de cDNA.

Durante muito tempo acreditou-se que o fator limitante da esteroidogênese fosse devido à ativação da enzima *CYP11A1*, responsável pela conversão do colesterol em pregnenolona (Bao et al, 1998). No entanto, estudos recentes demonstram que o ponto crítico na via é o transporte do colesterol da membrana mitocondrial externa para a membrana mitocondrial interna, onde a enzima *CYP11A1* está localizada. Este ponto é limitante devido às propriedades hidrofóbicas que impossibilitam a passagem do colesterol por difusão simples através do espaço predominantemente aquoso entre a membrana externa e interna das mitocôndrias, para ter acesso à *CYP11A1* (Stocco, 2001). Portanto, a principal função da *StAR* é o transporte do colesterol livre da membrana externa para a membrana interna da mitocôndria (Stocco, 2001; Miller, 2007).

O *StAR* é essencial para a esteroidogênese, sendo o primeiro aparecer nas células da granulosa após a sinalização das gonadotrofinas que provoca a ovulação (Channing & Ledwitz-Rigby, 1974; Espey & Richards, 2002) e seu pico de expressão ocorre após a diferenciação terminal, quando o corpo lúteo sintetiza substâncias como a progesterona (Orly & Stocco, 1999; Pescador et al., 1999). Este padrão de expressão aponta o *StAR* como um importante marcador do processo de luteinização, visto que a conversão do colesterol para pregnenolona é um passo determinante na esteroidogênese das células da granulosa. Na luteinização das células da granulosa há a troca da produção de estrógenos para progestágenos e as células da granulosa começam a expressar os genes *StAR* e *CYP11A1*; sendo capazes de usar colesterol como substrato (Pescador et al., 1999). A taxa de síntese de pregnenolona depende do nível e atividade da reação catalisada pela enzima P450 scc, que é limitada principalmente pelo acesso para o substrato colesterol via a atividade de *StAR* (Rennert & Chang, 1993). É bem estabelecido que o AMPcíclico intracelular induzido por FSH e LH, conduz ao estímulo subsequente de síntese de mRNA do *CYP11A1* e *StAR*, estimulando a

síntese de progesterona *in vitro* (Richards & Hedin, 1988; Clark et al., 1995; Arakane et al., 1997). A expressão gênica do *StAR* por meio de reações de PCR em tempo real estão demonstradas na Figura 5.18, visto que as amostras do dia 12 correspondente ao gene transfectado  $\beta$ -galactosidase e dia 21 do *GDF9* foram perdidas.

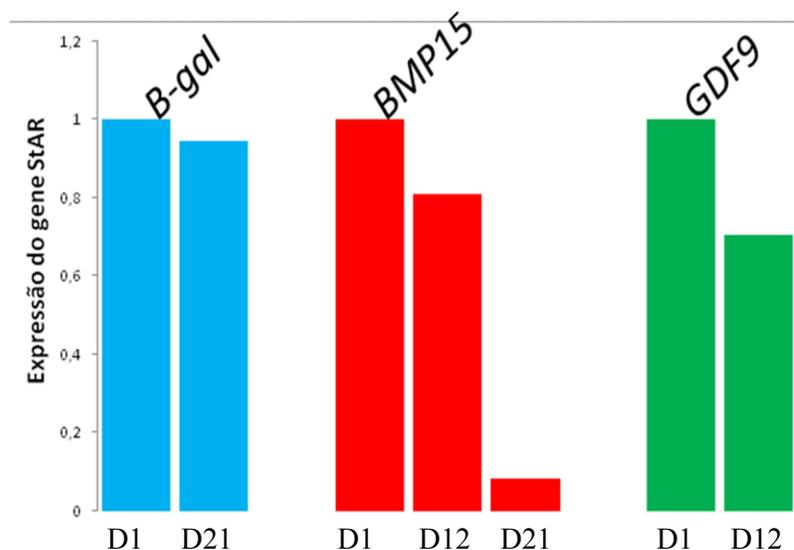


Figura 5.18 Expressão do gene *StAR* por meio de PCR em tempo real (qPCR). D= dia.

