

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

**REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DA ÓXIDO NÍTRICO  
SINTASE INDUZÍVEL EM CÉLULAS DA GRANULOSA  
BOVINA E O SEU ENVOLVIMENTO COM A  
DOMINÂNCIA FOLICULAR**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Gustavo de Oliveira Zamberlam**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2009**

**REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DA ÓXIDO NÍTRICO  
SINTASE INDUZÍVEL EM CÉLULAS DA GRANULOSA  
BOVINA E O SEU ENVOLVIMENTO COM A DOMINÂNCIA  
FOLICULAR**

**por**

**Gustavo de Oliveira Zamberlam**

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. João Francisco Coelho de Oliveira**

**Santa Maria, RS, Brasil.**

**2009**

**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

**REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE  
INDUZÍVEL EM CÉLULAS DA GRANULOSA BOVINA E O SEU  
ENVOLVIMENTO COM A DOMINÂNCIA FOLICULAR**

elaborada por  
**Gustavo de Oliveira Zamberlam**

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

**Comissão Examinadora:**

**João Francisco Coelho de Oliveira, Dr.**  
(Presidente/Orientador)

**Carlos Fernando de Mello, Dr. (UFSM)**

**Marlon Nadal Maciel, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, 02 de abril de 2009

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida abençoada e cheia de graças que possuo.

Ao Valério, colega de laboratório, grande amigo e pessoa que mais acreditou em mim ao longo do mestrado. Pela confiança, ensinamentos, paciência e, acima de tudo, pelo respeito a mim como pessoa e profissional.

A minha namorada Lucilene, por ter superado a distância, vencido a saudade e me apoiado em todas as minhas escolhas.

Ao Prof. João Francisco, meu orientador, pela confiança, ensinamentos e apoio. Por ter me aceitado como orientado e acreditado na concretização desse trabalho.

Ao Chris, meu co-orientador, pequeno homem, grande pessoa e pesquisador.

Aos meus queridos pais Jurandir e Regina, pelo amor, dedicação, educação e apoio incondicional recebido durante toda a minha vida, e sem os quais não seria possível a realização de minhas conquistas até aqui.

Aos meus irmãos Alexandre, Cristina e Clarissa, pelo carinho, amizade e apoio.

Aos meus grandes amigos Ângela, Rafael, Fabrício e Alfredo, com quem pude desabafar nas horas de angústia, pedir conselhos nas horas de dúvida, e compartilhar todas as conquistas nas horas de alegria.

Aos queridos amigos do Centro de Recherche em Reproduction Animale (CRRRA), Mário, Débora, Kalyne, Fatiha, Jiang e Mira. Por cada sorriso amigo, conversa agradável, conselho sincero e gesto solidário que recebi de cada um ao longo do mestrado.

Ao Prof. Paulo Bayard, que juntamente com o Prof. João Francisco foram meus alicerces dentro da pesquisa, pelos quais tenho muita admiração por sua dedicação à ciência e pelas oportunidades que proporcionam à dezenas de estudantes através do Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal (BioRep).

Aos colegas do BioRep que me apoiaram e torceram pelo meu sucesso.

A Universidade Federal de Santa Maria, pelo fornecimento do ensino público e gratuito.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado.

## RESUMO

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

### **REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZÍVEL EM CÉLULAS DA GRANULOSA BOVINA E O SEU ENVOLVIMENTO COM A DOMINÂNCIA FOLICULAR**

AUTOR: GUSTAVO DE OLIVEIRA ZAMBERLAM  
ORIENTADOR: JOÃO FRANCISCO COELHO DE OLIVEIRA  
Data e Local da Defesa: Santa Maria 02 de abril de 2009.

O óxido nítrico (NO) é um importante regulador da atividade ovariana que é produzido a partir da ação de uma família de enzimas denominadas sintases do óxido nítrico (NOS). As isoformas induzível (iNOS) e endotelial (eNOS) estão presentes nos ovários de diversas espécies. Em vacas, embora a produção de NO já tenha sido detectada no fluido folicular e também no meio de cultivo de células da granulosa (CG), não se sabe qual enzima é responsável pela síntese de NO nem como ocorre a regulação de sua expressão ao longo do desenvolvimento folicular. Os objetivos do presente estudo foram determinar a abundância de RNAm para iNOS e eNOS em CG provenientes de folículos dominantes e subordinados in vivo; determinar a regulação da expressão da iNOS por FSH, fatores de crescimento e estradiol (E2) in vitro; estimular a produção de NO e determinar a ação da iNOS na relação entre saúde e apoptose das CG bovina. Foram coletados os dois maiores folículos presentes em cada par de ovários de seis vacas entre os dias 1 e 5 da primeira onda folicular do ciclo estral. Folículos dominantes apresentaram níveis mais elevados de RNAm para iNOS comparados aos folículos subordinados ( $P < 0.01$ ). Cultivos de CG foram realizados com ovários coletados em abatedouro. Ambos FSH ( $P < 0.05$ ) e IGF1 ( $P < 0.01$ ) estimularam a secreção de E2 e a expressão de iNOS de maneira dose-dependente. Além disso, tanto FGF2 ( $P < 0.05$ ) como EGF ( $P < 0.01$ ) diminuíram a expressão de iNOS e a secreção de E2 em células tratadas com FSH e IGF1, respectivamente. Utilizando diferentes doses de FSH na presença de um andrógeno não-aromatizável (DHT), não foi possível estimular a expressão de iNOS. Ainda, tanto o FSH como o IGF1 não foram capazes de elevar a abundância de RNAm para iNOS na presença de um antagonista não seletivo dos receptores de E2, enquanto que, E2 sozinho estimulou a produção de NO em CG in vitro. No que diz respeito à relação saúde/apoptose das CG, o tratamento com um inibidor seletivo da iNOS aumentou os níveis de RNAm para o fator pró-apoptótico FasL e o percentual de células mortas ( $P < 0.05$ ). Concluindo, células da granulosa bovina expressam predominantemente iNOS, sendo que o aumento da expressão dessa isoforma está associado com a emergência do folículo dominante. FSH e IGF1 promovem o aumento dos níveis de RNAm para a iNOS através do estímulo da secreção de E2 e, níveis fisiológicos da atividade das NOS podem contribuir para o crescimento e sobrevivência das células da granulosa bovina.

**Palavras chave:** ovário, óxido nítrico, desenvolvimento folicular, esteroidogênese, vaca

## **ABSTRACT**

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

### **REGULATION OF INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE EXPRESSION IN BOVINE GRANULOSA CELLS AND ITS INVOLVEMENT WITH FOLLICULAR DOMINANCE**

AUTOR: GUSTAVO DE OLIVEIRA ZAMBERLAM  
ORIENTADOR: JOÃO FRANCISCO COELHO DE OLIVEIRA  
Data e Local da Defesa: Santa Maria 02 de abril de 2009.

Nitric oxide (NO) is an important regulator of ovarian activity, and is produced by a family of nitric oxide synthases (NOS), being inducible (iNOS) and endothelial (eNOS) isoforms present in the ovaries of several species. In cows, even though NO production had been demonstrated in follicular fluid and by granulosa cells (GC) cultured in vitro, it is not known which enzyme is responsible for NO synthesis or how expression is regulated during follicular development. The objectives of the present study were to determine the abundance of iNOS and eNOS mRNAs in dominant and subordinate follicles in vivo, to determine the regulation of iNOS expression by FSH, growth factors and estradiol (E2) in vitro, to stimulate NO production in bovine CG and to determine the action of iNOS on bovine granulosa cell health/apoptosis. The two largest follicles on days 1 to 5 of the first follicular wave of the cycle were collected from each pair of ovaries from six cows. Dominant follicles presented higher levels of mRNA for iNOS compared to subordinate follicles ( $P < 0.01$ ). GC cultures were performed with ovaries collected at abattoir. FSH ( $P < 0.05$ ) and IGF1 ( $P < 0.01$ ) stimulated E2 secretion and upregulated iNOS mRNA abundance in a dose-dependent manner. Moreover, both FGF2 ( $P < 0.05$ ) and EGF ( $P < 0.01$ ) decreased iNOS expression and E2 secretion in FSH and IGF-treated cells, respectively. Graded doses of FSH in the presence of a non-aromatizable androgen (DHT) did not stimulate iNOS mRNA level. In addition, both FSH and IGF1 in the presence of an estrogen receptor antagonist were not able to upregulate iNOS mRNA abundance, whereas E2 alone stimulated NO production in vitro. In terms of cell health/apoptosis, the treatment with an iNOS-selective inhibitor increased the pro-apoptotic factor FasL mRNA levels and the percentage of dead cells ( $P < 0.05$ ). In conclusion, bovine granulosa cells express predominantly iNOS, and increased iNOS mRNA levels are associated with emergence of the dominant follicle. FSH and IGF1 stimulate iNOS mRNA levels through increased E2 secretion, and physiological levels of NOS activity may contribute to growth and survival of bovine granulosa cells.

