

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**A ANGIOTENSINA II REGULA A  
ESTEROIDOGÊNESE NAS CÉLULAS DA TECA  
BOVINA?**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Melânia Lazzari Rigo**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2014**

# **A ANGIOTENSINA II REGULA A ESTEROIDOGÊNESE NAS CÉLULAS DA TECA BOVINA?**

**Melânia Lazzari Rigo**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Fisiopatologia da Reprodução, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

**Orientador: Prof. Paulo Bayard Dias Gonçalves**

**Santa Maria, RS, Brasil.  
2014**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**A ANGIOTENSINA II REGULA A ESTEROIDOGÊNESE NAS  
CÉLULAS DA TECA BOVINA?**

elaborada por  
**Melânia Lazzari Rigo**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Medicina Veterinária**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Paulo Bayard Dias Gonçalves**  
(Presidente/Orientador)

**Alfredo Quites Antoniazzi (UFSM)**

**Jandui Escarião da Nóbrega Jr (UFSM)**

Santa Maria, 17 de fevereiro de 2014

## AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre comigo.

À minha família pelo apoio constante, em especial a minha irmã Leticia Lazzari Rigo, que mesmo distante sempre está me apoiando e me ouvindo, como se estivesse sempre ao meu lado.

Aos meus orientadores, Paulo Bayard Dias Gonçalves, João Francisco Coelho de Oliveira (*in memoriam*) e Fábio Vasconcellos Comim, pelos ensinamentos didáticos e pelo apoio no direcionamento dos experimentos.

Aos “BioRepianos” da pós-graduação e da graduação pelo auxílio nos experimentos realizados, em especial à colega e amiga Andressa pelos ensinamentos e por tornar os dias de experimento muito mais alegres.

A todos os amigos, em especial à Fabiane Budel, ao Mateus Zinhani e mais uma vez à Andressa Minussi Pereira Dau, por ouvirem meus desabafos, pelos dias de descontração, pelo apoio constante em todas as decisões tomadas, e pela amizade verdadeira e imortal.

A CAPES, FAPERGS e ao CNPq pelo apoio financeiro para realização dos experimentos.

Ao Frigorífico Silva por ceder ovários bovinos para os experimentos *in vitro*.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

### A ANGIOTENSINA II REGULA A ESTEROIDOGÊNESE NAS CÉLULAS DA TECA BOVINA?

AUTOR: MELÂNIA LAZZARI RIGO  
ORIENTADOR: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES  
Data e Local da Defesa: Santa Maria 17 de FEVEREIRO de 2014.

Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos para caracterizar o sistema renina angiotensina (RAS) no aparelho reprodutivo feminino. Evidências da literatura apontam um importante papel da angiotensina II (Ang II), via receptor tipo 2 (AT<sub>2</sub>), tanto na maturação dos oócitos quanto na ovulação em mamíferos. No entanto, a participação da Ang II em outros aspectos reprodutivos importantes, como a esteroidogênese, ainda não foi completamente elucidada. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito *in vitro* da Ang II nas células da teca cultivadas. Para isso, células da teca bovina foram obtidas de folículos com mais de 8mm de diâmetro de ovários oriundos de abatedouro local e submetidas a diferentes tratamentos em uma sequência de experimentos. No experimento 1, Ang II foi adicionada a células da teca tratadas com LH na dose de 10 ng/ml. No experimento 2, foi utilizada Ang II em diferentes concentrações em adição ao tratamento com insulina (100 ng/ml) e LH (100 ng/ml). O experimento 3, explorou o possível efeito de um antagonista da Ang II (saralasin) em células da teca co-estimuladas com insulina e LH (ambos em 100 ng/ml). Após 24 horas, o meio de cultura foi coletado e avaliado para verificação dos níveis de testosterona e androstenediona aferidos pela técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Em paralelo, a expressão gênica de enzimas e proteínas chaves na esteroidogênese, respectivamente, HSD3B2, CYP11A1 e CYP17A1 e STAR, foram avaliadas por qRT-PCR, com exceção do experimento 1 onde somente a CYP17A1 foi estudada. De maneira geral, não foi observada uma ação da Ang II nas doses utilizadas. Apesar de uma diferença na expressão de CYP17A1 ter sido verificada em relação aos controles, nem o aumento dos níveis de androgênios ou um impacto negativo pelo uso de saralasin foram detectados. Embora reconhecida como muito importante para maturação oocitária e ovulação, a Ang II parece não influenciar a produção de androgênios *in vitro*. Em conclusão, nossos resultados não demonstraram um papel da Ang II na esteroidogênese tecal, pelo menos na espécie bovina, ao contrário da hipótese original deste estudo.

**Palavras-chave:** RAS, Angiotensina II, LH, enzimas esteroidogênicas, ovário.

## ABSTRACT

Master Course Dissertation  
Professional Graduation Program in Veterinary Medicine  
Federal University of Santa Maria

### DOES ANGIOTENSIN II REGULATE STEROIDOGENESIS IN THE THECA CELLS IN CATTLE?

AUTHOR: MELÂNIA LAZZARI RIGO  
ADVISOR: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES  
Defense Place and Date: Santa Maria, February 17<sup>th</sup>, 2014

Many studies have been developed to characterize the function of angiotensin-renin system (ARS) in the female reproductive organs. Evidences from the literature have pointed a relevant role of angiotensin II (Ang II) in mammals, through its type 2 receptor (AT2) in oocyte maturation as in ovulation. Nevertheless, the participation of Ang II in other important reproductive features such as steroidogenesis has not been fully clarified. Therefore, the main objective of this work was to detect *in vitro* the steroidogenic effects of Ang II in theca cells. For that, bovine theca cells were obtained from follicles (larger than 8mm of diameter) collected from a local abattoir and submitted to different treatments in a sequence of experiments. In Experiment 1, Ang II was added to LH-treated (10 ng/ml) theca cells. Experiment 2 employed Ang II, in different concentrations, in addition to insulin (100 ng/ml) and LH (100 ng/ml). Experiment 3 explored the effects of an Ang II antagonist (saralasin) in theca cells co-stimulated by insulin and LH (both at 100 ng/ml). After 24 hours, culture media were collected and evaluated for testosterone and androstenedione levels measured by high performance liquid chromatography (HPLC). In parallel, gene expression of key steroidogenic enzymes and proteins, respectively, HSD3B2, CYP11A1 e CYP17A1 and STAR were accessed by qRT-PCR, with exception of experiment 1, in which only CYP17A1 was evaluated. Overall, absence of Ang II action was observed in all Ang II doses evaluated. Despite the difference in gene expression for CYP17A1 against controls in experiment 1, neither an increase in androgens levels nor a negative impact of saralasin were detected. Although very important for oocyte maturation and the ovulation, Ang II seems not influence androgen production by theca cells *in vitro*. In conclusion our results do not support the role for Ang II in thecal steroidogenesis, at least in bovine, as the primary hypothesis of the study.

**Key words:** RAS, Angiotensin II, LH, steroidogenic enzymes, ovary.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO - 1

- FIGURA 1 – Efeito da dose-resposta da Ang II na esteroidogênese de células da teca bovina cultivadas *in vitro*, após 24 horas de tratamento, através da mensuração hormonal (média ± erro padrão) de androstenediona (A) e testosterona (B).....31
- FIGURA 2 – Efeito da Ang II na esteroidogênese de células da teca bovina cultivadas *in vitro*, após 24 horas de tratamento com saralasin (inibidor de Ang II), através da mensuração hormonal (média ± erro padrão) de androstenediona (A) e testosterona (B).....32
- FIGURA 3 – Efeito da dose resposta da Ang II sobre a esteroidogênese de células da teca de bovinos cultivadas *in vitro*, através da expressão do RNAm (média ± erro padrão) para a proteína STAR (A) e para as enzimas esteroidogênicas HSD3B2 (B), CYP11A1 (C) e CYP17A1 (D) relativa ao gene constitutivo GAPDH, 24 horas após o tratamento.....33
- FIGURA 4 – Efeito da Ang II na esteroidogênese de células da teca de bovinos cultivadas *in vitro*, com 24 horas de tratamento, através da expressão do RNAm (média ± erro padrão) para a proteína STAR (A) e para as enzimas esteroidogênicas HSD3B2 (B), CYP11A1 (C) e CYP17A1 (D) relativa ao gene constitutivo GAPDH.....34
- FIGURA 5 – Efeito da Ang II sobre a esteroidogênese nas células da teca de bovinos cultivadas *in vitro* em diferentes tempos, através da expressão do RNAm (média ± erro padrão) para a enzima esteroidogênica CYP17A1 em 30 min (A), 1 hora (B), 3 horas (C), 6 horas (D), 12 horas (E) e 24 horas (F) relativa ao gene constitutivo GAPDH.....35

## ABREVIATURAS E SIGLAS

**AMH** – Hormônio antimileriano

**Ang II** – Angiotensina II

**AT1** – Receptor da angiotensina tipo 1

**AT2** – Receptor da angiotensina tipo 2

**bFGF** – Fator de crescimento fibroblástico básico

**BMP** – Proteína morfogenética óssea

**CYP11A1** – Citocromo P450, família 11, Subfamília A, polipeptídeo 1

**CYP17A1** – Citocromo P450, família 17, subfamília A, polipeptídeo 1

**CYP19A1** – Citocromo P450, família 19, subfamília A, polipeptídeo 1

**DHEA** - deidroepiandrosterona

**FSH** – Hormônio folículo estimulante

**GDF** – Fator de diferenciação de crescimento

**hCG** – Gonadotrofina coriônica humana

**HSD3B2** – 3 $\beta$ -hidroxiesteroide dehidrogenase tipo 2

**HSD17B** – 17 $\beta$ -hidroxiesteroide dehidrogenase

**IGF** – Fator de crescimento semelhante à insulina

**LK** – Kit ligand

**LH** – Hormônio luteinizante

**LHR** – Receptor de LH

**NGF** – Fator de crescimento neuronal

**PCOS** – Síndrome dos ovários policísticos

**P450c17**- 17 $\alpha$ -hidroxilase/17,20 liase

**P450scc** – enzima de clivagem do colesterol

**P450aro** - Aromatase

**RAS** – Sistema renina angiotensina

**SCF** – Fator de célula tronco

**STAR** – Proteína reguladora aguda da esteroidogênese

**TGF $\alpha$**  - Fator de crescimento transformador alfa

**TGF $\beta$**  - Fator de crescimento transformados beta



## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>10</b> |
| <b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>   | <b>12</b> |
| <b>2.1 Angiotensina II.....</b>   | <b>12</b> |
| <b>2.2 Células da teca.....</b>   | <b>14</b> |
| <b>2.3 Esteroidogênese na teca .....</b>  | <b>16</b> |
| <b>3. CAPÍTULO 1- ANGIOTENSINA II NA ESTEROIDOGÊNESE NAS CÉLULAS DA<br/>TECA DE BOVINOS CULTIVADAS <i>IN VITRO</i>.....</b> | <b>18</b> |
| <b>Resumo.....</b>  | <b>19</b> |
| <b>Abstract.....</b>  | <b>20</b> |
| <b>Introdução.....</b>  | <b>20</b> |
| <b>Material e métodos.....</b>  | <b>22</b> |
| <b>Resultados e discussão .....</b>   | <b>26</b> |
| <b>Conclusão.....</b>   | <b>28</b> |
| <b>Agradecimentos .....</b>   | <b>28</b> |
| <b>Referências.....</b>   | <b>28</b> |
| <b>4. CONCLUSÃO.....</b>  | <b>36</b> |
| <b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>  | <b>37</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

A esteroidogênese ovariana inicia nas células da teca com a produção de andrógenos e se completa com a conversão desses em estrógenos, nas células da granulosa através da ação de várias enzimas. Nas células da teca o principal hormônio produzido é a androstenediona (BURGER, 2002) que pode ser convertida em testosterona por isoenzimas da 17 $\beta$ -hidroxisteroide desidrogenase na própria teca, ou em estrona através da aromatase (P450aro) nas células da granulosa (SIMPSON, et al., 1994; PENNING, 1997).