A expressão do *StAR* foi analisada pelo fato de ser um dos principais marcadores ativos da luteinização. Assim foi investigada a possibilidade do efeito inibitório exercido pelos fatores *BMP15* e *GDF9* sobre síntese de progesterona ser via a inibição da expressão de *StAR*. Nossos resultados demonstraram através do PCR convencional que o *StAR* continua sendo expresso após o pico de inibição da produção de progesterona, o que indicaria que o processo inibitório não seria pelo bloqueio desta via. Entretanto, a expressão por PCR em tempo real (que é quantitativa) nos indica que o *GDF9* e o *BMP15* inibem a expressão do gene *StAR* durante o processo de luteinização, visto que a expressão do gene  $\beta$ -galactosidase no dia 21 continua semelhante ao primeiro dia do cultivo e os níveis do mRNA de *StAR* decaem progressivamente.

## 6 CONCLUSÕES

As células transgênicas da linhagem MDBK e da granulosa foram capazes de expressar os mRNAs e proteínas codificadas pelos genes *GDF9* e *BMP15* em cultivo *in vitro*. Os fatores secretados pelo ovócito *BMP15* e *GDF9*, exercem ação inibitória sobre a produção de progesterona de células da granulosa cultivadas *in vitro*, em um ambiente favorável a luteinização. Essa ação do *GDF9* e *BMP15* sobre a diferenciação das células da granulosa parece ocorrer por uma via que leva a inibição da expressão do gene *Star*, principal fator limitante da via estereidogênica nas células da granulosa.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G. P.; EVANS, A. C. O.; RAWLINGS, N. C. Follicle waves and circulating gonadotrophins in 8-month-old prepubertal heifers. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 100, p. 27-33, 1994.

ARAKANE, F.; KING, S. R.; DU, Y.; KALLEN, C. B.; WALSH, L. P.; WATARI, H.; STOCCO D. M.; STRAUSS, J. F. Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 32656–32662, 1997.

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

BEN-HUR, H.; PRAGER, A.; RIKLIS E. Enhancement of thermal killing by polyamines. I. Survival of chinese hamster cells. **International Journal of Cancer**, v. 22, p. 602- 606, 1978.

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

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

BIASE, F. H. et al. Protocol for extraction of genomic DNA from swine solid tissues. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 3, p. 313-315, 2002.

BIRBOIM, H. C.; DOLLY, J. A rapid alkaline extraction procedure of screening recombinant plasmid DNA. **Nucleid Acids Research**, v. 7, p. 1517-1523, 1979.

BRANKIN, V.; MITCHELL, M.; WEBB, R.; HUNTER, M. G. Paracrine effects of oocyte secreted factors and stem cell factor on porcine granulosa and theca cells in vitro. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 55, 2003.

BURATINI, JUNIOR, J.; TEIXEIRA, A. B.; COSTA, I. B.; GLAPINSKI, V. F.; PINTO, M. G. L.; GIOMETTI, I. C.; BARROS, C. M.; CAO, M.; NICOLA, E. S.; PRICE, C. A. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. **Reproduction Research**, v. 130, p. 343–350, 2005.

CAMPBELL, B. **Factors affecting ovulation rate in sheep and cattle**. Sydney: University of Sydney, 1988. Ph.D. thesis- University of Sydney, 1988.

CAMPBELL, B. K.; SCARAMUZZI, R. J.; WEBB, R. Induction and maintenance of oestradiol and immunoreactive inhibin production with FSH by ovine granulosa cells cultured in serum-free media. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 106, p. 7–16, 1996.

CAMPBELL B. K.; BAIRD, D. T. Inhibin A is a follicle stimulating hormone-responsive marker of granulosa cell differentiation, which has both autocrine and paracrine actions in sheep **Journal of Endocrinology**, v. 169, p. 333–345, 2001.

CHANNING, C. P. LEDWITZ-RIGBY, F. The corpus luteum studies in vitro. **Basic Life Sciences**, v. 4, p. 353–370, 1974.