**Key words:** ovary, nitric oxide, follicle development, steroidogenesis, cow

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Follicle size, estradiol concentration and abundance of mRNA encoding aromatase (CYP19) and iNOS in early dominant and non-dominant follicles.....	40
FIGURA 2 - Effect of hormones and growth factors on abundance of iNOS mRNA and estradiol secretion from granulosa cells in vitro.....	41
FIGURA 3 - iNOS mRNA abundance is stimulated by estradiol.....	43
FIGURA 4 - NO production is stimulated by estradiol (E2).....	44
FIGURA 5 - Effect of iNOS activity on abundance of mRNA encoding the pro-apoptotic factor Fas ligand (FasL) and on the proportion of dead cells.....	45

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	10
<b>2.1. Dinâmica folicular em bovinos</b> .....	10
2.1.1. Seleção e divergência folicular.....	10
2.1.2. Atresia folicular.....	12
2.1.3. Mecanismos anti-apoptóticos nas células da granulosa .....	13
<b>2.2. Óxido nítrico na fisiologia</b> .....	14
2.2.1. Biosíntese do óxido nítrico .....	15
2.2.2. Efeitos do óxido nítrico sobre a esteroidogênese e o desenvolvimento folicular.....	17
2.2.3. Papel do óxido nítrico na apoptose das células da granulosa.....	18
2.2.4. Efeitos do óxido nítrico na maturação oocitária.....	20
2.2.5. Papel do óxido nítrico na ovulação .....	21
2.2.6. Efeitos do óxido nítrico na luteólise .....	21
<b>3. CAPÍTULO 1</b> .....	23
<b>4. CONCLUSÃO</b> .....	49
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	50



## 1. INTRODUÇÃO

Em nível de ambiente folicular, as células da granulosa (CG) desempenham um papel fundamental na manutenção da sanidade e desenvolvimento do folículo. Fatores endócrinos como gonadotrofinas, fatores locais de crescimento e modificadores internos da função celular são os responsáveis por regular o balanço entre a saúde e a apoptose das CG ao longo da foliculogênese. Os radicais livres gasosos compõem um grupo de agentes intracelulares que têm sido relacionados a vários processos fisiológicos no ovário. Dentre eles está o óxido nítrico (NO), um gás de meia-vida curta, produzido pela atividade de enzimas denominadas sintases do NO (NOS) do tipo neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) ou induzível (iNOS). Contudo, são as isoformas eNOS e iNOS as que predominam no tecido ovariano (ROSSELLI *et al.*, 1998).

Estudos confirmam que o NO é produzido pelas células ovarianas e que exerce um papel importante como mediador intra e inter-celular (MASA-AKI HATTORI, 2006). No entanto, tanto a expressão gênica quanto a atividade das NOS podem variar de acordo com a espécie animal e o tipo de célula ovariana envolvidas, bem como ao longo dos diferentes processos, incluindo o desenvolvimento folicular (JABLONKA-SHARIFF e OLSON, 1997; MATSUMI *et al.*, 1998), esteroidogênese (OLSON *et al.*, 1996), maturação de oócitos (MATTA *et al.*, 2009; HUO *et al.*, 2005), ovulação (YAMAUCHI *et al.*, 1997; FALETTI *et al.*, 1999) e a luteólise (SKARZYNSKI *et al.*, 2003).

Em bovinos, embora a presença de NO já tenha sido detectada no fluido folicular, e que, CG bovina cultivadas *in vitro* são capazes de produzir esse gás (BASINI *et al.*, 1998), não se conhece o padrão de expressão gênica e a atividade das NOS em nível de CG, nem como ocorre a regulação de sua expressão no decorrer do desenvolvimento folicular dessa espécie. Alguns estudos, entretanto, indicam que o NO apresenta propriedades anti-apoptóticas para as CG (MATSUMI *et al.*, 2000; SE-JIN YOON, 2002; CHEN *et al.*, 2005). Portanto, considerando que os folículos não selecionados à dominância entram em atresia por meio de apoptose, enquanto que o folículo dominante é capaz de superá-la, nossa hipótese é

de que a expressão das NOS esteja envolvida com o estabelecimento da dominância folicular em bovinos.

Os objetivos do presente estudo foram determinar a abundância de RNAm para iNOS e eNOS em CG provenientes de folículos dominantes e subordinados in vivo; determinar a regulação da expressão da iNOS por FSH, fatores de crescimento e estradiol (E2) in vitro; estimular a produção de NO em cultivo de CG e determinar a ação da iNOS na relação entre saúde e apoptose das CG bovina.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Dinâmica folicular em bovinos**

#### **2.1.1. Seleção e divergência folicular**

A espécie bovina está entre as espécies domésticas cujas fêmeas são consideradas predominantemente monovulatórias, ou seja, somente um folículo chega a ovular ao final de cada ciclo estral (FORTUNE, 1994). Basicamente, no decorrer do ciclo estral da vaca, o desenvolvimento folicular ocorre na forma de ondas. A emergência de cada nova onda se caracteriza pelo crescimento sincronizado de um grupo de folículos antrais, apresentando um diâmetro de aproximadamente 5 mm, em um momento concomitante a elevação transitória dos níveis circulantes de FSH (ADAMS *et al.*, 1992). À medida que a concentração desse hormônio diminui, a maioria desses folículos cessa seu crescimento e passa a regredir no chamado processo de atresia folicular. No entanto, um folículo se difere dos demais, uma vez que é capaz de dar continuidade ao seu desenvolvimento mesmo com os baixos níveis circulantes de FSH (GIBBONS *et al.*, 1997; GINTHER *et al.*, 1997). O processo pelo qual um folículo é “escolhido” a continuar seu crescimento e vir a apresentar potencial para ovular é denominado seleção folicular (FORTUNE, 1994).

O momento em que o folículo selecionado passa a apresentar uma taxa de crescimento superior aos demais, estabelecendo definitivamente a dominância, é denominado de divergência folicular (GINTHER *et al.*, 1997). Esse folículo passa a ser chamado dominante, enquanto os demais são chamados de subordinados (FORTUNE, 1994). Segundo alguns autores, o folículo de maior diâmetro visivelmente presente na primeira detecção de uma onda folicular em bovinos apresenta 60% de chance de se tornar o dominante (GINTHER *et al.*, 1997). Contudo, antes mesmo do início da divergência folicular em diâmetro, eventos que ocorrem no microambiente folicular garantem ao folículo selecionado a futura dominância. Esse fenômeno é descrito na literatura como dominância bioquímica, pois o folículo selecionado já apresenta um perfil gênico diferenciado, o que o possibilita produzir maiores concentrações de fatores de crescimento e hormônios que garantam a continuidade do seu desenvolvimento (FORTUNE *et al.*, 2004). Dentre os fatores e hormônios que apresentam uma contribuição significativa, já com a dominância bioquímica, estão o FSH, o sistema do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e o estradiol (BEG e GINTHER, 2006)

O sistema IGF é composto pelos ligantes IGF1 e 2, receptores do tipo 1 e 2, proteínas ligadoras de IGFs (IGFBPs) e proteases para as IGFBPs (SPICER, 2004). Esse sistema está intimamente relacionado com o estabelecimento e a manutenção da dominância folicular. Diversos estudos indicam que há um aumento nos níveis intrafoliculares de IGF1 no futuro folículo dominante antes do período equivalente ao início da divergência. Isso se deve ao fato de que esse folículo apresenta níveis mais elevados de proteases degradadoras das IGFBPs, as quais enquanto ligadas ao IGF1, o impossibilitam de exercer sua função biológica (RIVERA e FORTUNE, 2003).