Dentre os vários mecanismos que atuam no sistema reprodutivo, destaca-se o sistema renina angiotensina (RAS), sendo a Ang II um peptídeo efetor atuando via receptor de angiotensina tipo 2 (AT2) nas células da teca e granulosa (SCHAUSER et al., 2001; PORTELA et al., 2008). A Ang II está relacionada com a maturação de oócitos, ovulação e esteroidogênese em coelhas (YOSHIMURA et al., 1992/1993; TANAKA et al., 1995; HAYASHI et al., 2000), e é efetiva sobre a retomada da meiose (GIOMETTI et al., 2005), ovulação (FERREIRA et al., 2007; PORTELA et al., 2011) e divergência folicular (FERREIRA et al., 2011a) em bovinos. Diversos fatores evidenciam a produção aumentada de Ang II pelo ovário em resposta ao pico pré-ovulatório de LH. Coelhas tratadas com gonadotrofina coriônica humana (hCG) apresentam uma maior concentração de Ang II no fluido folicular quando comparado com as concentrações plasmáticas, sugerindo uma produção local desse peptídeo (YOSHIMURA et al., 1994). Além disso, em bovinos, após o pico de LH ocorre um aumento de Ang II intrafolicular (ACOSTA et al., 2000).

Evidências da participação da Ang II na esteroidogênese existem desde 1995, quando Féral, Gall e Leymarie (1995) demonstraram que a Ang II pode atuar na produção de esteroides tanto nas células da teca quanto da granulosa em coelhas. Recentemente, vários estudos têm sido realizados para uma melhor compreensão da esteroidogênese ovariana, utilizando diferentes tratamentos e observando o comportamento das enzimas esteroidogênicas, bem como, a produção hormonal (YOUNG e MCNEILLY, 2012; SCHREIBER e SPICER, 2012; SCHREIBER, TOTTY e SPICER, 2012). No entanto, pouco se sabe sobre uma possível atuação da Ang II na esteroidogênese nas células da teca. Avaliando a ação da Ang II em cultivo das células da granulosa de bovinos, observou-se que a adição desse peptídeo associado ao LH aumentou significativamente a expressão de fatores relacionados a ovulação (PORTELA et al., 2011). Na injeção intra-folicular com inibidor de Ang II *in vivo* em bovinos, observou-se uma diminuição significativa na quantidade de

RNA<sub>m</sub> para as enzimas CYP19A1 e HSD3B2, enquanto que não houve diferença para a enzima HSD17B entre o grupo controle e o grupo tratado, em células da granulosa. A proteína STAR apresentou um aumento significativo na expressão do RNA<sub>m</sub> nos folículos injetados com saralasin, quando comparado ao grupo controle em células da granulosa. Nesse mesmo trabalho, não evidenciou-se, nas células da teca, diferença na expressão do RNA<sub>m</sub> para as enzimas CYP17A1 e HSD3B2 nem para STAR entre os folículos tratados com antagonista da Ang II e o grupo controle. Ainda, mostram um possível efeito agudo da Ang II na produção de esteroides nas células da granulosa, uma vez que estas células cultivadas *in vitro* e tratadas com Ang II por 6 horas mostraram um aumento do RNA<sub>m</sub> para a aromatase (FERREIRA et al., 2011b). Em cultivo de células da teca de coelhas, foi observado um aumento significativo na produção de testosterona estimulada com hCG (gonadotrofina coriônica humana) após a adição de Ang II (FÉRAL, GALL & LEYMARIE, 1995). Baseando-se nesses dados, formulou-se a hipótese de que a Ang II potencializa a ação do LH, estimulando a esteroidogênese. Com isso, o objetivo deste estudo foi verificar o efeito da Ang II isoladamente e em associação ao LH sobre a expressão do RNA<sub>m</sub> das enzimas esteroidogênicas HSD3B2, CYP11A1 e CYP17A1 e da STAR nas células da teca bovina cultivadas *in vitro*, bem como, a produção de androstenediona e testosterona pelas mesmas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Angiotensina II

A angiotensina II (Ang II) tem uma ação bem estabelecida na regulação da pressão sanguínea e manutenção da osmolaridade através do sistema renina-angiotensina (RAS) (SWENSON e REECE, 1996). Sua atividade tem sido relatada em diversos sistemas, incluindo o cérebro (GANONG, 1984), coração (LINDPAINTEER et al., 1987), glândulas salivares (WILSON et al., 1977), vasos sanguíneos (CEDARD et al., 1989) e testículos (PANDEY e INAGAMI, 1986).

A atividade da Ang II tem sido descrita no ovário de algumas espécies, porém com ações distintas. Em coelhas, a Ang II está relacionada com maturação do oócito, ovulação e esteroidogênese (YOSHIMURA et al., 1992/1993; FÉRAL, LE GALL e LEYMARIE, 1995; TANAKA et al., 1995; HAYASHY et al., 2000). Já, em bovinos, a Ang II está relacionada com o crescimento folicular (NIELSEN et al., 1994), com a reversão do efeito inibitório causado pelas células foliculares ou por meios condicionados durante a maturação nuclear de oócitos *in vitro* (GIOMETTI et al., 2005), com a ovulação (FERREIRA et al., 2007; PORTELA et al., 2011) e na divergência folicular (FERREIRA et al., 2011a). Portanto, a Ang II parece ser um peptídeo vasoativo importante no processo de ovulação, formação do corpo lúteo e luteólise (ACOSTA e MIYAMOTO, 2004).

Diversos fatores evidenciam a produção de Ang II pelo ovário. Coelhas tratadas com gonadotrofina coriônica humana (hCG) apresentam uma maior concentração de Ang II no líquido folicular quando comparado com as concentrações plasmáticas, sugerindo uma produção local desse peptídeo (YOSHIMURA et al., 1994). Além disso, Husain et al (1987) detectaram no ovário elevados níveis de Ang II em ratas com nefrectomia bilateral. Em bovinos, após o pico de LH ocorre um aumento na concentração de Ang II intrafolicular (ACOSTA et al., 2000), bem como, nos níveis de prorenina (HAGEMANN et al., 1994). Ainda, a concentração de Ang II intrafolicular aumenta no momento da divergência somente no folículo dominante (FERREIRA et al., 2011a). Esses dados demonstram que além do pico pré-ovulatório de LH parecer um fator crucial para o início da ação da Ang II no ovário, a Ang II possui uma função nos estágios finais da cascata ovulatória e na divergência folicular.

Os receptores da Ang II foram descritos em diferentes tipos celulares de acordo com a espécie. Segundo suas características bioquímicas e farmacológicas foram classificados como

receptores do tipo 1 (AT1) e tipo 2 (AT2) (BIRABEAU, CAPPONI e VALLOTTON, 1984; CHIU et al., 1989; WHITEBREAD et al., 1989; DUDLEY et al., 1990; BRUNSWIG-SPICKENHEIER e MUKHOPADHYAY, 1992). Esses receptores foram encontrados principalmente nas células da granulosa em ovários de ratas (HUSAIN et al., 1987), macacas (AGUILERA, MILLAN e HARWOOD, 1989) e bovinos (BRUNSWIG-SPICKENHEIER e MUKHOPADHYAY, 1992). Por outro lado, Shauser et al (2001) observaram maior quantidade do receptor AT2 em célula da teca de bovinos do que nas células da granulosa. Apesar de detectar expressão gênica de ambos os receptores tanto nas células da teca quanto da granulosa, AT2 está presente em maior abundância nos dois tipos celulares, além de estar presente em maior quantidade em folículos saudáveis (PORTELA et al., 2008). Trabalhando com folículos pré-ovulatórios de coelhas tratadas com gonadotrofina coriônica equina (eCG), Féral, Benhain e Leymarie (1996) observaram receptores para Ang II tanto em células da teca quanto da granulosa. Em ovários de coelhas perfundidos com PD123319, um antagonista seletivo do receptor AT2, ocorreu inibição da esteroidogênese pelo bloqueio da ação da Ang II (YOSHIMURA et al., 1996). No entanto, quando os mesmos foram perfundidos com CV11974, um inibidor seletivo de AT1, não houve alteração na produção de esteroides (KUJI et al., 1996). Em bovinos tratados com injeção intrafolicular de antagonistas dos receptores AT1 e AT2 (losartan e PD123319 respectivamente), a taxa de ovulação reduziu significativamente ao inibir o receptor AT2 ou ambos, enquanto que não diferiu ao inibir somente o AT1, evidenciando que a Ang II em folículos de bovinos atua via receptor AT2 (FERREIRA et al., 2007).

Coletando células da teca e da granulosa para avaliação de RNAm das enzimas esteroidogênicas 24 horas após tratamento intrafolicular com saralasin em bovinos, observou-se uma diminuição significativa na quantidade de RNAm para as enzimas CYP19A1 e HSD3B2, enquanto que não houve diferença para a enzima HSD17B entre o grupo controle e o grupo tratado, em células da granulosa. A proteína STAR apresentou um aumento significativo na expressão do RNAm nos folículos injetados com saralasin, quando comparado ao grupo controle em células da granulosa. Nesse mesmo trabalho, não evidenciou-se, nas células da teca, diferença na expressão do RNAm para as enzimas CYP17A1 e HSD3B2 nem para STAR. Ainda, esse estudo mostra um possível efeito agudo da Ang II na produção de esteroides nas células da granulosa, uma vez que estas células cultivadas *in vitro* e tratadas com Ang II por 6 horas mostraram um aumento do RNAm para a aromatase (FERREIRA et al., 2011b).