CHEN, A. Q.; YU, S. D.; WANG, Z. G.; XU, Z. R.; YANG, Z. G. Stage-specific expression of bone morphogenetic protein type I and type II receptor genes: Effects of follicle-stimulating hormone on ovine antral follicle. **Animal Reproduction Science**, v.111, p. 391–399, 2009.

CLARK, B. J.; SOO, S. C.; CARON, K. M.; IKEDA, Y.; PARKER, K. L.; STOCCO, D. M. Hormonal and developmental regulation of the steroidogenic acute regulatory protein. **Molecular Endocrinology**, v. 9, p. 1346–55, 1995.

COLOMA, M. J.; CLIFT, A.; WIMS, L.; MORRISON, S. L. The role of carbohydrate in the assembly and function of polymeric IgG. **Molecular Immunology**, v. 37, p. 1081- 1090, 2000.

COMFORT, A. **The Biology of Senescence**. Elsevier Science Ltd: New York, 1978, 414p.

COSKUN, S.; UZUMCU, M.; LIN, Y. C.; FRIEDMAN, C. I.; ALAK, B. M. Regulation of cumulus cell steroidogenesis by the porcine oocyte and preliminary characterization of oocyte-produced factor(s). **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 670–675, 1995.

DASS, C. R. Lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: factors affecting *in vivo* transfection. **Journal of Molecular Medicine**, v. 82, p. 579-591, 2004.

DONG, J.; ALBERTINI, D. F.; NISHIMORI, K.; RAJENDRA KUMAR, T.; LU, N.; MATZUK, M. M. Growth differentiation factor- 9 is required during early ovarian folliculogenesis. **Nature**, v. 383, p. 531-535, 1996.

DRAGOVIC, R. A.; RITTER, L. J.; SCHULZ, S. J.; AMATO, F.; ARMSTRONG, D. R. T.; GILCHRIST, R. B. Role of oocyte-secreted growth differentiation factor 9 in the regulation of mouse cumulus expansion. **Endocrinology**, v. 146, n. 6, p. 2798-2806, 2005.

EL-FOULY, M. A.; COOK, B.; NEKOLA, M.; NALBANDOV, A. V. Role of the ovum in follicular luteinization. **Endocrinology**, v. 87, p. 288–293, 1970.

ELIS, S.; DUPONT, J.; COUTY, I.; PERSANI, L.; GOVOROUN, M.; BLESBOIS, E.; BATELLIER, F.; MONGET, P. Expression and biological effects of bone morphogenetic protein-15 in the hen ovary. **Journal of Endocrinology**, v. 194, p. 485–497, 2007.

ELVIN, J. A.; CLARK, A. T.; WANG, P.; WOLFMAN, N. M.; MATZUK, M. M. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. **Molecular Endocrinology**, v. 13, n. 6, p. 1035-1048, 1999.

ELVIN, J. A.; YAN, C.; MATZUK, M. M. Growth differentiation factor-9 stimulates progesterone synthesis in granulosa cells via prostaglandin E<sub>2</sub>/EP2 receptor pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 18, p. 10288-10293, 2000.

EPPIG, J. J.; CHESNEL, F.; HIRAO, Y.; O'BRIEN, M. J.; PENDOLA, F. L.; WATANABE, S.; WIGGLESWORTH, K. Oocyte control of granulosa cell development: how and why. **Human Reproduction**, v. 12, p. 127–132, 1997.

ESPEY, L. L.; RICHARDS, J. S. Temporal and spatial patterns of ovarian gene transcription following an ovulatory dose of gonadotropin in the rat. **Biology of Reproduction**, 67, p. 1662–1670, 2002.

FATEHI, A. N.; VAN DEN HURK, R.; COLENBRANDER, B.; DAEMEN, A. J. J. M.; VAN TOL, H. T. A.; MONTEIRO, R. M.; ROELEN, B. A. J.; BEVERS, M. M. Expression of bone morphogenetic protein2 (BMP2), BMP4 and BMP receptors in the bovine ovary but absence of effects of BMP2 and BMP4 during IVM on bovine oocyte nuclear maturation and subsequent embryo development. **Theriogenology**, v. 63, p. 872–889, 2005.

GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J.; ARMSTRONG, D. T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 431-446, 2004.

GONG, J. G.; MCBRIDE, D.; BRAMLEY, T. A.; WEBB, R. Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin-like growth factor-I and insulin on bovine granulosa cell steroidogenesis in vitro. **Journal of Endocrinology**, v. 143, p. 157–164, 1994.

GUTIÉRREZ, C. G.; CAMPBELL, B. K.; WEBB, R. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 608-616, 1997.

HAMILTON, M. L.; VAN REMMEN, H.; DRAKE, J. A.; YANG, H.; GUO, Z. M.; KEWITT, K.; WALTER, C. A.; RICHARDSON, A. Does oxidative damage to DNA increase with age? **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 10469-10474, 2001.

HANRAHAN, J. P.; GREGAN, S. M.; MULSANT, P.; MULLEN, M.; DAVIS, G. H.; POWELL R.; GALLOWAY, S. M. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*ovis aries*). **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 900-909, 2004.

HASHIMOTO, O.; MOORE, R. K.; SHIMASAKI, S. Post translation processing of mouse and human BMP-15: potential implication in the determination of ovulation quota. **Proceedings of the National Academy Science**, v. 102, n. 15, p. 5426-5431, 2005.

HAYASHI, M.; MCGEE, E. A.; MIN, G.; KLEIN, C.; ROSE, U. M.; VAN DUIN, M.; HSUEH, A. J. W. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. **Endocrinology**, v. 140, n. 3, p. 1236-1244, 1999.

HENDERSON, K. M.; MOON, Y. S. Luteinization of bovine granulosa cells and corpus luteum formation associated with loss of androgenaromatizing ability. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 56, p. 89-97, 1979.

HILLENSTJO, T.; MAGNUSSON, C.; SVENSSON, U.; THELANDER, H. Effect of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone on progesterone synthesis by cultured rat cumulus cells. **Endocrinology**, v. 108, p. 1920-1924, 1981.

HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary. **International Review of Cytology**, v. 124, p. 43-101, 1991.

HREINSSON, J. G.; SCOTT, J. E.; RASMUSSEN, C.; SWAHN, M. L.; HSUEH, A. J. W.; HOVATTA, O. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, p. 316-321, 2002.

HUSSEIN, T. S.; FROILAND, T. S.; AMATO, F.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R. B. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 22, p. 5257-5268, 2005.

HUSSEIN, T. S.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R. B. Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. **Developmental Biology**, v. 296, p. 514-521, 2006.

JAYAWARDANA, B. C.; SHIMIZU, T.; NISHIMOTO, H.; KANEKO, E.; TETSUKA, M.; MIYAMOTO, A. Hormonal regulation of expression of growth differentiation factor-9 receptor type I and II genes in the bovine ovarian follicle. **Reproduction**, v. 131, p. 545-553, 2006.

JUENGEL, J. L.; MCNATTY, K. P. The role of proteins of the transforming growth factor- $\beta$  superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. **Human Reproduction Update**, v. 11, n. 2, p. 144-161, 2005.