Uma das principais características do folículo dominante é a sua maior capacidade de síntese de estradiol (E2) em relação aos folículos subordinados (BADINGA *et al.*, 1992). Ainda durante a dominância bioquímica, antes de divergir em diâmetro e determinar a dominância morfológica, o folículo selecionado já apresenta maior abundância de RNAm para a P450aromatase (CYP19), enzima responsável por converter andrógenos em E2 nas CG (SISCO *et al.*, 2003). Essa maior capacidade estrogênica está também relacionada com a maior responsividade de suas CG ao FSH e, concomitantemente, a maior concentração de IGF1 livre. Embora tanto o FSH quanto o IGF1 estimulem individualmente a secreção de E2 em

CG bovina (GLISTER *et al.*, 2001; CAO *et al.*, 2006), é sabido que existe uma interação entre ambos. O FSH pode estimular a atividade de proteases para as IGFBPs, biodisponibilizando dessa forma IGF1, enquanto esse fator de crescimento, por sua vez, aumenta a responsividade das células da granulosa bovina ao FSH (SPICER, 2004).

### 2.1.2 Atresia folicular

O mecanismo responsável pelo início e a progressão do processo de atresia folicular é a apoptose. Esse processo de morte celular programada ocorre tanto nas CG quanto nas células da teca (HSUEH *et al.*, 1994). No entanto, as mudanças degenerativas associadas com a atresia folicular se manifestam primeiramente nas CG. A morte das CG ocasiona a destruição gradativa das camadas que compõem a parede folicular interna, desencadeando a atresia do folículo (VAN WEZEL *et al.*, 1999). A apoptose pode ter início devido à carência de concentrações adequadas dos hormônios e/ou fatores de crescimento que determinam o desenvolvimento folicular ou mesmo pelo aumento nas concentrações de fatores anti-esteroidogênicos e/ou pró-apoptóticos (CHUN e HSUEH, 1998).

Dentre alguns dos peptídeos intra-ovarianos considerados anti-esteroidogênicos para as CG bovina, estão o fator de crescimento fibroblástico do tipo 2 (FGF2), também conhecido como FGF básico, e o fator de crescimento epidermal (EGF). Embora alguns autores demonstrem que ambos sejam estimuladores da proliferação celular (WANDJI *et al.*, 1996), estudos mais recentes têm demonstrado que o EGF inibe a proliferação de CG cultivadas *in vitro*. Além disso, ambos FGF2 e EGF são capazes de inibir a secreção de E2 em CG bovina estimuladas com FSH ou IGF1 (CAO *et al.*, 2006).

Em relação aos mecanismos pró-apoptóticos, um sistema responsável por mediar a apoptose em diversos tipos celulares, inclusive nas células foliculares, é o Fas/FasL. O Fas (APO-1/CD95) é um receptor de superfície celular pertencente à família do fator de necrose tumoral (TNF), que quando estimulado pelo seu ligante (FasL) é responsável por ativar uma cascata de proteases de cisteínas denominadas caspases. Essas caspases são constitutivamente expressas na forma de

proenzimas inativas, que quando ativadas, levam à progressão da cascata apoptótica de forma irreversível. As caspases, dentre elas as do tipo 3, 8 e 9, estimulam endonucleases que clivam a cadeia de DNA e proteínas responsáveis pela sobrevivência celular como àquelas envolvidas na manutenção e reparos do próprio DNA (LIU *et al.*, 1997; HENGARTNER, 2000).

Em bovinos, o sistema Fas/FasL está altamente relacionado com o início e a progressão da apoptose das células foliculares durante a atresia. Tanto a expressão de RNAm como a presença das proteínas do Fas e seu respectivo ligante, já foram identificadas nas células da granulosa e da teca bovina. Utilizando folículos provenientes da primeira onda folicular do ciclo estral de bovinos também foi possível demonstrar que a expressão de Fas e FasL é maior em folículos atrésicos comparada com folículos saudáveis (PORTER *et al.*, 2000).. Além disso, a responsividade à apoptose induzida pelo FasL é maior em células da granulosa de folículos subordinados atrésicos em relação aos dominantes saudáveis (PORTER *et al.*, 2001).

### 2.1.3 Mecanismos anti-apoptóticos nas células da granulosa

Durante o desenvolvimento folicular, tanto o FSH quanto o IGF1 são considerados fatores de sobrevivência para o folículo. De acordo com estudos a respeito dos mecanismos anti-apoptóticos em CG bovina, tanto o FSH quanto IGF1 nas doses de 1 e 10ng/ml, respectivamente, são capazes de inibir a fragmentação de DNA ocasionada pela apoptose (YANG e RAJAMAHENDRAN, 2000). Em cultivos de CG bovina que utilizam soro fetal bovino no meio, é possível demonstrar que a retirada deste resulta na indução da apoptose seguida de morte celular, as quais estão associadas com o aumento na expressão de ambos Fas e FasL (HU *et al.*, 2001). Nesse mesmo estudo, os autores descrevem que a morte celular é inibida pelo uso de reagentes que previnem a interação entre FasL e Fas. Além disso, tanto o tratamento com IGF1 quanto a adição de soro ao meio de cultivo de CG bovina inibem a apoptose induzida pelo uso de FasL recombinante (QUIRK *et al.*, 2000).

Os mecanismos precisos pelos quais FSH e IGF1 sozinhos ou em sinergismo atuam na prevenção da apoptose não são completamente elucidados. Contudo,

nesse balanço entre saúde e morte das CG, o principal hormônio promotor de sanidade é o E2 (QUIRK *et al.*, 2006). Sabe-se que ambos FSH e IGF1 são capazes de estimular a síntese de E2 in vivo e in vitro. Diversos estudos correlacionam a ocorrência de apoptose em folículos atrésicos devido a diminuição das concentrações intrafoliculares desse esteróide (TILLY *et al.*, 1992). O E2 é capaz de proteger as CG bovina da apoptose induzida pelo tratamento com FasL recombinante de maneira dose-dependente (QUIRK *et al.*, 2006).

## 2.2. Óxido nítrico na fisiologia

O óxido nítrico é um gás inorgânico que foi identificado inicialmente como um poluente atmosférico. No entanto, estudos posteriores demonstraram que esse gás que apresentava uma meia-vida bastante curta, menos de 30 segundos, era solúvel em soluções aquosas e capaz de se difundir entre membranas biológicas (IGNARRO, 2000), tornando esta molécula um interessante alvo de pesquisa. Alguns dos primeiros relatos do NO na fisiologia provêm de estudos com o endotélio vascular, nos quais se demonstrou que este radical livre era o responsável pela dilatação dos vasos sanguíneos (IGNARRO *et al.*, 1987; PALMER *et al.*, 1987). Além do sistema cardiovascular, outros sistemas biológicos humanos e animais passaram a ser contemplados com estudos acerca das funções exercidas ou mediadas pelo NO e/ou produtos da reação dessa molécula com outros radicais.