## 2.2. Células da teca

As células da teca são observadas em folículos com duas ou mais camadas de células da granulosa. As células progenitoras da teca indiferenciadas não expressam receptores de LH (LHRs) tampouco enzimas esteroideogênicas, por isso, não são responsivas ao LH, mostrando que o início da diferenciação dessas células é independente de gonadotrofinas (MAGOFFIN e WEITSMAN, 1994). Como as células da teca estão associadas somente com folículos em crescimento, supõe-se que o próprio folículo produza fatores sinalizadores para o estroma recrutar células para a formação da teca (YOUNG e MCNEILLY, 2010).

As células que compõem a teca são altamente diferenciadas com características estruturais, incluindo abundância de mitocôndrias com crista vesicular, retículo endoplasmático agranular e vesículas lipídicas (MAGOFFIN, 2005). A mitocôndria contém a primeira enzima da via esteroideogênica e o retículo endoplasmático, enzimas necessárias para a produção de andrógenos, as vesículas lipídicas armazenam precursores para a síntese de hormônios esteroides (colesterol éster), que são transformados dentro da mitocôndria pela proteína reguladora esteroideogênica aguda (STAR) (MANNA, DYSON e STOCCO, 2009).

Levando em consideração o tempo de vida das células da teca, a atresia dos folículos antrais foi classificada de duas maneiras na espécie bovina, atresia antral e atresia basal. Enquanto a atresia basal ocorre somente em folículos antrais pequenos (menores de 5 mm), caracterizada pela interrupção do desenvolvimento tecal, por altos níveis de colágeno, morte das células da teca e endoteliais, reduzida expressão do fator 3 ligado a insulina e diminuição da produção de andrógenos; na atresia antral, que ocorre em estágios mais avançados do desenvolvimento folicular, as células da teca são as últimas a serem interrompidas (IRVING-RODGERS et al., 2001).

Com relação a diferenciação das células da teca, estudos sugerem que as células da granulosa estão envolvidas na diferenciação funcional bem como na aquisição de LH responsivo às células do estroma, e que a origem das células do estroma determinam se a granulosa influencia ou não na diferenciação e funcionalidade das células da teca (ORISAKA et al., 2006). Além disso, IGF-1 estimula a expressão de receptores para LH em ratas (MAGOFFIN e WEITSMAN, 1994) e, em vacas, o IGF-2 pode estimular a esteroideogênese tecal atuando através do receptor tipo 1 do IGF (SPICER, VOGEL e ALLEN, 2004). Os fatores de células tronco (SCF ou KL), por sua vez, são fatores de crescimento que atuam por meio de receptores da tirosina quinase (ZSEBO et al., 1990), sintetizados pelas células da granulosa e atuam na diferenciação das células da teca (MANOVA et al., 1990). Em células

tecais de ratas, nem SCF, nem IGF-1 isolados, estimulam a produção de androstenediona, entretanto, em combinação, esses fatores induzem a síntese de andrógenos, porém, em menor grau do que quando estimulada por LH. O efeito desses fatores adicionados juntos com LH, mostram que o IGF-1 atua sinergicamente com o LH aumentando a produção de andrógenos, enquanto que, o SCF não demonstrou efeitos quando em conjunto com LH (YOUNG e MCNEILLY, 2010). Em vacas, ao contrário de ratas, o SCF isolado, altera as células da teca, uma vez que estas apresentaram diferenciação (PARROTT e SKINNER, 2000).

Outro fator envolvido na diferenciação das células da teca é o bFGF. Esse fator é expresso em oócitos primordiais e primários, nas células da teca e da granulosa de folículos pré-antrais, em roedores, bovinos e humanos (VANWEZEL et al., 1995; YAMAMOTO et al., 1997; BERISHA et al., 2000; NILSSON, PARROTTI e SKINNER, 2001). Em cultivo celular de teca bovina, o bFGF influencia o desenvolvimento da teca indiretamente através do estímulo da expressão do SCF (NILSSON e SKINNER, 2004).

Os membros da superfamília TGF $\beta$ , também estão envolvidos no processo de diferenciação das células da teca. Essa superfamília é composta por um grande grupo de proteínas que inclui BMPs, GDFs, hormônio antimulleriano (AMH), ativinas e inibinas, sendo que todos são expressos no ovário. Existem evidências mostrando que esses membros específicos estão envolvidos no recrutamento, na proliferação e na diferenciação das células da teca, e podem ou não, interagir com as gonadotrofinas (YOUNG e MCNEILLY, 2010). Hillier et al, (1991), sugeriram que as células da granulosa secretam inibina para controlar a síntese de andrógenos pela teca que servem como substrato para a produção de estrógenos pela granulosa. Por outro lado, os BMPs, além de atuarem diretamente na teca inibindo a produção de andrógenos, possuem uma função reguladora de fatores sintetizados pela granulosa que atuam de maneira parácrina na esteroidogênese tecal (YOUNG e MCNELLEY, 2010).

Os níveis de proliferação das células da teca parecem ser maiores em folículos pequenos quando comparado com folículos grandes. Isso provavelmente deve-se ao maior número de receptores de GDF-9 na teca de folículos pequenos. Por isso, em folículos menores, o GDF-9 pode melhorar a proliferação das células da teca, mesmo não atuando na sua diferenciação (YOUNG e MCNELLEY, 2010). Esse mesmo fator aumenta a síntese de andrógenos na teca de ratas (SOLOVYEVA et al., 2000), tendo efeito contrário em humanos, indicando uma atuação espécie específica (YAMAMOTO et al., 2002).

Outro membro dessa superfamília é o próprio TGF $\beta$ , sendo que tanto TGF $\beta$ 1 quanto TGF $\beta$ 2 estão presentes nas células da teca de folículos pré-antrais (JUENGEL et al., 2004). O TGF $\beta$ 1 suprime a síntese de andrógenos nas células da teca de humanos e ratos (FOURNET et al., 1996; ATTIA et al., 2000). Por fim, as células da teca parecem também ser moduladas pela sinalização das hedgehog (WIJGERDE et al., 2005). Os genes alvos das proteínas hedgehog são expressos em compartimentos de células pré-tecais e são, portanto, possíveis marcadores dessas células, além de estarem envolvidas na indução da diferenciação das células da teca (SPICER et al., 2009).

Portanto, pode-se dizer que as células da teca são vitais para a foliculogênese. São células especializadas recrutadas para circundar um folículo ativado e promover suporte estrutural. Com sua proliferação e diferenciação, adquirem uma rede de capilares que é essencial para o desenvolvimento folicular. Sua função primária é a síntese de andrógenos que atuam como substrato para a produção de estrógenos nas células da granulosa, o qual é crucial para o eixo pituitário-gonadal e controle endócrino da reprodução (YOUNG e MCNEILLY, 2010).

### **2.3. Esteroidogênese na teca**

Em resposta a um pico de LH, a proteína reguladora da esteroidogênese (STAR) transporta o colesterol para dentro da mitocôndria das células da teca, onde estão as enzimas envolvidas na esteroidogênese iniciando assim, a produção de esteroides com a conversão do colesterol para pregnenolona pela enzima P450scc (MILLER, 1988). Existem dois mecanismos regulatórios para esta síntese - o agudo e o crônico - que determinam a quantidade de esteroides que uma célula esteroidogênica pode produzir. A regulação crônica determina a capacidade esteroidogênica das células e é medida pela transcrição dos genes das enzimas esteroidogênicas. A P450scc é uma enzima limitante para a produção de esteroides, por isso, a regulação dos seus genes determina a capacidade quantitativa das células esteroidogênicas. Por outro lado, a regulação aguda determina como uma célula esteroidogênica responde a um estímulo. Esta ação é mediada pela proteína reguladora da esteroidogênese (MILLER, 2007).

Enquanto a enzima P450scc é o regulador quantitativo da esteroidogênese, o regulador qualitativo é a enzima P450c17. O gene da enzima P450c17 é expresso nas glândulas adrenais e gônadas (CHUNG et al., 1987), que catalisa 17 $\alpha$ -hidroxilase e 17,20-liase (AUCHUS e MILLER, 1999). Na ausência da P450c17, a célula esteroidogênica produz C<sub>21</sub> 17-



deoxisteroides (progesterona pelas células da granulosa no ovário, ou aldosterona pelas células glomerulosas da adrenal). Se somente a atividade da  $17\alpha$ -hidroxilase da P450c17 está presente,  $C_{21}$  17-hidroxisteroides (cortisol) é produzido. Porém, se tanto  $17\alpha$ -hidroxilase quanto 17,20-liase estiverem ativas, precursores de esteroides sexuais são produzidos (DHEA – deidroepiandrosterona) (BREMER e MILLER, 2008). Dessa forma, a DHEA é subsequentemente convertida em androstenediona pela enzima  $3\beta$ -hidroxisteroide desidrogenase tipo 2 ( $3\beta$ -HSD2) (LABRIE et al., 1992). Por fim, isoenzimas da  $17\beta$ -hidroxisteroide desidrogenase podem converter androstenediona em testosterona e, da aromatase (P450aro), androstenediona em estrona (SIMPSON et al., 1994; PENNING, 1997). Assim, nos tecidos alvo dos esteroides sexuais, a testosterona pode ser convertida pela  $5\alpha$ -redutase em diidrotestosterona (MAHENDROO e RUSSELL, 1999) e, a estrona, em estradiol, pela  $17\beta$ -hidroxisteroide desidrogenase tipo 1 (TREMBLAY et al., 1989).

Nos ovários, os andrógenos sintetizados pelas células da teca são transportados para as células da granulosa onde a aromatase P450 converte esses andrógenos em estrona e  $17\beta$ -estradiol. As enzimas esteroidogênicas são produzidas em células específicas (WOOD e STRAUSS, 2002) de acordo com a quantidade de receptores para andrógenos expressos nas células da teca e da granulosa (MCNEILLY et al., 2000). O controle da síntese desses andrógenos no estágio folicular dependente de gonadotrofinas é feito pelo LH (BAIRD, SWANSTON e MCNEILLY, 1981). O LH é liberado de forma pulsátil, sendo que a frequência e a amplitude dos pulsos varia de acordo com o momento do ciclo reprodutivo em resposta a um feedback esteroidogênico ovariano. A frequência dos pulsos de LH determina a quantidade de esteroides produzidos, em que, cada pulso de LH é seguido por um aumento na secreção de androstenediona e estradiol (BAIRD, SWANSTON e SCARAMUZZI 1976), demonstrando assim uma forte ligação entre hipotálamo e gônadas.