- KAIVO-OJA, N.; BONDESTAM, J.; KAMARAINEN, M.; KOSKIMIES, J.; VITT, U.; CRANFIELD, M.; VUOJOLAINEN, K.; KALLIO, J. P.; OLKKONEN, V. M.; HAYASHI, M.; MOUSTAKAS, A.; GROOME, N. P.; ten DIJKE, P.; HSUEH, A. J.; RITVOS, O. Growth Differentiation Factor-9 induces Smad2 activation and inhibin B production in cultured human granulosa-luteal cells. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, p. 755-762, 2003.
- LABAT-MOLEUR, F.; STEFFAN, A. M.; BRISSON, C.; PERRON, H.; FEUGEAS, O.; FURSTENBERGER, P.; OBERLING, F.; BRAMBILLA, E.; BEHR, J. P. An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines. **Gene Therapy**, v. 3, p. 1010-1017, 1996.
- LANGHOUT, D. J.; SPICER, L. J.; GEISERT, R. D. Development of a culture system for bovine granulosa cells: effects of growth hormone, estradiol, and gonadotropins on cell proliferation, steroidogenesis, and protein synthesis. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 3321-3334, 1991.
- LANUZA, G. M.; FISCHMAN, M. L.; BARANAO, J. L. Growth promoting activity of oocytes on granulosa cells is decreased upon meiotic maturation. **Developmental Biology**, v. 197, p. 129-139, 1998.
- LI, R.; NORMAN, R. J.; ARMSTRONG, D. T.; GILCHRIST, R. B. Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 839-845, 2000.
- LI, H. K.; KUO, T. Y.; YANG, H. S.; CHEN, L. R.; LI, S. S. L.; HUANG, H. W. Differential gene expression of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 during *in vitro* maturation of porcine oocytes and early embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 103, p. 312-322, 2008.
- LISAUSKAS, S. F. C.; RECH, E. L.; ARAGÃO, F. J. L. Characterization of transgene integration loci in transformed madin darby bovine kidney cells. **Cloning and Stem Cells**, v. 9, p. 456-460, 2007.
- LUCK, M. R.; RODGERS, R. J.; FINDLAY, J. K. Secretion and gene expression of inhibin, oxytocin and steroid hormones during the *in vitro* differentiation of bovine granulosa cells. **Reproduction Fertility and Development**, v. 2, p. 11-25, 1990.
- MASTERS, J. R.; STACEY, G. N. Changing medium and passaging cells lines. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2277-2284, 2007.
- MAZERBOURG, S.; KLEIN, C.; ROH, J.; KAIVO-OJA, N.; MOTTERSHEAD, D. G.; KORCHYNSKI, O.; RITVOS, O. Growth differentiation factor-9 signaling is mediated by the type I receptor, activin receptor-like kinase 5. **Molecular Endocrinology**, v. 18, p. 653-665, 2004.
- McINTOSH, C. J.; LUN, S.; LAWRENCE, S.; WESTERN, A. H.; MCNATTY, K. P.; JUENGEL, J. L. The proregion of mouse BMP15 regulates the cooperative interactions of BMP15 and GDF9. **Biology of Reproduction**, v. 79, p. 889-896, 2008.

- MCMAHON, H. E.; SHARMA, S.; SHIMASAKI, S. Phosphorylation of bone morphogenetic protein-15 and growth and differentiation factor-9 plays a critical role in determining agonistic or antagonistic functions. **Endocrinology**, v. 149, p. 812–817, 2008.
- McNATTY, K. P.; SMITH, P.; MOORE, L. G.; READER, K.; LUN, S.; HANRAHAN, J. P.; GROOME, N. P.; LAITINEN, M.; RITVOS, O.; JUENGEL, J. L. Oocyte expressed genes affecting ovulation rate. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 234, p. 57–66, 2005a.
- McNATTY, K. P.; JUENGEL, J. L.; READER, K. L.; LUN, S.; MYLLYMAA, S.; LAWRENCE, S. B.; WESTERN, A.; MEERASAHIB, M. F.; MOTTERSHEAD, D. G.; GROOME, N. P.; RITVOS, O.; LAITINEN, M. P. E. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function. **Reproduction**, v. 129, p. 473–480, 2005b.
- MEIDAN, R.; GIRSH, E.; BLUM, O.; ABERDAM, E. In vitro differentiation of bovine theca and granulosa cells into small and large luteal-like cells: morphological and functional characteristics. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 913–921, 1990.
- MILLER, W. L. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1771, p. 663–676, 2007.
- MIYOSHI, T.; OTSUKA, F.; SUZUKI, J.; TAKEDA, M.; INAGAKI, K.; KANO, Y.; OTANI, H.; MIMURA, Y.; OGURA, T.; MAKINO, H. Mutual regulation of follicle-stimulating hormone signaling and bone morphogenetic protein system in human granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v. 74, p. 1073–1082, 2006.
- MIYOSHI, T.; OTSUKA, F.; SUZUKI, J.; TAKEDA, M.; INAGAKI, K.; KANO, Y.; OTANI, H.; MIMURA, Y.; OGURA, T.; MAKINO, H. Differential regulation of steroidogenesis by bone morphogenetic proteins in granulosa cells: involvement of extracellularly regulated kinase signaling and oocyte actions in follicle-stimulating hormone induced estrogen production. **Endocrinology**, v. 148, p. 337–345, 2007.
- MONTAÑO, E.; OLIVERA, M.; RUIZ-CORTÉS, Z. T. Association between leptin, LH and its receptor and luteinization and progesterone accumulation (P<sub>4</sub>) in bovine granulosa cell in vitro. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 44, p. 699–704, 2009.
- MORÁN, F. M.; CONLEY, A. J.; CORBIN, C. J.; ENAN, E.; VANDEVOORT, C.; OVERSTREET, J. W.; LASLEY, B. L. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin decreases estradiol production without altering the enzyme activity of cytochrome P450 aromatase of human luteinized granulosa cells in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 1102–1108, 2000.
- MORINAGA, H.; YANASE, T.; NOMURA, M.; OKABE, T.; GOTO, K.; HARADA, N.; NAWATA, H. A benzimidazole fungicide, benomyl, and its metabolite, carbendazim, induce aromatase activity in a human ovarian granulosa-like tumor cell line (KGN). **Endocrinology**, v. 145, p. 1860–1869, 2004.