Atualmente, o NO é descrito como uma das principais moléculas de sinalização intra e inter-celular presentes no organismo. Tanto o NO quanto as espécies reativas do oxigênio geradas a partir desse radical livre reagem com uma variedade de biomoléculas como o DNA, fatores de transcrição, enzimas, citocinas e receptores de membrana, exercendo ou mediando uma variedade de funções fisiológicas e patológicas. Dentre algumas das funções atribuídas ao NO, incluem-se sua participação no sistema imunológico, onde a alta produção de NO e derivados tem papel fundamental na destruição de agentes patológicos (WEI *et al.*, 1995; HUANG *et al.*, 1999), no sistema nervoso, onde o NO serve como neurotransmissor ou envolvido com condições patológicas, como a isquemia e a doença de Parkinson (GUIX *et al.*, 2005), no músculo estriado esquelético, estando

envolvido no mecanismo de contração, metabolismo energético e controle local do fluxo sanguíneo (STAMLER e MEISSNER, 2001) e, no sistema respiratório, participando do controle da perfusão pulmonar e da broncodilatação (RICCIARDOLO *et al.*, 2004).

### 2.2.1. Biosíntese do óxido nítrico

Nos sistemas biológicos, o NO é um gás formado como produto da conversão do aminoácido L-Arginina em L-Citrulina pela ação de enzimas denominadas sintases do NO (NOS). A identificação dessas enzimas ativas no ambiente celular significou um avanço extremamente importante para a comprovação dos efeitos biológicos exercidos pelo NO. Além dos efeitos até então demonstrados através do uso de fármacos doadores desse gás, também foi possível elucidar a síntese de NO a partir de estímulos endógenos (IGNARRO, 2000).

Existem quatro diferentes isoformas conhecidas dessas isoenzimas, sendo que elas apresentam diferentes padrões de expressão gênica e distribuição tecidual. As isoformas neuronal (nNOS ou NOS1) e endotelial (eNOS ou NOS3), assim denominadas pelo tipo de tecido em que foram detectadas originalmente, apresentam um padrão de expressão comumente reconhecido como de caráter constitutivo, ou seja, sua expressão ocorre de maneira basal nos tecidos. Por esta característica são consideradas responsáveis pela liberação contínua de níveis basais de NO. Por outro lado, uma isoforma denominada induzível (iNOS ou NOS2), primeiramente descrita em macrófagos, apresenta caráter de expressão gênica passível de regulação (FORSTERMANN *et al.*, 1994). Uma quarta isoforma, chamada mitocondrial (mtNOS), também é descrita na literatura (GHAFOURIFAR e RICHTER, 1997; LACZA *et al.*, 2003), porém existem divergências quanto ao fato de que essa isoforma presente nas mitocôndrias seja realmente uma enzima diferente das demais e não apenas a eNOS ou iNOS deslocadas para o ambiente mitocondrial.

É importante ressaltar que além das sintases, a presença adequada de substratos e cofatores enzimáticos são condições determinantes na produção de NO. As enzimas sintetizadoras de NO apresentam em sua estrutura um domínio C-terminal redutor, um domínio com sítio de ligação para a calmodulina e, um domínio

N-terminal oxidante, o qual forma o sítio catalítico da molécula. É no domínio C-terminal redutor onde se encontram os sítios de ligação específicos para o co-substrato fosfato de nicotinamida-adenina nucleotídeo (NADPH) e para os cofatores flavina-adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN). Já no domínio N-terminal oxidante, encontram-se os sítios de ligação para os cofatores ferroprotoporfirina IV (Heme), tetraidrobiopterina (H4B), além dos sítios de ligação para o oxigênio (co-substrato) e para o substrato L-arginina (STUEHR e GHOSH, 2000).

O sítio de ligação para a calmodulina situa-se entre o domínio C-terminal redutor e o domínio N-terminal oxidante. Entretanto, é na porção próxima ao sítio de ligação com a FMN que existe uma sequência de aminoácidos de auto-inibição, cuja função é controlar a duração da ligação da calmodulina. No decorrer do mecanismo de produção do NO, as flavinas ligadas ao domínio C-terminal adquirem elétrons provenientes do NADPH e os conduzem para o grupamento heme presente no domínio oxidante, permitindo assim a ligação do oxigênio e, conseqüentemente, catalisando a síntese de NO. Portanto, basicamente o processo se inicia com a hidroxilação do aminoácido L-Arginina ao intermediário L-N-hidroxiarginina, que por sua vez é oxidado formando o aminoácido L-Citrulina e concomitantemente produzindo o NO (STUEHR, 1997).

Além das diferenças quanto à localização tecidual preferencial e regulação de expressão, as sintases do NO também diferem quanto à sua capacidade de produção desse gás. Embora o padrão de expressão de mRNA seja uma condição importante, a capacidade de síntese também está relacionada com a maneira como essas isoenzimas são ativadas e se mantêm em funcionamento. Para as isoformas eNOS e nNOS se tornarem ativas, é necessário um aumento nas concentrações intracelulares de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). O  $\text{Ca}^{2+}$  se liga a calmodulina (CaM formando o chamado complexo cálcio/calmodulina ( $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ). À medida que o  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  se desfaz as isoformas constitutivas cessam sua atividade, pois a calmodulina se desliga de seu sítio de ligação interrompendo a transferência de elétrons necessária para a geração de NO. Por essa razão essas isoformas são normalmente denominadas  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes (STUEHR e GHOSH, 2000).

Em relação à iNOS, embora essa isoforma também dependa do aumento do nível de cálcio intracelular para ser ativada, ela independe da manutenção de níveis elevados desse mineral para se manter em atividade (GELLER *et al.*, 1993). No



caso desta isoforma induzível, a ligação da calmodulina ao seu respectivo sítio é considerada praticamente irreversível (CHO *et al.*, 1992). Uma das razões atribuídas a isso, se deve ao fato de que a iNOS não apresenta a sequência de auto-inibição para sítio de ligação da calmodulina que as demais isoformas apresentam (SALERNO *et al.*, 1997). Portanto, a produção de NO a partir da atividade da iNOS é determinada, principalmente, pela sua expressão gênica. Dessa forma, uma vez induzida pelos estímulos apropriados, a iNOS é responsável por gerar NO por períodos prolongados e em um nível superior àquele gerado a partir da ação das isoformas constitutivas.

### 2.2.2. Efeitos do óxido nítrico sobre a esteroidogênese e o desenvolvimento folicular

A esteroidogênese, principalmente a síntese de E2, é um processo que está intimamente relacionado com desenvolvimento folicular. Vários estudos caracterizam o NO como um importante regulador da síntese de esteróides durante a foliculogênese. Em folículos humanos pré-ovulatórios, já foi demonstrado que existe uma correlação positiva entre a presença de NO (metabólitos estáveis), a concentração de E2 e o volume folicular (ANTEBY *et al.*, 1996). Além disso, a perfusão do inibidor não-seletivo das NOS, N-omega-nitro-L-arginine metil ester (L-NAME), em folículos de ratas estimulados com LH, ocasiona uma diminuição na secreção de E2, sugerindo que o NO regule de maneira positiva a síntese desse hormônio (BONELLO *et al.*, 1996).

Outros estudos, entretanto, caracterizam o NO como um agente anti-esteroidogênico. Segundo alguns autores, esse gás é capaz de inibir a esteroidogênese tanto em células da granulosa-luteal de humanos quanto células da granulosa suína e de ratas diminuindo a abundância de RNAm para P450 aromatase (CYP19) ou mesmo bloqueando diretamente a atividade dessa enzima (VAN VOORHIS *et al.*, 1994; SNYDER *et al.*, 1996; MASUDA *et al.*, 1997). Contudo, estudos com CG de humanos (KAGABU *et al.*, 1999), camundongos (ISHIMARU *et al.*, 2001), e suínos (GRASSELLI *et al.*, 2001) cultivadas *in vitro*, indicam que o principal mecanismo utilizado pelo NO na inibição da esteroidogênese ocorre via

ativação da guanilato ciclase solúvel que por sua vez estimula o aumento do segundo mensageiro monofosfato de guanosina cíclica (GMPc).