### **3. CAPÍTULO 1**

**TRABALHO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:**

**ANGIOTENSINA II NA ESTEROIDOGÊNESE EM CÉLULAS DA TECA  
BOVINA CULTIVADAS *IN VITRO*.**

**Melânia Lazzari Rigo, Andressa Minussi Pereira Dau, Werner Giehl  
Glanzner, Manoel Martins, Renato Zanella, Tiele Rizzetti, Fábio  
Vasconcellos Comim, Paulo Bayard Dias Gonçalves**

**CIÊNCIA RURAL, 2014**

**Angiotensina II na esteroidogênese nas células da teca bovina cultivadas *in vitro*****Angiotensin II in the bovine theca cells steroidogenesis cultured *in vitro***

**Melânia Lazzari Rigo<sup>I</sup>, Andressa Minussi Pereira Dau<sup>I</sup>, Werner Giehl Glanzner<sup>I</sup>,  
Manoel Martins<sup>II</sup>, Renato Zanella<sup>II</sup>, Tiele Rizzetti<sup>II</sup>, Fábio Vasconcellos Comim<sup>III</sup>, Paulo  
Bayard Dias Gonçalves<sup>I\*</sup>**

**RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito *in vitro* da Ang II sobre a esteroidogênese nas células da teca cultivadas. Para isso, células da teca bovina foram obtidas de folículos com mais de 8mm de diâmetro de ovários oriundos de abatedouro e submetidas a diferentes tratamentos em uma sequência de experimentos. No experimento 1, Ang II foi adicionada a células da teca tratadas com LH na dose de 10 ng/ml. No experimento 2, foi utilizada Ang II em diferentes concentrações em adição ao tratamento com insulina (100 ng/ml) e LH (100 ng/ml). O experimento 3, explorou os possíveis efeitos da Ang II tratando as células com saralasin (antagonista da Ang II). Após 24 horas, o meio de cultura foi coletado e avaliou-se os níveis de testosterona e androstenediona pela técnica de HPLC. Em paralelo, a expressão gênica de enzimas e proteínas chaves na esteroidogênese, respectivamente, HSD3B2, CYP11A1 e CYP17A1 e STAR, foram avaliadas por qRT-PCR, com exceção do experimento 1 onde somente a CYP17A1 foi estudada. Não se observou diferença na produção de testosterona e androstenediona entre controle e grupos tratados, bem como, na expressão do

---

<sup>I</sup> Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal – Universidade Federal de Santa Maria – UFSM;

<sup>II</sup> Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas - Universidade Federal de Santa Maria – UFSM;

<sup>III</sup> Departamento de Clínica Médica – Curso de Medicina - Universidade Federal de Santa Maria – UFSM;

\*Autor de Correspondência – Departamento de Clínica de Grande Animais, Hospital Veterinário, Universidade Federal de Santa Maria, código postal 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: bayard@ufsm.br

RNA<sub>m</sub> para os genes estudados. Em conclusão, nossos resultados não demonstraram um papel da Ang II neste estudo.

**Palavra-chave:** RAS, Angiotensina II, LH, esteroidogênese, ovário.

## **ABSTRACT**

The main objective of this work was to detect the steroidogenic effects of Ang II in theca cells *in vitro*. In order to do this, bovine theca cells were obtained from follicles (larger than 8mm of diameter) collected from a local abattoir and submitted to different treatments in a sequence of experiments. In Experiment 1, Ang II was added to LH-treated (10 ng/ml) theca cells. Experiment 2 employed Ang II, in different concentrations, in addition to insulin (100 ng/ml) and LH (100 ng/ml). Experiment 3 explored the effects of Ang II antagonist (saralasin) in theca cells. After 24 hours, culture media were collected and evaluated for testosterone and androstenedione levels measured by HPLC technique. In parallel, gene expression of key steroidogenic enzymes and proteins, respectively, HSD3B2, CYP11A1 and CYP17A1 and STAR were accessed by RT-PCR, with exception of experiment 1 where only CYP17A1 was evaluated. It was not observed any difference in testosterone and androstenedione production between treated and controls groups, as well as in mRNA expression in evaluated genes. In conclusion our results do not support the role for Ang II in thecal steroidogenesis in this study.

**Key words:** RAS, Angiotensin II, LH, steroidogenesis, ovary.

## **INTRODUÇÃO**

Nas células da teca o principal hormônio produzido é a androstenediona (BURGER, 2002) que pode ser convertida em testosterona por isoenzimas da 17 $\beta$ -hidroxisteroide desidrogenase na própria teca, ou em estrona através da aromatase (P450aro) nas células da granulosa (SIMPSON et al, 1994; PENNING, 1997). O controle da síntese desses andrógenos

é feito pelo LH (BAIRD, SWANSTON e MCNEILLY, 1981) e acontece principalmente nas células da teca.

Além disso, nos últimos anos, diversos estudos tem reportado um novo e importante papel do sistema renina angiotensina (RAS) na reprodução de mamíferos. Em especial, a angiotensina II através do seu receptor tipo 2 (AT2) (SCHAUSER et al., 2001; FERREIRA et al., 2007; PORTELA et al., 2008) mostrou-se capaz de influenciar a maturação de oócitos (GIOMETTI et al., 2005), ovulação (FERREIRA et al., 2007; PORTELA et al., 2011) e dinâmica folicular em bovinos (FERREIRA et al., 2011a). Evidências da participação da Ang II na esteroidogênese existem desde 1995, quando mostraram que a Ang II pode atuar na produção de esteroides tanto nas células da teca quando da granulosa em coelhas (FÉRAL, GALL e LEYMARIE, 1995), porém, este trabalho não avaliou a expressão gênica das enzimas envolvidas na produção de esteroides.

Avaliando a ação da Ang II em cultivo de células da granulosa de bovinos, observou-se que a adição desse peptídeo associado ao LH aumentou significativamente a expressão de fatores relacionados à ovulação, porém não alterou significativamente a produção de progesterona e a expressão gênica da STAR (PORTELA, et al., 2011). Em folículos dominantes tratados com injeção intrafolicular *in vivo* com inibidor de Ang II em bovinos, observou-se uma diminuição significativa na quantidade do RNAm para as enzimas CYP19A1 e HSD3B2, enquanto que não houve diferença para a enzima HSD17B entre o grupo controle e o grupo tratado, em células da granulosa. Neste mesmo trabalho, não foi observado em células da teca diferença na expressão do RNAm para as enzimas CYP17A1 e HSD3B2 nem para STAR entre os folículos tratados com antagonista da Ang II e o grupo controle. Ainda, esse estudo mostra um possível efeito agudo da Ang II na produção de esteroides nas células da granulosa, uma vez que estas células cultivadas *in vitro* e tratadas

com Ang II por 6 horas mostraram um aumento do RNAm para a aromatase (FERREIRA et al., 2011b).

Visando melhor esclarecer se a Ang II possui ou não um papel na esteroidogênese tecal bovina, o objetivo deste trabalho foi avaliar o papel da Ang II isolada e em associação ao LH na esteroidogênese de células da teca bovina. Para isso, foi utilizado um modelo validado de cultura de células da teca *in vitro* (SCHREIBER, TOTTY e SPICER, 2012), mensurando os esteroides produzidos e a expressão de enzimas-chaves na produção de androgênios.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Isolamento, cultivo e tratamento das células da teca**

Para obtenção das células da teca foram utilizados folículos ovarianos de vacas adultas não prenhes oriundos de abatedouro. Os ovários foram transportados até o laboratório em caixas térmicas com solução salina (NaCl 0,9%) contendo penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (50 µg/mL) a temperatura de 30°C, com tempo máximo entre coleta e início do procedimento de 3 horas. As células da teca foram isoladas de ovários que possuíam folículos maiores de 8 mm de diâmetro aparentemente saudáveis, com boa vascularização, líquido folicular moderadamente transparente e corpo lúteo residual (menos de 1 cm de diâmetro) ou ausente (ACOSTA et al., 1999), minimizando a utilização de folículos atrésicos. A parede interna da teca foi lavada com PBS para remoção das células da granulosa. As células da teca obtidas foram digeridas em colagenase (1 mg/mL) e semeadas em placas de cultivo de 60 mm. As células foram cultivadas em meio base constituído de DMEM/F12 contendo 10% de SFB (soro fetal bovino), 1 µg/mL de transferrina, 1 ng/mL de selênio, 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 0,5 µg/mL de gentamicina e 2,5 µg/mL de anfotericina (obtidos pela Sigma-Aldrich, EUA), por 48 horas, em temperatura de 38,5°C e 5% de CO<sub>2</sub> conforme já descrito (SCHREIBER, TOTTY e SPICER, 2012). Após esse período, as células do experimento 1 foram tripsinizadas e transferidas para placas de 4 poços

em uma concentração de  $2 \times 10^5$  células/poço e, as células dos experimentos 2 e 3 para placas de 96 poços em uma concentração de  $3 \times 10^4$  células/poço e mantidas nas mesmas condições por mais 24 horas. Após, foram lavadas e receberam os tratamentos em um volume final de 400µl (experimento 1) e de 150µl (experimentos 2 e 3) do mesmo meio descrito acima, porém, livre de SFB. No experimento 1, manteve-se as células da teca bovina em diferentes tempos de tratamento, sem a presença de insulina, somente com LH, os tratamentos foram os seguintes: 1- Controle negativo (meio); 2- LH (10 ng/mL); 3- LH (10 ng/mL) + Ang II (0,1 µM); e 4- Ang II (0,1 µM) e, os tempos de tratamento foram 30 min, 1, 3, 6, 12 e 24 horas. No experimento 2, as células receberam os tratamentos: 1- Controle negativo (meio); 2- LH (100 ng/mL) + Insulina (100 ng/mL); 3- LH (100 ng/mL) + Insulina (100 ng/mL) + Ang II (10 µM); 4- LH (100 ng/mL) + Insulina (100 ng/mL) + Ang II (0,1 µM); e 5- LH (100 ng/mL) + Insulina (100 ng/mL) + Ang II (0,001 µM), para verificar um possível efeito de dose resposta da AngII sobre as enzimas esteroidogênicas. Para evidenciar o papel da Ang II sobre a esteroidogênese nas células da teca, no experimento 3, as células foram tratadas com antagonista da Ang II (saralasin) da seguinte forma: 1- Controle negativo (meio); 2- Insulina (100 ng/mL); 3- LH (100 ng/mL) + Insulina (100 ng/mL); 4- LH (100 ng/mL) + Insulina (100 ng/mL) + Ang II (0,1 µM); 5- LH (100 ng/mL) + Insulina (100 ng/mL) + Ang II (0,1 µM) + Saralasin (0,1 µM); 6- Ang II (0,1 µM); 7- Ang II (0,1 µM) + Saralasin (0,1 µM); e 8- LH (100 ng/mL) + Insulina (100 ng/mL) + Saralasin (0,1 µM). Os experimentos foram realizados em triplicata. Após 24 horas de tratamento (experimentos 2 e 3) coletou-se o meio para mensuração hormonal e as células foram coletadas em Trizol<sup>®</sup> para extração do RNA total. Para avaliação de uma possível contaminação do cultivo celular por células da granulosa, foi considerada a ausência da expressão do RNAm para a enzima CYP19A1.