MOTTERSHEAD, D. G.; PULKKI, M. M.; MUGGALLA, P.; PASTERNAK, A.; TOLONEN, M.; MYLLYMAA, S.; KORCHYNSKYI, O.; NISHI, Y.; YANASE, T.; LUN, S.; JUENGEL, J. L.; LAITINEN, M.; RITVOS, O. Characterization of recombinant human growth differentiation factor-9 signaling in ovarian granulosa cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 283, p. 58-67, 2008.

MURPHY, B. D. Models of luteinization. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 2-11, 2000.

OLIVEIRA, R. R.; CARVALHO, D. M.; LISAIUSKAS, S.; MELO, E.; VIANNA, G. R.; DODE, M. A. N.; RUMPF, R.; ARAGÃO, F. J. L.; RECH, E. L. Effectiveness of liposomes to transfect livestock fibroblasts. **Genetics and Molecular Research**, v. 4, p. 185-196, 2005.

ORISAKA, M.; JIANG, J. Y.; ORISAKA, S.; KOTSUJI, F.; TSANG, B. K. Growth Differentiation Factor 9 promotes rat preantral follicle growth by up-regulating follicular androgen biosynthesis. **Endocrinology**, v. 150, n. 6, p. 2740-2748, 2009.

ORLY, J.; STOCCO, D. M. The role of the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein in female reproductive tissues. **Hormone and Metabolism Research**, v. 31, p. 389-398, 1999.

OTSUKA, F.; YAO, Z.; LEE, T.; YAMAMOTO, S.; ERICKSON, G. F.; SHIMASAKI, S. Bone morphogenetic protein-15: Identification of target cells and biological functions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 50, p. 39523-39528, 2000.

OTSUKA, F.; YAMAMOTO, S.; ERICKSON, G. F.; SHIMASAKI, S. Bone Morphogenetic Protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 14, p. 11387-11392, 2001.

PATIL, S. D.; RHODES, D. G.; BURGESS, D. J. Biophysical characterization of anionic lipoplexes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1171, p. 1-11, 2005.

PESCADOR, N.; STOCCO, D. M.; MURPHY, B. D. Growth factor modulation of steroidogenic acute regulatory protein and luteinization in the pig ovary. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 1453-1461, 1999.

RENNERT, H.; CHANG, Y. I. J. S. 1993 Intracellular cholesterol dynamics in steroidogenic cells. In: LC Adashi EY (Ed.) **The Ovary**. Raven Press: New York, 1993. p.147-164.