Na espécie bovina, a adição ao meio de cultivo de CG de S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP), um doador do NO, determina a inibição da síntese de E2 e P4 de forma dose-dependente (BASINI *et al.*, 1998). Entretanto, através do uso de análogos do GMPc não foi possível reproduzir eficientemente os efeitos ocasionados pelo SNAP, evidenciando que a ação anti-esteroidogênica exercida pelo NO gerado a partir do doador ocorre sem a ativação da via GMPc nessa espécie (BASINI *et al.*, 2000). Por outro lado, estudos recentes com CG bovina cultivadas *in vitro*, indicam que através do uso de outro doador exógeno de NO, nitroprussiato de sódio (SNP), na concentração de  $10^{-5}$  M é possível estimular a síntese de E2 via a ativação de GMPc (FAES *et al.*, 2009).

Estudos de expressão gênica e imunolocalização têm demonstrado tanto a abundância de RNAm quanto a presença das enzimas iNOS e eNOS nas CG e células da teca de algumas espécies (JABLONKA-SHARIFF e OLSON, 1997; MASUDA *et al.*, 2001). De acordo com resultados obtidos por Van Voorhis *et al.* (1995), a iNOS pode ser detectada nas CG de ratas, enquanto que a proteína para eNOS está localizada nos vasos sanguíneos ovarianos. Estes autores também demonstraram que a expressão de iNOS está elevada em CG de ratas apresentando atividade esteroidogênica reduzida, porém os níveis de RNAm para essa isoforma diminuem após a estimulação com gonadotrofina sérica de égua em estro (PMSG). Por outro lado, o tratamento de CG suína com FSH determina um aumento na expressão de eNOS (TAKESUE *et al.*, 2001).

### 2.2.3. Papel do óxido nítrico na apoptose das células da granulosa

Como já citado anteriormente, o principal mecanismo responsável por desencadear os fenômenos que levam a atresia folicular é a apoptose. O NO pode prevenir ou induzir a apoptose dependendo do tipo celular e da concentração em que é produzido (CHUNG *et al.*, 2001). Embora alguns autores sugiram que o NO possua propriedades citotóxicas para as células da granulosa (ELLMAN *et al.*, 1993), diversos estudos caracterizam esse radical livre como um fator de

sobrevivência para as células foliculares. Estudos com folículos pré-ovulatórios de ratas relacionam o NO como um dos mediadores do mecanismo anti-apoptótico desencadeado pela gonadotrofina coriônica humana (hCG) (CHUN *et al.*, 1995). Estes autores também descrevem que o mecanismo pelo qual o NO suprime a fragmentação da cadeia de DNA, que ocorre como consequência da apoptose, se dá via o segundo mensageiro GMPc.

Diversas evidências também demonstram que o NO pode inibir a apoptose folicular modulando a expressão de genes pró e anti-apoptóticos. A atividade desse gás ativa mecanismos capazes de suprimir a expressão do gene que codifica para a proteína pró-apoptótica Bax, cuja expressão está associada com o processo de atresia folicular (SE-JIN YOON, 2002). Além disso, a apoptose induzida como resultado da ação de FasL recombinante em CG de ratas, é acompanhada por um aumento significativo da atividade das caspases do tipo 3, 8 e 9, com concomitante diminuição na expressão do gene que codifica para iNOS. Enquanto que o tratamento com um doador de NO previne a apoptose atenuando a ativação da cascata de caspases (CHEN *et al.*, 2005).

Em humanos, o tratamento de células da granulosa-luteal com o inibidor não-seletivo das NOS, L-NAME, permite a ativação do sistema Fas/FasL levando essas células à apoptose (JEE *et al.*, 2003). Além disso, células epiteliais ovarianas cancerígenas nessa espécie se caracterizam pelo aumento acentuado na abundância de RNAm para iNOS, sendo que o NO gerado a partir da atividade dessa isoforma induzível promove a progressão tumoral via indução da proliferação celular e mecanismos anti-apoptóticos, bem como por meio da expressão de fatores angiogênicos (ENGELS *et al.*, 2008).

Estudos acerca da relação entre o NO e a apoptose nas CG também contemplam a espécie bovina. Resultados obtidos por Basini *et al.* (1998) indicam que as funções exercidas pelo NO gerado a partir de doadores exógenos variam de acordo com a concentração de doador utilizada, bem como o grau de diferenciação das CG isoladas para o cultivo. Enquanto o uso de uma alta concentração de S-nitroso-L-acetil-penicilamina (SNAP; 10-3M) inibe a fragmentação de DNA em CG provenientes de folículos pequenos (<5 mm) e grandes (>8 mm), o tratamento com uma baixa concentração (10-5M) promove a apoptose em CG de folículos grandes. Inversamente, estudos recentes indicam que o uso do doador exógeno nitroprussiato de sódio (SNP) em uma concentração elevada (10-3M), exerce efeitos

citotóxicos, diminuindo a viabilidade de CG cultivadas *in vitro*. Porém, uma baixa concentração (10<sup>-5</sup>M) estimula a secreção de E2 (FAES *et al.*, 2009), sugerindo que o NO esteja realmente envolvido com mecanismos anti-apoptóticos em CG bovina.

#### 2.2.4. Efeitos do óxido nítrico na maturação oocitária

Diversos estudos têm demonstrado que o NO também exerce um papel importante na cascata de sinalização intracelular que leva à maturação oocitária. A expressão e/ou localização de eNOS já foi descrita em oócitos de ratas (JABLONKA-SHARIFF e OLSON, 1997), suínos (TAO *et al.*, 2004) e camundongos (NISHIKIMI *et al.*, 2001). Entretanto, a iNOS também está presente em oócitos de diversas espécies, sendo que o NO gerado a partir da atividade dessa isoforma é considerado essencial para a maturação nuclear oocitária em camundongos (BLASHKIV *et al.*, 2001), ratas (BU *et al.*, 2004) e suínos (TAO *et al.*, 2004). Estudos com oócitos de camundongos, por exemplo, indicam que o cultivo dessas células na presença de aminoguanidina (AG), um inibidor seletivo da atividade de iNOS, bloqueia a quebra da vesícula germinativa e a extrusão do primeiro corpúsculo polar, fenômenos necessários para o processo de maturação (HUO *et al.*, 2005).

A expressão de iNOS também pode ser detectada em oócitos bovinos (TESFAYE *et al.*, 2006), onde concentrações adequadas de NO são necessárias para a progressão fisiológica da maturação nuclear e citoplasmática. Estudos com oócitos cultivados na presença de AG no meio de maturação, demonstram que o NO proveniente da atividade de iNOS afeta a maturação de oócitos bovinos *in vitro*, modulando a viabilidade oocitária, progressão da meiose, bem como o desenvolvimento do blastocisto (BILODEAU-GOESEELS, 2007; MATTA *et al.*, 2009)

A relação entre NO e maturação oocitária também é descrita na literatura através de estudos que utilizam doadores exógenos desse gás. No entanto, os resultados são muitas vezes controversos, pois os doadores apresentam efeitos opostos de acordo com a concentração utilizada. Em bovinos, por exemplo, enquanto que o uso de uma concentração elevada do doador SNP (10<sup>-3</sup>M) gera efeitos citotóxicos aos oócitos, enquanto que uma concentração intermediária (10<sup>-5</sup>M) estimula a maturação nuclear e citoplasmática (VIANA *et al.*, 2007).

### 2.2.5. Papel do óxido nítrico na ovulação

As prostaglandinas (PGs), principalmente a PGE<sub>2</sub>, são essenciais para a cascata ovulatória, pois induzem a vasodilatação tecidual e alterações na região apical do folículo pré-ovulatório (SIROIS *et al.*, 2004). A relação entre a produção de NO e a síntese de PGs tem sido descrita em diversos tecidos, inclusive no ovário. Segundo alguns autores, o NO é capaz de regular a enzima precursora da síntese de PGs, ciclooxigenase do tipo 2 (COX<sub>2</sub>), não somente em nível de transcrição e tradução, mas também em nível de atividade enzimática (TETSUKA *et al.*, 1996). Enquanto baixas concentrações de NO têm sido relacionadas com o aumento da atividade de COX<sub>2</sub> (SALVEMINI, 1997), altas concentrações são capazes de inibir tanto a síntese desta enzima, como também sua atividade (STADLER *et al.*, 1994).