#### **Extração, quantificação, integridade de RNA e transcrição reversa**

O RNA total foi obtido utilizando o método de Trizol<sup>®</sup> de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação do RNA extraído foi realizada por densidade ótica, utilizando espectrofotômetro NanoDrop (Thermo ND1000) em um comprimento de onda de 260nm. A integridade do RNA foi verificada eletroforeticamente em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio e a pureza, através da taxa de absorção da relação OD260/OD280, sendo que amostras com valores inferiores a 1,8 foram descartadas. O RNA total foi tratado com DNase, para digestão de DNA eventualmente presente na amostra, a 37<sup>0</sup>C por 5 min. A reação de transcriptase reversa foi realizada com 1mM oligo (dT) primer, Omniscript RT ed, dNTP's e inibidores de RNase.

### **qRT-PCR**

A expressão relativa dos genes foi realizada por PCR em tempo real (Step One Plus, Applied Biosystems) com Power SYBR Green PCR Master Mix. Após amplificação, foi realizada a análise das curvas de dissociação para verificar a identidade do produto do PCR. A variabilidade da quantidade de RNAm foi corrigida pela amplificação do gene constitutivo GAPDH. Os primers utilizados no estudo para a enzima CYP17A1 (*sense*: CCATCAGAGAAGTGCTCCGAAT e *anti-sense*: GCCAATGCTGGAGTCAATGA), para a enzima CYP11A1 (*sense*: CTTGCACCTTTCTGGCTAGG e *anti-sense*: AAGGGGAAGAGGTAGGGTGA), para a enzima foram desenhados com base nas sequências do GenBank, utilizando o programa Primer Express Software v3.0 e sintetizados pela Invitrogen. Os genes HSD3B2 (*sense*: GCCCAACTCCTACAGGGAGAT e *anti-sense*: TTCAGAGCCCACCCATTAGCT) e *STAR* (*sense*: CCCAGCAGAAGGGGTGTCATC e *anti-sense*: TGCGAGAGGACCTGGTTGAT) foram utilizados segundo (ORISAKA et al., 2006).

### **Dosagem hormonal por HPLC**

Para identificação e quantificação de androstenediona e testosterona nas amostras foi empregada a Cromatografia Líquida de Ultra Alta Performance acoplada a Espectrometria de



Massas sequencial (UHPLC-MS/MS, do inglês Ultra High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry). Para o preparo dos extratos foi utilizada a diluição direta de uma alíquota de 200 $\mu$ L em acetonitrila até um volume de 500 $\mu$ L e a mistura foi homogeneizada em vortex e em seguida, foi injetada no sistema UHPLC-MS/MS. Após a injeção, foi adicionada nesta mesma mistura uma solução analítica de androstenediona, testosterona e trifenilfosfato (padrão interno) de forma a obter uma concentração final de 100 ng L<sup>-1</sup>, a mistura foi agitada e injetada no sistema UHPLC-MS/MS. Os resultados foram calculados pelos métodos da Adição de Padrão e o Padrão Interno trifenilfosfato foi utilizado para verificação de variação durante a corrida cromatográfica. A linearidade e os limites de detecção de cada analito foram verificados a partir de soluções analíticas preparadas em solvente em concentrações entre 50 e 5000 ng L<sup>-1</sup> injetadas no UHPLC-MS/MS e a partir dos sinais analíticos obtidos foram traçadas as curvas de calibração. O espectrômetro de massa foi operado no modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM - Selected Reaction Monitoring), com duas transições para cada analito, sendo uma para quantificação e outra para confirmação. A transição de maior intensidade corresponde à quantificação do analito e, a de segunda maior intensidade, representa a confirmação do mesmo. O modo de ionização utilizado foi a ionização por eletronebulização no modo positivo (ESI+ - Electrospray Ionization, positive mode) para androstenediona e testosterona, com temperatura do forno da coluna de 40 °C, pressão de 15000 psi, capilar de 2,8 kV, temperatura de dessolvatação de 500 °C, vazão de gás de 800 L h<sup>-1</sup>, vazão do gás de colisão (argônio) de 0,15 mL min<sup>-1</sup> e temperatura da fonte de 150 °C. A fase móvel utilizada foi composta por solução aquosa (solvente A), 0,05% de hidróxido de amônio e metanol (solvente B). Empregou-se um gradiente de ebulição com vazão de 0,150 mL min<sup>-1</sup>, com volume de injeção de 10  $\mu$ L e tempo de corrida total de 5 min.

### **Análise estatística**

Os dados da expressão gênica e da síntese hormonal foram analisados comparando os tratamentos. As possíveis diferenças foram testadas por ANOVA e a diferença entre os tratamentos por LSMEANS *student t-test*. Todas as variáveis foram testadas para normalidade e normalizadas quando necessário. As análises foram realizadas utilizando o Software JPM pacote estatístico SAS (Cary, EUA). Os resultados estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A angiotensina II, em três diferentes concentrações empregadas (10  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M e 0,01  $\mu$ M) na presença de LH (100 ng/mL) e insulina (100 ng/mL) não estimulou a produção de androstenediona e testosterona em valores absolutos (Figura 1), bem como na presença de saralasin (Figura 2). Esses resultados são concordantes em relação aos achados de Portela et al (2011) que utilizou Ang II em sinergia com LH em cultivo de células da granulosa bovina e não observou aumento na produção de progesterona, porém, um possível efeito agudo da Ang II na produção de esteroides nas células da granulosa de bovinos foi evidenciado, uma vez que estas células cultivadas *in vitro* e tratadas com Ang II por 6 horas mostraram um aumento do RNAm para a aromatase, sugerindo uma possível ação na produção de estrógenos (FERREIRA et al., 2011b). As divergências observadas neste estudo em relação aos obtidos com coelhas empregando também o cultivo de células da teca (FÉRAL, GALL e LEYMARIE, 1995) poderiam ser explicadas por diferenças entre espécies, já que, sabidamente, o sistema RAS não é uniforme em mamíferos (GONÇALVES et al., 2012).

A análise das células da teca mostrou uma diferença na expressão gênica da enzima CYP17A1 em 24 horas de tratamento (Figura 3D), enquanto STAR, HSD3B2 e CYP11A1 tenderam para o aumento nos grupos tratados com LH, insulina e Ang II em relação aos controles (Figura 3 A-C), mas não evidenciaram diferença estatística. Esse achado paradoxal poderia ser explicado pela ação diferenciada da CYP17A1 na produção de androgênios;

todavia, a ausência de diferenças nos níveis de testosterona e androstenediona mensurados no meio de cultura indicam maior possibilidade de ocorrer uma modificação no momento da regulação do gene. Embora o trabalho com injeção intrafolicular com inibidor de Ang II *in vivo* em bovinos não tenha identificado uma diferença na expressão gênica da CYP17A1 nas células da teca, nas células da granulosa houve uma diminuição significativa na abundância do RNAm para as enzimas CYP19A1 e HSD3B2 indicando um papel supressor nesses ruminantes, após 24 horas de tratamento com saralasin (FERREIRA et al., 2011b).

No experimento 1, no qual as células foram tratadas com Ang II isolada e em sinergia com LH (10 ng/mL) (COMIM, HARDY, e FRANKS, 2013) não se verificou diferença estatística significativa na expressão do RNAm da enzima esteroidogênica CYP17A1 aos 30 min, 1 hora, 3 horas, 6 horas, 12 horas e 24 horas (Figura 5 A-F). No terceiro experimento, em que utilizou-se o antagonista da Ang II (saralasin) nos tratamentos, também não foi observado diferença estatística significativa na expressão do RNAm para STAR (Figura 4A) e para as enzimas esteroidogênicas HSD3B2 (Figura 4B), CYP11A1 (Figura 4C) e CYP17A1 (Figura 4D), concordando novamente com os resultados mostrados por Ferreira et al (2011b), nas células da teca de bovinos tratados com saralasin *in vivo* via intrafolicular.

Algumas situações podem ter colaborado negativamente para a obtenção de resultados mais homogêneos. Em especial, destacamos a cultura de células primárias coletadas de ovários oriundos de vacas em diferentes estações do ano. Por outro lado, destacamos a escolha do HPLC como método de aferição dos níveis de esteroides, tanto para androstenediona (hormônio de pouca potência androgênica, mas bastante secretado) quanto para testosterona (maior potência androgênica e menos secretado). No sentido de garantir a pureza da cultura de células da teca, as mesmas foram analisadas para a expressão de CYP19A1 como um marcador de células da granulosa.

De uma maneira geral, não foi observada uma ação da Ang II nas diferentes doses utilizadas. Apesar de uma diferença na expressão do RNAm da CYP17A1 ter sido verificado em relação aos controles, nem o aumento dos níveis de androgênios ou um impacto negativo pelo uso de saralasin foram detectados. Embora reconhecida como muito importantes para maturação oocitária, ovulação e dinâmica folicular a Ang II parece não influenciar a produção de androgênios *in vitro*.

## CONCLUSÃO

A Ang II isolada e em sinergia com LH parece não estimular a expressão do RNAm das enzimas esteroidogênicas nas células da teca bovina, assim como não demonstrou efeito na produção de androstenediona e testosterona no modelo de estudo utilizado.

## AGRADECIMENTOS

Ao Frigorífico Silva pela cedência dos ovários. A CAPES, CNPq e FAPERGS pelo suporte financeiro.

## REFERÊNCIAS

- ACOSTA, T. J., et al. Evidence for a local endothelin-angiotensin-atrial natriuretic peptide system in bovine mature follicles *in vitro*: effects on steroid hormones and prostaglandin secretion. **Biology of Reproduction**, v.61, p.1419-1425, 1999.
- BAIRD, D. T.; SWANSTON, I. A. e MCNEILLY, A. S. Relationship between LH, FSH, and prolactin concentration and the secretion of androgens and estrogens by the preovulatory follicle in the ewe. **Biology of Reproduction**, v.24, p.1013-25. 1981.
- BURGER, H. G. Androgen production in women. **Fertility and Sterility**, v.77, n.4, p.3-5. 2002.

COMIM, F. V.; HARDY, K. e FRANKS, S. Adiponectin and its receptors in the ovary: further evidence for a link between obesity and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. **PLOS ONE**, v.8, p.1-9. 2013.

FÉRAL, C.; LE GALL, S. e LEYMARIE, P. Angiotensin II modulates steroidogenesis in granulosa and theca in the rabbit ovary: its possible involvement in atresia. **European Journal of Endocrinology**, v.133, p.747-53. 1995.

FERREIRA, R., et al. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. **Reproduction**, v.134, p.713-19. 2007.

FERREIRA, R., et al. Angiotensin II prolifere and mRNA encoding RAS proteins during bovine follicular wave. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v.XX, p.1-8. 2011a.

FERREIRA, R., et al. Angiotensin II signaling promotes follicle growth and dominance in cattle. **Endocrinology**, v.152, n.12, p.4957-65. 2011b.

GONÇALVES, P. B., et al. Role of angiotensin in ovarian follicular development and ovulation in mammals: a review of recent advances . **Reproduction**, v.143, p.11-20. 2012.

GIOMETTI, I. C., et al. Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation. **Theriogenology**, v.63 p.1014-25. 2005.