RICHARDS, J. S.; HEDIN, L. Molecular aspects of hormone action in ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. **Annual Review of Physiology**, v. 50, p. 441-463, 1988.

ROBERTS, A. J.; ECHTERNKAMP, S. E. In vitro production of estradiol by bovine granulosa cells: evaluation of culture condition, stage of follicular development, and location of cells within follicles. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 273-282, 1994.

RODWAY, M. R.; SWAN, C. L.; CRELLIN, N. K.; GILLIO-MEINA, C.; CHEDRESE, P. J. Steroid regulation of progesterone synthesis in a stable porcine granulosa cell line: a role for progestins. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 68, p. 173-180, 1999.

ROH, J. S.; BONDESTAM, J.; MAZERBOURG, S.; KAIVO-OJA, N.; GROOME, N.; RITVOS, O.; HSUEH, A. J. Growth differentiation factor-9 stimulates inhibin production and activates smad2 in cultured rat granulosa cells. **Endocrinology**, v. 144, p. 172-178, 2003.

ROMOREN, K.; FJELD, X. T. L.; POLEO, A. B. S.; SMISTAD, G.; THU, B. J. EVENSEN, O. Transfections efficiency and cytotoxicity of cationic liposomes in primary cultures of rainbow trout (*Oncorhynchus mukiss*) gill cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1717, p. 50-57, 2005.

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

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 2001, 1009p.

SCARAMUZZI, R.; ADAMS, N. R.; BAIRD, D. T.; CAMPBELL, B. K.; DOWNING, J. A.; FINDLAY, J. K.; HENDERSON, K. M.; MARTIN, G. B.; McNATTY, K. P.; McNEILLY, A. S.; TSONIS, C. G. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, p. 459-478, 1993.

SHI, F.; CHEUNG, A. P.; LEUNG, P. C. K. Growth differentiation factor 9 (GDF9) enhances activin A-induced inhibin B production in human granulosa cells. **Endocrinology**, v. 150, p. 3540- 3546, 2009.

SHIMADA, M.; HERNANDEZ-GONZALEZ, I.; GONZALEZ-ROBAYNA, I.; RICHARDS, 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.

SHIMASAKI, S.; MOORE, R. K.; OTSUKA, G.; ERICKSON, G. F. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 1, p. 72-101, 2004

SHIMIZU, T.; SUDO, N.; YAMASHITA, H.; MURAYAMA, C.; MIYAZAKI, H.; MIYAMOTO, A. Histone H3 acetylation of StAR and decrease in DAX-1 is involved in the luteinization of bovine granulosa cells during in vitro culture. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 328, p. 41-47, 2009.

SILVA, J. M.; PRICE, C. A. Effect of follicle-stimulating hormone on steroid secretion and messenger ribonucleic acids encoding cytochromes P450 aromatase and cholesterol side-chain cleavage in bovine granulosa cells in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 186-191, 2000.

SKINNER, M. K.; OSTEEN, K. G. Developmental and hormonal regulation of bovine granulosa cell function in the preovulatory follicle. **Endocrinology**, v. 123, p. 1668-1675, 1988.

SOLOVYEVA, E. V.; HAYASHI, M.; MARGI, K.; BARKATS, C.; KLEIN, C.; AMSTERDAM, A.; HSUEH, A. J.; TSAFRIRI, A. Growth differentiation factor-9 stimulates rat theca-interstitial cell androgen biosynthesis. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1214-1218, 2000.

SPICER, L. J.; AAD, P. Y.; ALLEN, D.; MAZERBOURG, S.; HSUEH, A. J. Growth differentiation factor-9 has divergent effects on proliferation and steroidogenesis of bovine granulosa cells. **Journal of Endocrinology**, v. 189, p. 329-339, 2006.

SPICER, L. J.; AAD, P. Y.; ALLEN, D.; MAZERBOURG, S.; PAYNE, A. H.; HSUEH, A. J. Growth differentiation factor 9 (GDF9) stimulates proliferation and inhibits steroidogenesis by bovine theca cells: influence of follicle size on responses to GDF9. **Biology of Reproduction**, v. 78, 243-253, 2008.