Em CG bovina cultivadas *in vitro*, é possível inibir a síntese de PGE<sub>2</sub> através do uso do doador SNAP, a uma concentração de 10<sup>-3</sup>M (BASINI e TAMANINI, 2001). Por outro lado, em folículos pré-ovulatórios de ratas o NO proveniente da atividade de iNOS estimula a síntese de PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2</sub>α via ciclooxigenases (FALETTI *et al.*, 1999). Existem também relatos de que através do uso de AG e L-NAME, ambos bloqueadores da atividade das NOS, foi possível bloquear a ovulação induzida por gonadotrofina coriônica humana (hCG) em ovários de coelhas perfundidos *in vitro* (YAMAUCHI *et al.*, 1997) e em folículos pré-ovulatórios de ratas (MITSUBE *et al.*, 1999).

### 2.2.6. Efeitos do óxido nítrico na luteólise

Os mecanismos que controlam a formação e manutenção do corpo lúteo (CL), bem como a luteólise, são conhecidos por serem processos dependentes de PGs e citocinas. O NO exerce um papel importante tanto na regressão funcional quanto estrutural do CL. A maior produção de NO pelas células luteais ocorre durante o final da fase luteal (SKARZYNSKI *et al.*, 2003), confirmando a relação temporal que esse gás possui com a luteólise. Estudos utilizando inibidores das NOS sugerem que o

NO atue estimulando a síntese de  $\text{PGF2}\alpha$  nas células luteais (MOTTA *et al.*, 1997). Além disso, o tratamento com SNAP estimula a atividade de  $\text{PGF2}\alpha$  em células luteais bovinas contribuindo para a regressão do CL (SKARZYNSKI *et al.*, 2000), enquanto que a administração de L-NAME no ovário durante a fase luteal aumenta a secreção de P4 e prolonga a vida funcional do CL (JAROSZEWSKI *et al.*, 2003).

Ainda em bovinos, o fator de necrose tumoral  $\alpha$  ( $\text{TNF}\alpha$ ) induz a luteólise que é acompanhada por um aumento concomitante na produção de  $\text{PGF2}\alpha$  e NO. Além disso, através da infusão de L-NAME é possível bloquear completamente os efeitos luteolíticos do  $\text{TNF}\alpha$  em bovinos (SKARZYNSKI *et al.*, 2005). Segundo (MOTTA *et al.*, 2001), tanto a NO como a  $\text{PGF2}\alpha$  estão envolvidos em parte com a regulação da peroxidação de lipídios na regressão luteal.

### **3. CAPÍTULO 1**

TRABALHO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:

**REGULATION OF INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE EXPRESSION IN  
BOVINE GRANULOSA CELLS AND ITS INVOLVEMENT WITH FOLLICULAR  
DOMINANCE**

Gustavo Zamberlam, Valério Portela, João Francisco Coelho de Oliveira, Paulo  
Bayard Dias Gonçalves, Christopher Price

BIOLOGY OF REPRODUCTION, 2009

**REGULATION OF INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE EXPRESSION IN  
BOVINE GRANULOSA CELLS AND ITS INVOLVEMENT WITH FOLLICULAR  
DOMINANCE**

**Gustavo Zamberlam<sup>1,2</sup>, Valério Portela<sup>2</sup>, João Francisco Coelho de Oliveira<sup>1</sup>,  
Paulo Bayard Dias Gonçalves<sup>1</sup>, Christopher Price<sup>2,3</sup>.**

Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal<sup>1</sup>, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil; Centre de Recherche en Reproduction Animale<sup>2</sup>, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, St-Hyacinthe, QC, Canada.

Key words: ovary, nitric oxide, follicle development, steroidogenesis, *Bos taurus*

Running head: Nitric oxide synthases in bovine follicles

<sup>3</sup>Correspondance: C.A.Price, CRRA, Faculte de médecine vétérinaire, C.P. 5000, St-Hyacinthe QC, J2S 7C6 Canada. Email: christopher.price@umontreal.ca



**Abstract**

*Nitric oxide (NO) is an important regulator of ovarian activity, and is produced by a family of nitric oxide synthases (NOS), being inducible (iNOS) and endothelial (eNOS) the isoforms identified in the ovaries of several species. In cows, even though NO production had been demonstrated in follicular fluid and by granulosa cells (GC) cultured in vitro, it is not known which enzyme is responsible for NO synthesis or how expression is regulated during follicular development. The objectives of the present study were to determine the abundance of iNOS and eNOS mRNAs in dominant and subordinate follicles in vivo, to determine the regulation of iNOS expression by FSH, growth factors and estradiol (E2) in vitro, to stimulate NO production with E2 and to determine the action of iNOS on bovine granulosa cell health/apoptosis. The two largest follicles on days 1 to 5 of the first follicular wave of the cycle were collected from each pair of ovaries from six cows. Dominant follicles presented higher levels of mRNA for iNOS compared to subordinate ( $P<0.01$ ). Granulosa cells cultures were performed with ovaries collected at abattoir. FSH ( $P<0.05$ ) and IGF1 ( $P<0.01$ ) stimulated E2 secretion and upregulated iNOS mRNA abundance in a dose-dependent manner. Moreover, both FGF2 ( $P<0.05$ ) and EGF ( $P<0.01$ ) decreased iNOS expression and E2 secretion in FSH and IGF1-treated cells, respectively. Graded doses of FSH in the presence of a non-aromatizable androgen (DHT) did not stimulate iNOS mRNA abundance, whereas both FSH and IGF1 in the presence of an estrogen receptor antagonist were not capable to upregulate iNOS mRNA abundance. In addition, E2 alone stimulated NO production*

*in vitro*. The treatment with an iNOS-selective inhibitor increased FasL mRNA level ( $P < 0.05$ ) and the percentage of dead cells ( $P < 0.05$ ). In conclusion, bovine granulosa cells express predominantly iNOS, and increased iNOS mRNA levels are associated with emergence of the dominant follicle. Gonadotropic factors stimulate iNOS mRNA levels through increased E2 secretion, and physiological levels of NOS activity may contribute to growth and survival of granulosa cells.

## **Introduction**

Nitric oxide (NO) is a free radical gas considered to be a multipurpose signalling molecule produced during the enzymatic conversion of L-arginine to L-citrulline by a family of nitric oxide synthases (NOS) with distinct features. Endothelial (eNOS, also known as NOS3) and inducible NOS (iNOS, also known as NOS2) are expressed in reproductive tissues, including the ovary; however, while eNOS expression pattern is commonly constitutive, iNOS is considered to be regulated [1].

Several findings indicate that NO is an autocrine regulator of ovarian steroidogenesis. In human follicles, NO is positively correlated with estradiol (E2) concentration and follicular volume [2] and in rats, treatment of pre-ovulatory follicles with a non-selective NOS inhibitor decreases E2 secretion [3]. However, NO has been also demonstrated as an inhibitor of follicular steroidogenesis. Studies using cultured human granulosa-luteal cells [4], porcine [5] and rat granulosa cells [6] demonstrate that NO inhibits cytochrome P450 aromatase (CYP 19) both by an acute, direct inhibition of enzyme activity and by decreasing abundance of mRNA

coding for the enzyme. The major intracellular pathway used by NO is through guanylate cyclase/cGMP signaling [7, 8].

In terms of enzyme localization and gene expression regulation of NOS in ovarian cells, iNOS and eNOS have been identified in granulosa cells (GC) and theca cells in several species [9, 10]. The abundance of mRNA encoding iNOS decreased transiently after pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) administration in rats [11], whereas in pigs, FSH stimulated eNOS expression [12].

In cows, NO production had been demonstrated in follicular fluid and GC cultured in vitro [13]. Nevertheless, studies of the effects of NO on cultured bovine GC are contradictory. Studies demonstrated inhibited E2 secretion and decreased apoptosis with the use of the NO donor S-nitroso-N-acetyl-penicillamine (SNAP) [13], whereas other report showed that sodium nitroprusside (SNP), other NO donor, at low concentration stimulated E2 secretion [14]. These discrepancies may be due to the cytotoxic effects of these compounds at high doses [14].