ORISAKA, M., et al. Granulosa cells promote differentiation of cortical stromal cells into theca cells in the bovine ovary. **Biology of Reproduction**, v.75 p.734-40. 2006b.

PENNING, T. M. Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. **Endocrine Reviews**, v.18, n.3, p.281-05. 1997.

PORTELA, V, M., et al. Regulation of angiotensin type 2 receptor in bovine granulosa cells. **Endocrinology**, v.149, p.5004-11. 2008.

- PORTELA, V. M., et al. Role of angiotensin II in the periovulatory epidermal growth factor-like cascade in bovine granulosa cells *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.85, p.1167-74. 2011.
- SCHAUSER, K. H., et al. Localization of the renin-angiotensin system in the bovine ovary: cyclic variation of the angiotensin II receptor expression. **Biology of Reproduction**, v.65, p.1672-80. 2001.
- SCHREIBER, N. B.; TOTTY, M. L. & SPECER, L. J. Expression and effect of fibroblast growth factor 9 in bovine theca cells. **Journal of Endocrinology**, v.215, p.167-75. 2012.
- SIMPSON, E. R., et al. Aromatase gene expression in adipose tissue: relationship to breast cancer. **Int J Fertil Menopausal Stud**, v.39, n.2, p.75-83. 1994.

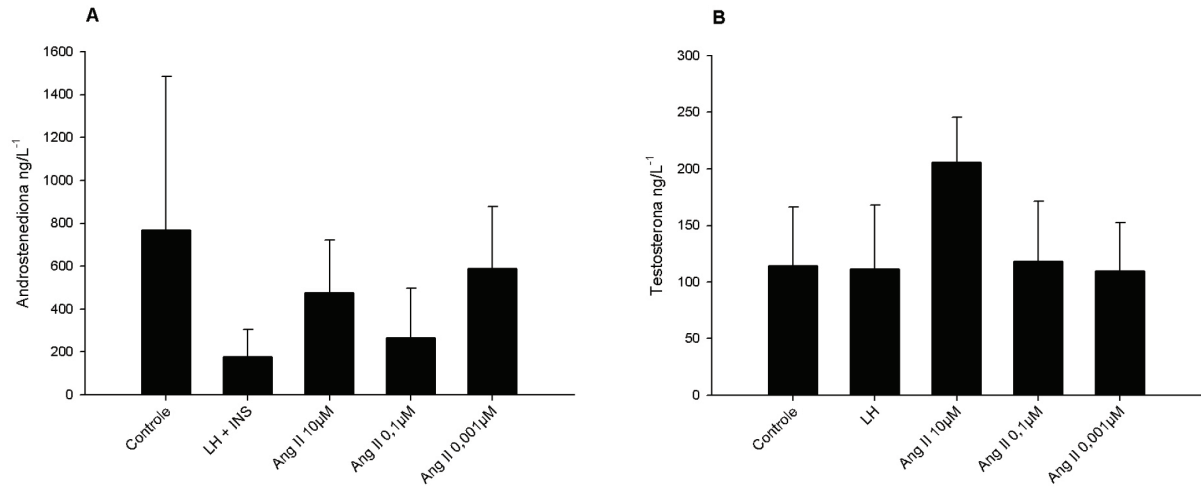


Figura 1 - Efeito da dose resposta da Ang II na esteroidogênese de células da teca bovina cultivadas *in vitro*, após 24 horas de tratamento, através da mensuração hormonal (média  $\pm$  erro padrão) de androstenediona (A) e testosterona (B).

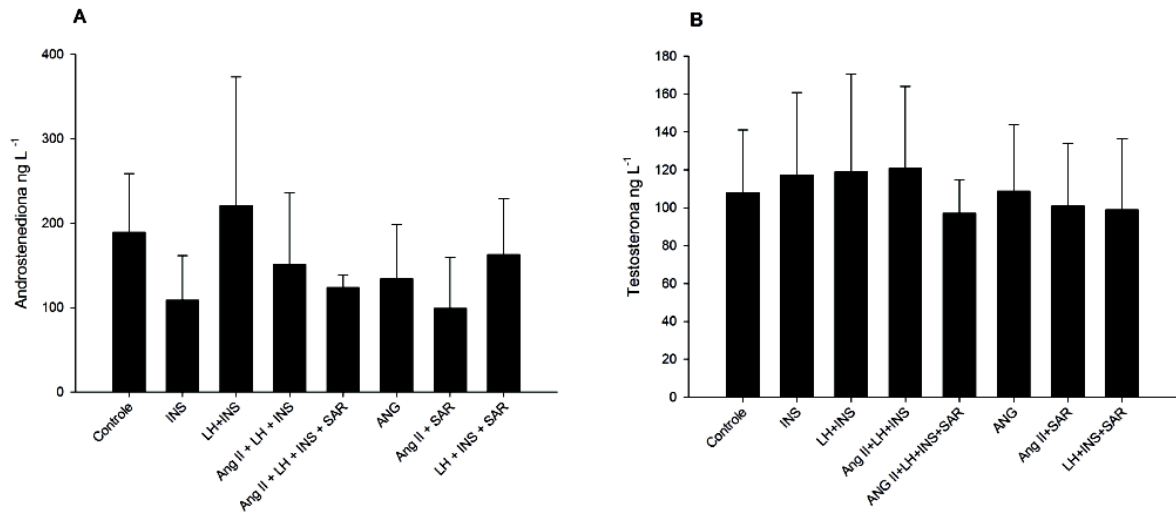


Figura 2 - Efeito da Ang II na esteroidogênese de células da teca bovina cultivadas *in vitro*, após 24 horas de tratamento com saralasin (inibidor de Ang II), através da mensuração hormonal (média  $\pm$  erro padrão) de androstenediona (A) e testosterona (B).



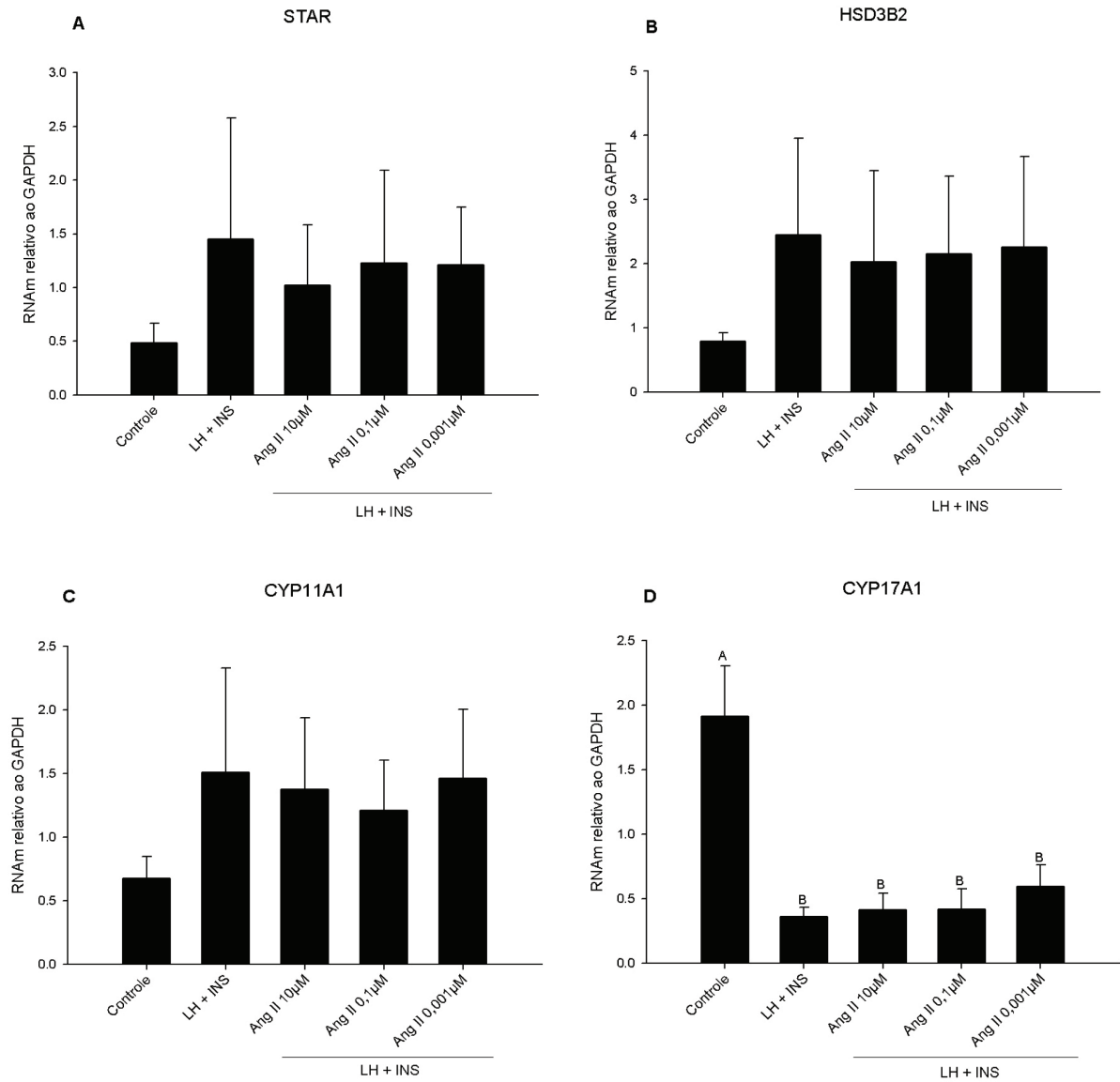


Figura 3 - Efeito da dose-resposta da Ang II sobre a esteroidogênese de células da teca de bovinos cultivadas *in vitro*, através da expressão do RNAm (média  $\pm$  erro padrão) para a proteína STAR (A) e para as enzimas esteroidogênicas HSD3B2 (B), CYP11A1 (C) e CYP17A1 (D) relativa ao gene constitutivo GAPDH, 24 horas após o tratamento.