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

STOCK, A. E.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. **Endocrinology**, v. 132, p. 1108-1114, 1993.

SUGIURA, K.; SU, Y. Q.; DIAZ, F. J.; PANGAS, S. A.; SHARMA, S.; WIGGLESWORTH, K.; O'BRIEN, J.; MATZUK, M. M.; SHIMASAKI, S.; EPPIG, J. J. Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. **Development**, v. 134, p. 2593-2603, 2007.

TSAFRIRI, A.; POMERANTZ, S.H. Regulation of the development of meiotic competence and of the resumption of oocyte maturation in the rat. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v. 38, p. 25-43, 1984.

TURZILLO, A. M.; FORTUNE, J. E. Effects of suppressing plasma FSH on ovarian follicular dominance in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 113-119, 1993.

VANDERHYDEN, B. C.; COHEN, J. N.; MORLEY, P. Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis. **Endocrinology**, v. 133, p. 423-426, 1993.

VANDERHYDEN, B. C.; TONARY, A. M. Differential regulation of progesterone and estradiol production by mouse cumulus and mural granulosa cells by a factor(s) secreted by the oocyte. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 1243-1250, 1995.

VANDERHYDEN, B. C.; MACDONALD, E. A. Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis throughout follicular development. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 1296-1301, 1998.

VANDEVOORT, C. A.; OVERSTREET, J. W.; LASLEY, B. L.; STEWART, D. R. Effects of progesterone receptor blockers on human granulosa-luteal cell culture secretion of progesterone, estradiol, and relaxin. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 200-205, 2000.

VERNON, R.; SPICER, L. J. Effects of basic fibroblast growth factor and heparin on follicle-stimulating hormone-induced steroidogenesis by bovine granulosa cells. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 2696-2702, 1994.

VITT, U. A.; HAYASHI, M.; KLEIN, C.; HSUEH, A. J. W. Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 370-377, 2000a.

VITT, U. A.; MCGEE, E. A.; HAYASHI, M.; HSUEH, A. J. In vivo treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. **Endocrinology**, v. 141, p. 3814-3820, 2000b.

VOSS, A. K.; FORTUNE, J. E. Levels of messenger-ribonucleic-acid for cytochrome-p450 17-alpha-hydroxylase and p450 aromatase in pre-ovulatory bovine follicles decrease after the luteinizing-hormone surge. **Endocrinology**, v. 132, p. 2239-2245, 1993.

WANG, C.; ROY, S. K. Expression of bone morphogenetic protein receptor (BMPR) during perinatal ovary development and primordial follicle formation in the hamster: possible regulation by FSH. **Endocrinology**, v. 150, p. 1886-1896, 2009.

WATHES, D. C.; DENNING-KENDALL, P. A. Control of synthesis and secretion of ovarian oxytocin in ruminants. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 45, p. 39-52, 1992.

YAMAMOTO, N.; CHRISTENSON, L. K.; MCALLISTER, J. M.; STRAUSS, J. F. Growth differentiation factor-9 inhibits 3050-adenosine monophosphate-stimulated steroidogenesis in human granulosa and theca cells. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, p. 2849-2856, 2002.

YAN, C.; WANG, P.; DEMAYO, J.; DEMAYO, F. J.; ELVIN, J. A.; CARINO, C.; PRASAD, S. V.; SKINNER, S. S.; DUNBAR, B. S.; DUBE, J. L.; CELESTE, A. J.; MATZUK, M. M. Synergistic roles of Bone Morphogenetic Protein 15 and Growth Differentiation Factor 9 in ovarian function. **Molecular Endocrinology**, v. 15, n. 6, p. 854-866, 2001.

YEO, C. X.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G.; LANE, M. Exogenous growth differentiation factor 9 in oocyte maturation media enhances subsequent embryo development and fetal viability in mice. **Human Reproduction**, v. 23, p. 67-73, 2007.

YOSHINO, O.; MCMAHON, H. E.; SHARMA, S.; SHIMASAKI, S. A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 28, p. 10678-10683, 2006.