Some evidence also indicates that NO is an anti-apoptotic factor for CG, inhibiting the expression of genes responsible for triggering the apoptotic cascade [15-17]. During follicle growth in cattle, one follicle from among a cohort of similar-sized antral follicles is selected for further growth and the other follicles in the cohort regress and undergo atresia through apoptosis [18, 19]. Our hypothesis is that NOS expression is associated with the establishment of dominance in cattle.

The objectives of the present study were to determine the abundance of iNOS and eNOS mRNAs in dominant and subordinate follicles in vivo, to determine the regulation of iNOS expression by FSH, growth factors and estradiol (E2) in vitro, to

stimulate NO production with E2 and to determine the action of iNOS on bovine granulosa cell health/apoptosis

## **Materials and methods**

### **Experiment I. NOS expression pattern in dominant and non-dominant follicles**

#### *Animals / follicles*

The experimental animals were obtained from a herd of Angus cattle on a farm in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. The experimental procedures were reviewed and approved by the Federal University of Santa Maria Animal Care and Use Committee. Ovulation and subsequent emergence of the first follicular wave of the cycle were induced by an injection of PGF<sub>2</sub> $\alpha$  as described [20]. Between days 1 and 5 of the cycle, when the newly-selected dominant follicle can be identified by E2 content but not necessarily by size [20, 21], the animals were slaughtered at a local abattoir and the ovaries transported to the laboratory.

The two largest follicles from each pair of ovaries were dissected and their diameter was measured. When the two largest follicles were of similar size, the follicular fluid was aspirated, centrifuged and frozen for steroid assay. The antral cavity was repeatedly flushed with saline solution and GC recovered by centrifugation at 1200 g for 1 min and pooled with the follicular fluid pellet. The samples were collected into Trizol (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) and the total RNA was extracted immediately according to the manufacturer's protocol. A total of 12 follicles

from six cows were used. The dominant follicle in each animal was identified by follicular fluid E2 concentration and evaluation of mRNA encoding CYP19.

## **Experiment II. Regulation of iNOS expression in bovine GC by FSH and growth factors**

### *Granulosa cell culture*

The GC culture was based on a culture system described by Gutierrez [22] with slight modifications. Reagents were obtained from Invitrogen Life Technologies (Burlington, ON, Canada) except where otherwise stated. Briefly, bovine ovaries were collected from adult cows at abattoir, and were transported to the laboratory in PBS at 35°C containing penicillin (100IU/ml) and streptomycin (100µg/ml). Follicles between 2 and 5mm diameter were dissected and GC were collected by rinsing the follicle wall with DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12). The granulosa cells were washed twice by centrifugation at 980 *g* for 20min each and suspended in DMEM/F12 containing Hepes (15mM), sodium bicarbonate (10mM), sodium selenite (4ng/ml), BSA (0.1%; Sigma-Aldrich, ON, Canada), penicillin (100IU/ml), streptomycin (100µg/ml), transferrin (2.5µg/ml), non-essential amino acid mix (1.1mM), androstenedione (A4; 10<sup>-7</sup>M at start of culture, and 10<sup>-6</sup>M at each medium change) and insulin (10ng/ml). The number of GC was counted with a haemocytometer and the viable cells were assessed by the dye exclusion method using 0.4% Trypan Blue. Cells were seeded into 24-well tissue culture plates (Sarstedt, QC, Canada) at a density of 1x10<sup>6</sup> viable cells per well in 1ml medium.

Cultures were maintained at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> in air for 6 days, with 700µl medium being replaced every 2 days. Medium samples were collected on day 6 and stored at -20°C until steroid assay, and cells were collected in Trizol and stored at -80°C until RNA extraction. All series of cultures were performed on at least three different pools of cells collected on different occasions.

### *Treatments*

In the first series of cultures, GC were cultured in the presence of graded doses of FSH (0, 0.05, 0.1, 0.5, and 1ng/ml; AFP-5332B; NIDDK USA) or insulin like growth factor 1 (IGF1; 0, 5, 10 and 100ng/ml; Sigma-Aldrich Canada). Both FSH and IGF are considered stimulators of GC proliferation and E2 secretion [22, 23]. In the second series of cultures, cells were cultured in the presence of IGF1 (10ng/ml) with or without epidermal growth factor (EGF; 10ng/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN, Canada) and FSH (1ng/ml) with or without fibroblast growth factor-2 (FGF2; 10ng/ml; Sigma-Aldrich Canada). These growth factors were used at doses previously demonstrated to inhibit E2 secretion for this cell model [23].

A third series of cultures was carried out to confirm whether E2 mediates FSH and growth factors effects on iNOS expression. First, cells were cultured with graded doses of FSH (0, 0.1, 0.5 or 1ng/ml) in the presence of dihydrotestosterone (DHT; 1.0µM), a non-aromatizable androgen or 1.0µM of A4, an aromatizable androgen. Finally, GC were cultured in the presence of IGF1 (10ng/ml) with or without 10µM of ICI 182,780, a specific estrogen receptor antagonist ([ICI]; SIGMA, St. Louis, MO, USA) and FSH (1ng/ml) in the presence or absence of ICI 182,780.

### **Experiment III. Effect of estradiol on NO production**

In attempt to evaluate E2 effects on iNOS activity, the direct and simultaneous monitoring of NO production was performed in GC cultures treated with E2. Cells were cultured for 6 days in the presence of insulin (10ng/ml) as a survival factor, with 700µl medium being replaced every 2 days. On day 6, before the addition of 100ng of E2, cells were pre-incubated for two hours in the presence of 10µM of 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM DA [DAF]; Molecular Probes), a fluorescent NO-sensitive dye used for intracellular imaging of NO as described [24]. The images were acquired through a laser-scanning confocal microscopy on time zero for background establishment, at 20 and 240 minutes after treatment with E2. Samples evaluation were performed on an Olympus FV1000 laser-scanning confocal microscope (Olympus®). The excitation light came from a multi-argon laser (458, 488 and 515 nm) and emission light from granulosa cells was acquired at 500 nm with a bandpass filter of 100 nm. Image acquisition was conducted at a resolution of 1024 X 1024 pixels and a scan rate of 10 µs / pixel using a UPLSAPO 4X objective (Olympus®). Images acquisition were export as TIFF files using the Olympus Fluoview software FV10-ASW to minimize oversaturated pixels in the final images used.

#### **Experiment IV. Relationship between iNOS activity and apoptosis in bovine GC**

To investigate the role of iNOS on apoptotic cascade, GC were cultured in the regular conditions in the presence of FSH (1ng/ml) with or without 100mM of the iNOS-selective inhibitor, aminoguanidine hemisulfate salt ([AG]; SIGMA, St. Louis, MO, USA); and IGF1 (10ng/ml) with or without AG. At the end of 6 days of culture, samples were collected to FasL mRNA abundance evaluation by real-time RT-PCR. The percentage of dead cells was evaluated through flow cytometry essentially as described [25]. The cells selected to flow cytometry were recovered by scraping the plate with a rubber spatula. The cells were washed 3 times in ice-cold PBS then fixed overnight in 70% ethanol before staining with propidium iodide (50 mg/mL in PBS with 0.1% Triton X and 20 mg/mL RNase A). A minimum of 25.000 propidium iodide stained cells/sample were sorted on a FACSVantage SE (BD Biosciences, Oakville, ON, Canada) and analyzed with Cell Quest Pro software (BD Biosciences). The number of cells in the “sub-G1” peak was quantified and represented the number of apoptotic (dead) cells. Proportions of dead cells were transformed to arcsines before statistical analysis.