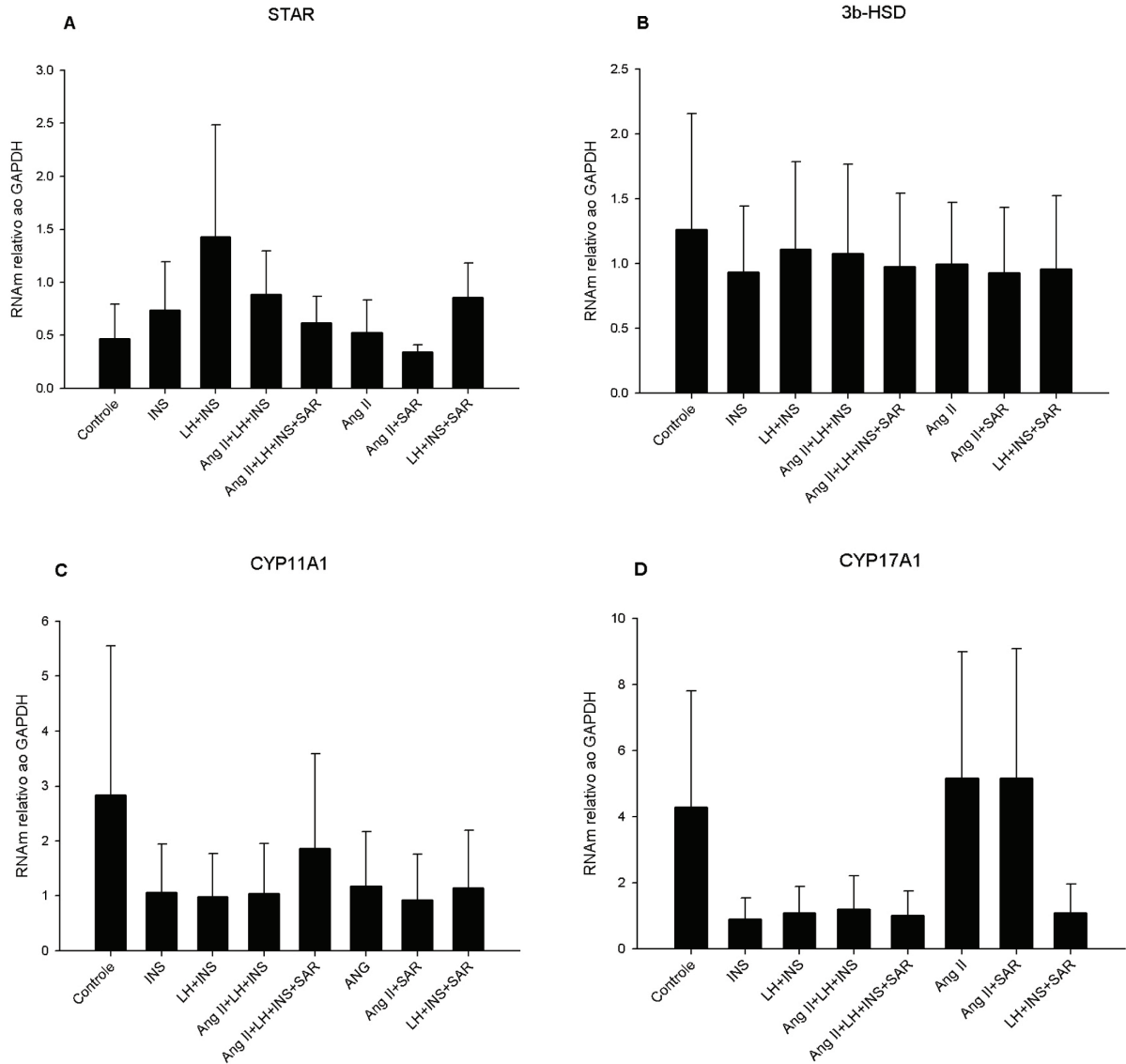


Figura 4 - Efeito da Ang II na esteroidogênese de células da teca de bovinos cultivadas *in vitro*, com 24 horas de tratamento, através da expressão do RNAm (média  $\pm$  erro padrão) para a proteína STAR (A) e para as enzimas esteroidogênicas HSD3B2 (B), CYP11A1 (C) e CYP17A1 (D) relativa ao gene constitutivo GAPDH.

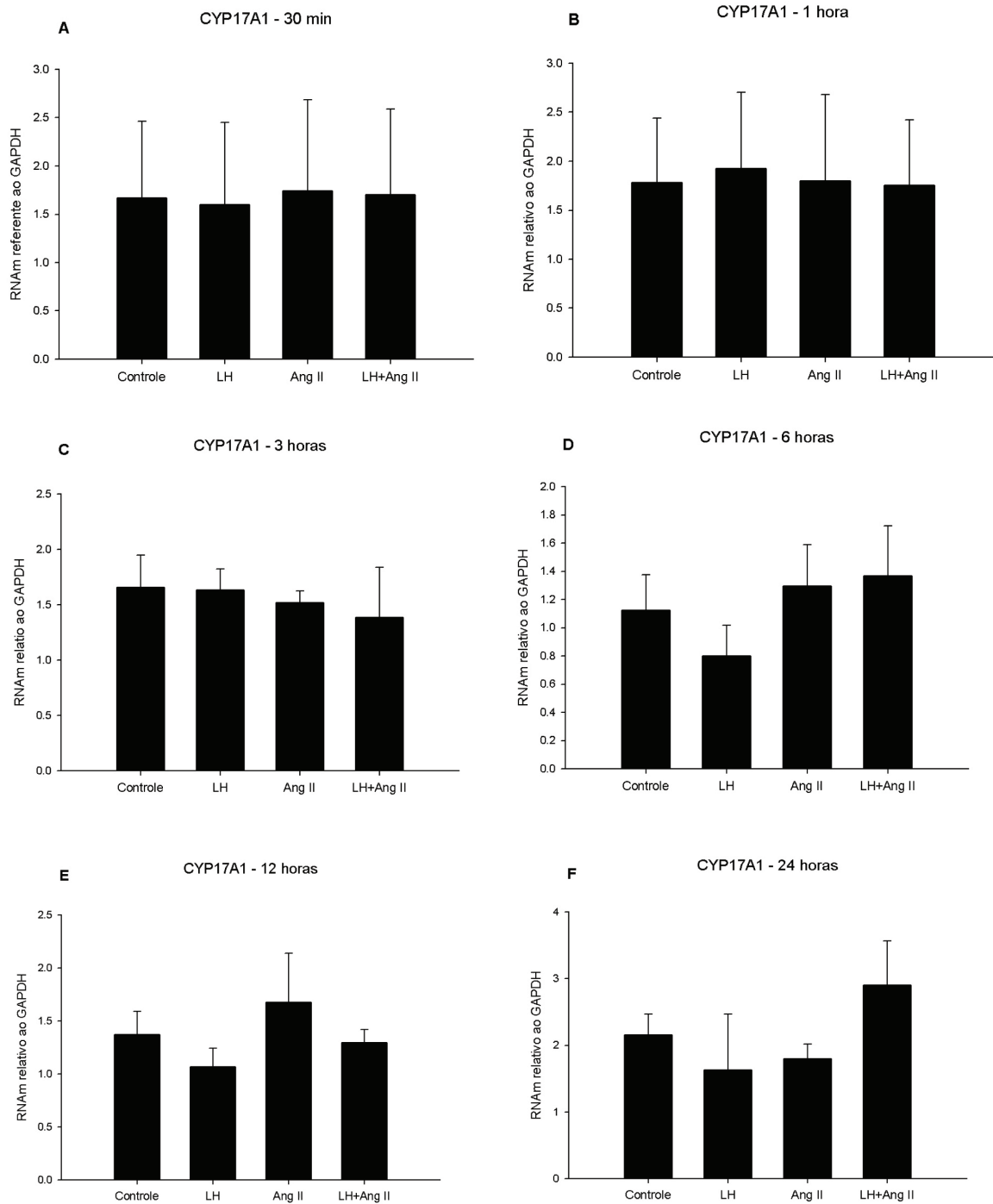


Figura 5 - Efeito da Ang II sobre a esteroidogênese nas células da teca de bovinos cultivadas *in vitro* em diferentes tempos, através da expressão do RNAm (média  $\pm$  erro padrão) para a enzima esteroidogênica CYP17A1 em 30 min (A), 1 hora (B), 3 horas (C), 6 horas (D), 12 horas (E) e 24 horas (F) relativa ao gene constitutivo GAPDH.

## **4. CONCLUSÃO**

Analisando a expressão do RNAm da STAR e das enzimas esteroidogênicas HSD3B2, CYP11A1 e CYP17A1, mas principalmente a síntese de androstenediona e testosterona observamos que a Ang II não foi capaz de estimular a produção de androgênios nas células da teca de bovinos em nosso sistema de cultivo.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, T. J., et al. Evidence for a local endothelin-angiotensin-atrial natriuretic peptide system in bovine mature follicles *in vitro*: effects on steroid hormones and prostaglandin secretion. **Biology of Reproduction**, v.61, p.1419-1425, 1999.
- ACOSTA, T. J., et al. Periovulatory changes in the local release of vasoactive peptides, prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ , and steroid hormones from bovine mature follicles *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v.63 p.1253-61. 2000.
- ACOSTA, T. J. e MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum and regression. **Animal Reproduction Science**, v.82 p.127-40. 2004.
- AGUILERA, G.; MILLAN, M. A. e HARWOOD, J. P. Angiotensin II receptors in the gonads. **American Journal of Hypertension**, v.2 p.395-402, 1989.
- ATTIA, G. R.; et al. Transforming growth factor beta inhibits steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression in human ovarian thecal cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.170 p.123-29. 2000.
- AUCHUS, R. J. e MILLER, W. L. Molecular modeling of human P450c17 (17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase): insights into reaction mechanisms and effects of mutations. **Molecular Endocrinology**, v.13 p.1169-82. 1999.
- BAIRD, D. T.; SWANSTON, I. e SCARAMUZZI, R. J. Pulsatile release of LH and secretion of ovarian steroids in sheep during the luteal phase of the estrous cycle. **Endocrinology**, v.98 p.1490-96. 1976.
- BAIRD, D. T.; SWANSTON, I. A. e MCNEILLY, A. S. Relationship between LH, FSH, and prolactin concentration and the secretion of androgens and estrogens by the preovulatory follicle in the ewe. **Biology of Reproduction**, v.24 p.1013-25. 1981.
- BERISHA, B., et al. Expression and tissue concentration of vascular endothelial growth factor, its receptors, and localization in the bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. **Biology of Reproduction**, v.63 p.1106-14. 2000.
- BIRABEAU, M.; CAPPONI, A. M. e VALLOTTON, M. B. Solubilized adrenal angiotensin II receptors: studies on the site of action of sodium and calcium ions and the role of disulfide bridges. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.37 p.181-89. 1984.
- BREMER, A. A. e MILLER, W. L. The serine phosphorylation hypothesis of polycystic ovary syndrome: a unifying mechanism for hyperandrogenemia and insulin resistance. **Fertility and Sterility**, v.89 p.1039-48. 2008.
- BRUNSWIG-SPICKENHEIER, B. e MUKHOPADHYAY, A. Characterization of angiotensin II receptor subtype n bovine thecal cells and its regulation by luteinizing hormone. **Endocrinology**, v.131 p.1445-53. 1992.

BURGER, H. G. Androgen production in women. **Fertility and Sterility**, v.77, n.4, p.3-5. 2002.

CEDARD, L., et al. Immunoreactive renin variations during fertile and infertile hyperstimulated cycles with in vitro fertilization and embryo transfer or gamete intrafallopian transfer. **Human Reproduction**, v.4 p.403-7. 1989.

CHIU, A. T., et al. Identification of angiotensin II receptor subtype. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.165 p.196-203. 1989.

CHUNG, B. C., et al. Cytochrome P450c17 (steroid 17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20lyase): cloning of human adrenal and testis cDNAs indicates the same gene is expressed in both tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.84 p.407-11. 1987.

COMIM, F. V.; HARDY, K. e FRANKS, S. Adiponectin and its receptors in the ovary: further evidence for a link between obesity and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. **PLOS ONE**, v.8, p.1-9. 2013.

DUDLEY, D. T., et al. Subclasses of angiotensin II receptor binding sites and their functional significance. **Molecular Pharmacology**, v.38 p.370-77. 1990.

FÉRAL, C.; LE GALL, S. e LEYMARIE, P. Angiotensin II modulates steroidogenesis in granulosa and theca in the rabbit ovary: its possible involvement in atresia. **European Journal of Endocrinology**, v.133, p.747-53. 1995.

FÉRAL, C.; BENHAIN, A. e LEYMARIE, P. Angiotensin II receptor type 1 on granulosa and thecal cells of rabbit preovulatory follicles. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1284 p.221-26. 1996.

FERREIRA, R., et al. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. **Reproduction**, v.134, p.713-19. 2007.

FERREIRA, R., et al. Angiotensin II profile and mRNA encoding RAS proteins during bovine follicular wave. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v.XX, p.1-8. 2011a.

FERREIRA, R., et al. Angiotensin II signaling promotes follicle growth and dominance in cattle. **Endocrinology**, v.152, n.12, p.4957-65. 2011b.

FOURNET, N., et al. Transforming growth factor-beta inhibits ovarian 17 alpha-hydroxylase activity by a direct noncompetitive mechanism. **Endocrinology**, v.137 p.166-74. 1996.

GANONG, W. F. The Brain renin-angiotensin system. **Annual Review of Physiology**, v.46 p.17-31. 1984.

GIOMETTI, I. C., et al. Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation. **Theriogenology**, v.63 p.1014-25. 2005.

GONÇALVES, P. B., et al. Role of angiotensin in ovarian follicular development and ovulation in mammals: a review of recent advances. **Reproduction**, v.143, p.11-20. 2012.

HAGEMANN, A., et al. Prorenin and active renin concentrations in ovarian follicular fluid increase after the LH peak in superovulated heifers. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.21 p.639-48. 1994.

HAYASHI, K., et al. Regulation of angiotensin II production and angiotensin receptors in microvascular endothelial cells from bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v.62 p.162-67. 2000.

HILLIER, S. G., et al. Effect of recombinant inhibin on androgen synthesis in cultured human thecal cells, **Molecular and Cellular Endocrinology**, v75 p.1-6. 1991.

HUSAIN, A., et al. Localization of angiotensin II receptors in ovarian follicles and identification of angiotensin II in rat ovaries. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.84 p.2489-93. 1987.

IRVING-RODGERS, H. F., et al. Atresia revisited: two basic patterns of atresia of bovine antral follicle. **Reproduction**, v.122 p.761-75. 2001.

JUENGEL, J. L., et al. The role of transforming growth factor-beta (TGF-beta) during ovarian follicular development in sheep. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.2 p.78. 2004.

KUJI, N., et al. Involvement of angiotensin II in the process of gonadotropin-induced ovulation in rabbits. **Biology of Reproduction**, v.55 p.984-91. 1996.

LABRIE, F., et al. Structure and tissue-specific expression of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/5-ene-4-ene isomerase genes in human and rat classical and peripheral steroidogenic tissues. **Journal Steroid Biochemical Molecular Biology**, v.41 p.421-35. 1992.

LINDPAINTER, K., et al. Tissue renin-angiotensin systems: focus on the heart. **Journal of Hypertension**, v.5 p.33-38. 1987.

MAGOFFIN, D. A. Ovarian theca cell. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.37 p.1344-49. 2005.

MAGOFFIN, D. A. e WEITSMAN, S. R. Insulin-like growth factor-I regulation of luteinizing hormone (LH) receptor messenger ribonucleic acid expression and LH-stimulated signal transduction in rat ovarian theca interstitial cells. **Biology of Reproduction**, v.51 p.766-75. 1994.

MAHENDROO, M. S. e RUSSEL, D. W. Male and female isoenzymes of steroid 5 $\alpha$ -reductase. **Review Reproduction**, v.4, p.179-83. 1999.

MANNA, P. R.; DYSON, M. T. e STOCCO, D. M. Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene expression: present and future perspectives. **Molecular Human Reproduction**, v.15 p.321-33. 2009.

MANOVA, K., et al. Gonadal expression of c-kit encoded at the W locus of the mouse. **Development**, v. 110 p.1057-69. 1990.

MCNEILLY, J. R., et al. Loss of oocytes in *Dazl* knockout mice results in maintained ovarian steroidogenic function but altered gonadotropin secretion in adult animals. **Endocrinology**, v.141 p.4284-94. 2000.

MILLER, W. L. Molecular biology of steroid hormone synthesis. **Endocrine Reviews**, v.9 p.295-318. 1988.

MILLER, W. L. StAR search-what we know about how the steroidogenic acute regulatory protein mediates mitochondrial cholesterol import. **Molecular Endocrinology**, v.21 p.589-601. 2007.

NIELSEN, A. H., et al. Angiotensin II receptor density in bovine ovarian follicles relates to tissue renin and follicular size. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.21 p.463-69. 1994.

NILSSON, E. E. e SKINNER, M. K. Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.214 p.19-25. 2004.

NILSSON, E.; PARROTT, J. A. e SKINNER, M. K. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.175 p.123-30. 2001.

ORISAKA, M., et al. Granulosa cells promote differentiation of cortical stromal cells into theca cells in the bovine ovary. **Biology of Reproduction**, v.75 p.734-40. 2006b.

PANDEY, K. N. e INAGAMI, T. Regulation of renin-angiotensins by gonadotropic hormones in cultured murine leydig tumor cells: Release of angiotensin but nor renin. **Journal of Biological Chemistry**, v.261 p.3934-48. 1986.

PARROTT, J. A. e SKINNER, M. K. Kit ligand actions on ovarian stromal cells: effects on theca cell recruitment and steroid production. **Molecular Reproduction and Development**, v.55 p.55-64. 2000.

PENNING, T. M. Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. **Endocrine Reviews**, v.18 p.281-305. 1997.

PORTELA, V. M., et al. Regulation of angiotensin type 2 receptor in bovine granulosa cells. **Endocrinology**, v.149, p.5004-11. 2008.

PORTELA, V. M., et al. Role of angiotensin II in the periovulatory epidermal growth factor-like cascade in bovine granulosa cells *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.85, p.1167-74. 2011.



SCHAUSER, K. H., et al. Localization of the renin-angiotensin system in the bovine ovary: cyclic variation of the angiotensin II receptor expression. **Biology of Reproduction**, v.65, p.1672-80. 2001.

SCHREIBER, N. B. e SPICER, L. J. Effects of fibroblast growth factor 9 (FGF9) on steroidogenesis and gene expression and control of FGF9 mRNA in bovine granulosa cells. **Endocrinology**, v.153, p.4491-501. 2012.

SCHREIBER, N. B.; TOTTY, M. L. e SPICER, L. J. Expression and effect of fibroblastic growth factor 9 in bovine theca cells. **Journal of Endocrinology**, v.215, p.167-75. 2012.

SIMPSON, E. R., et al. Aromatase gene expression in adipose tissue: relationship to breast cancer. **Int J Fertil Menopausal Stud**, v.39, n.2, p.75-83. 1994.

SOLOVYEVA, E. V., et al. Growth differentiation factor-9 stimulates rat theca-interstitial cell androgen biosynthesis. **Biology of Reproduction**, v.63 p.1214-1218. 2000.

SPICER, L. J.; VOGEL, J. L. e ALLEN, D. T. Insulin-like growth factor-II stimulates steroidogenesis in cultured bovine theca cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.227 p.1-7. 2004.

SPICER, L. J., et al. The hedgehog-patched signaling pathway and function in the mammalian ovary: a novel role for hedgehog proteins in stimulating proliferation and steroidogenesis of theca cells. **Reproduction**, v.138 p.329-39. 2009.

SWENSON, M. J. e REECE, W. O. **Dukes: fisiologia dos animais domésticos**. 11.ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 856p., 1996.

TANAKA, M., et al. Characterization of angiotensin II receptor type 2 during differentiation and apoptosis of rat ovarian cultured granulosa cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.207 p.593-598. 1995.

TREMBLAY, Y., et al. Regulation of the gene for estrogenic 17-ketosteroid reductase lying on chromosome17cen-q25. **Journal Biology Chemical**, v.264 p.20458-62. 1989.

VANWEZEL, I. L., et al. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine ovarian follicles. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.115, p. 133-40. 1995.

WHITEBREAD, D. S., et al. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.163 p.284-91. 1989.

WIJGERDE, M., et al. Hedgehog signaling in mouse ovary: Indian hedgehog and desert hedgehog from granulosa cells induce target gene expression in developing theca cells. **Endocrinology**, v.146 p.3558-66. 2005.

WILSON, C. M., et al. Genetic control of renin activity in the submaxillary gland of the mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.74 p.1185-89. 1977.

WOOD, J. R. e STRAUSS, J. F. Multiple signal transduction pathways regulate ovarian steroidogenesis. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, V.3 p.33-46. 2002.

YAMAMOTO, S., et al. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor (bFGF) during folliculogenesis in the human ovary. **Gynecol Endocrinol**, v.11 p.223-30. 1997.

YAMAMOTO, N., et al. Growth differentiation factor-9 inhibits 3050-adenosine monophosphate-stimulated steroidogenesis in human granulosa and theca cells. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.87 p.2849-56. 2002.

YOSHIMURA, K., et al. Angiotensin II directly induces follicle rupture and oocyte maturation in the rabbit. **Federation of European Biochemical Societies-FEBS**, v.307 p.305-08. 1992.

YOSHIMURA, K., et al. Locally produced angiotensin II induces ovulation by stimulating prostaglandin production in *in vitro* perfused rabbit ovaries. **Endocrinology**, v.133 p.1609-16. 1993.

YOSHIMURA, K., et al. Gonadotropin stimulates ovarian rennin-angiotensin system in the rabbit. **Journal Clinical of Investigation**, v.93 p.180-87. 1994.

YOSHIMURA, K., et al. Angiotensin II induces ovulation and oocyte maturation in rabbit ovaries via the AT2 receptor subtype. **Endocrinology**, v.137 p.1204-11. 1996.

YOUNG, J. M. e MCNEILLY, A. S. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. **Reproduction**, v.140 p.489-504. 2010.

YOUNG, J. M. e MCNEILLY, A. S. Inhibin removes the inhibitory effects of activin on steroid enzyme expression and androgen production by normal ovarian thecal cells. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.48, p.49-60. 2012.

ZSEBO, K. M., et al. Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver – conditioned medium. **Cell**, v.63 p.195-201. 1990.