##### *Relative quantification by real-time RT-PCR*

For both in vivo and in vitro samples, gene expression was assessed by relative real-time RT-PCR. Total RNA (1µg) was first treated with 1U DNase (Promega, Madison, WI USA) at 37°C for 5min to digest any contaminating DNA. The RNA was reverse transcribed in the presence of 1mM oligo(dT) primer and 4U Omniscript



RTase (Omniscript RT Kit; Qiagen, Mississauga, ON Canada), 0.25mM dideoxy-nucleotide triphosphate (dNTP) mix, and 19.33U RNase Inhibitor (Amersham Biosciences, QC Canada) in a volume of 20 $\mu$ l at 37°C for 1h. The reaction was terminated by incubation at 93°C for 3min. Real-time PCR was conducted in an ABI Prism 7300 instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA) in 25 $\mu$ l of reaction volume containing 12.5 $\mu$ l of 2X Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 9.5 $\mu$ l of water, 1 $\mu$ l of each sample cDNA and bovine-specific primers for amplifying histone 2A (sense: 5'-GAGGAGCTGAACAAGCTGTTG-3', antisense: 5'-TTGTGGTGGCTCTCAGTCTTC-3'), CYP19 (sense: 5'-CTGAAGCAACAGGAGTCCTAAATGTACA 3', antisense: 5'-AATGAGGGGCCCAATTCCCAGA-3', [26] ), iNOS (sense: 5'-GGTGAAGCAGTAACAAAGGA-3', anti-sense: 5'-GACCTGATGTTGCCGTTGTTG-3') and eNOS (sense: 5'-CCTCACCGCTACAATATCCT-3', anti-sense: 5'-TGCTCGTTGTCCAGGTGCTTC-3';[27] ) and FasL (sense: 5'-AGCCAAAGGCATAC -3', antisense: 5'-TGCCTGTAAATGA-3'). A common thermal cycling parameter (3min at 95°C, 40 cycles of 15s at 95°C, 30s at 60°C and 30s at 72°C) was used to amplify each transcript. Melting curve analyses were performed to verify product identity. Samples were run in duplicate and were expressed relative to histone (H2A) as housekeeping gene. Data were normalized to a calibrator sample using the  $\Delta\Delta$ Ct method with correction for amplification efficiency [28].

### *Steroid assay*

Estradiol was measured in follicular fluid and conditioned medium in duplicate by RIA as described by [29], without solvent extraction. Intra- and inter-assay coefficients of variation were 6% and 9%, respectively. The sensitivity of this assay was 10pg per tube, equivalent to 0.3ng/ $\mu$ g protein. Steroid concentrations in culture medium were corrected for cell number by expressing per unit mass of cell protein. Cells were lysed with 100 $\mu$ l of 1N NaOH for 2h and neutralized with 100 $\mu$ l of 1N HCl, and total cell protein was measured by the Bradford protein assay (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada).

### *Statistical analysis*

The in vivo data were analyzed by ANOVA with follicle group as a main effect. For the in vitro data, doses of hormones and growth factors were used as the main effects and culture replicate was included in the model as a random effect in the F-test. Data were transformed to logarithms when not normally distributed (Shapiro–Wilk test). Differences between means were tested with the Tukey–Kramer HSD test. All analyses were performed with JMP software (SAS Institute, Cary, NC). Data are presented as means $\pm$ S.E.M.

## **Results**

There was no difference in size between dominant and non-dominant follicles ( $P>0.05$ , Fig. 1A), however the status of the dominant follicle was confirmed by higher E2 concentrations ( $P<0.01$ , Fig. 1B) and by higher levels of granulosa cell CYP19 mRNA ( $P<0.05$ , Fig. 1C) compared to the non-dominant follicle. Abundance

of iNOS mRNA in granulosa cells was higher in dominant follicles than in subordinate follicles ( $P < 0.01$ , Fig. 1D), and mRNA encoding eNOS was not consistently detected (not shown).

We then investigated the regulation of iNOS mRNA abundance in granulosa cells using a non-luteinizing culture model. FSH stimulated E2 secretion from GC in vitro ( $P < 0.05$ , Fig. 2B) and upregulated iNOS mRNA abundance in a dose-dependent manner ( $P < 0.05$ , Fig. 2A). Similar effects were noticed for IGF1 ( $P < 0.01$ , Fig. 2C, D). FGF2 decreased E2 secretion and iNOS mRNA levels in IGF-treated cells ( $P < 0.05$ , Fig. 2E, F), as did EGF ( $P < 0.01$ , Fig. 2H, G).

As iNOS mRNA levels were correlated with E2 secretion, we determined if E2 had a direct effect on iNOS mRNA. First we cultured cells with graded doses of FSH with the aromatase substrate, A4, or the non-aromatizable androgen, DHT. In the presence of A4, FSH stimulated E2 secretion and iNOS mRNA levels, but in the presence of DHT, FSH failed to stimulate E2 secretion (not shown) or iNOS mRNA (Fig 3A). Further, we cultured FSH- or IGF1-stimulated cells with the E2 receptor inhibitor ICI, which resulted in a marked decrease of iNOS mRNA abundance ( $P < 0.05$ , Fig 3B).

To determine the physiological relevance of increased iNOS mRNA, we monitored iNOS enzyme activity with the fluorescent dye DAF after the addition of E2. Incubation of cells with DAF alone produced background fluorescence. Within 20 min of addition of E2, fluorescence intensity was noticeably increased, and was strong at 4 h after treatment (Fig.4). To explore the role of NO, we inhibited enzyme

activity with the iNOS-selective inhibitor, AG. Addition of AG to FSH or IGF1-treated cells had no consistent effect on steroid secretion (not shown), but increased apoptosis in IGF1-treated cells ( $P < 0.05$ , Fig 5B). The use of AG also significantly increased abundance of mRNA encoding the pro-apoptotic factor, Fas ligand ( $P < 0.05$ , Fig 5A).

## **Discussion**

Nitric oxide is an important regulator of ovarian activity in several species, including the regulation of follicular development. We demonstrated for the first time that iNOS is expressed in bovine GC and its pattern of expression is different between dominant and non-dominant follicles. In addition, we have shown for the first time that iNOS mRNA expression is regulated by FSH, growth factors and E2 in bovine GC in vitro, all factors associated with follicle development in cattle.

During the selection of a dominant follicle, several changes occur in its microenvironment before the future dominant follicle can be distinguished from the rest of cohort by size [19]. In the present study, we collected the largest and the second largest follicle from each animal that we identified as dominant and non-dominant follicle, respectively. Mean diameters were not different between these two follicle groups, but aromatase mRNA levels and E2 concentrations were different, confirming the dominance status of the follicles [20, 30]. Abundance of iNOS mRNA was significantly higher in the newly selected dominant follicle compared to the subordinate follicle. This suggests that a change in iNOS expression is a relatively early event in follicle dominance.

The emergence of a follicular wave and selection of a dominant is initiated by a transient rise in circulating FSH [31]. The in vitro data showed here demonstrate that iNOS expression is upregulated by FSH, consistent with the higher iNOS mRNA levels in dominant follicles. Studies in rats offer contradictory results; some show upregulation of iNOS mRNA in ovaries by PMSG [32], and others documented either no effect of PMSG [9] or decreased iNOS expression/activity by PMSG in vivo [11]. There is little comparable information in other species. Human granulosa-luteal cells express iNOS and eNOS [4] whereas pig granulosa cells express eNOS [7]. Regulation of NOS mRNA in GC during follicle development in these species has not been reported.

FSH is not the only factor controlling follicle development. Sustained growth of the dominant follicle is dependent on IGF1 [33], and IGF1 stimulates granulosa E2 secretion [22]. Our results show that iNOS expression was stimulated in a dose-dependent manner by IGF1. The present data also indicate a consistent correlation between E2 secretion and iNOS expression in all treatments used. Anteby *et al.* [2] measuring nitrite (NO<sub>2</sub>) and nitrate (NO<sub>3</sub>), both stable metabolites of NO in aqueous solution, found a significant positive correlation between E2 and NO in human follicles. In addition, EGF and FGF2, growth factors that inhibit E2 production [23], decreased iNOS expression.

To gain insight into the nature of the relationship between E2 and iNOS, we evaluated whether E2 directly alters iNOS mRNA levels. In the absence of an aromatisable substrate, FSH was unable to stimulate iNOS mRNA abundance, and

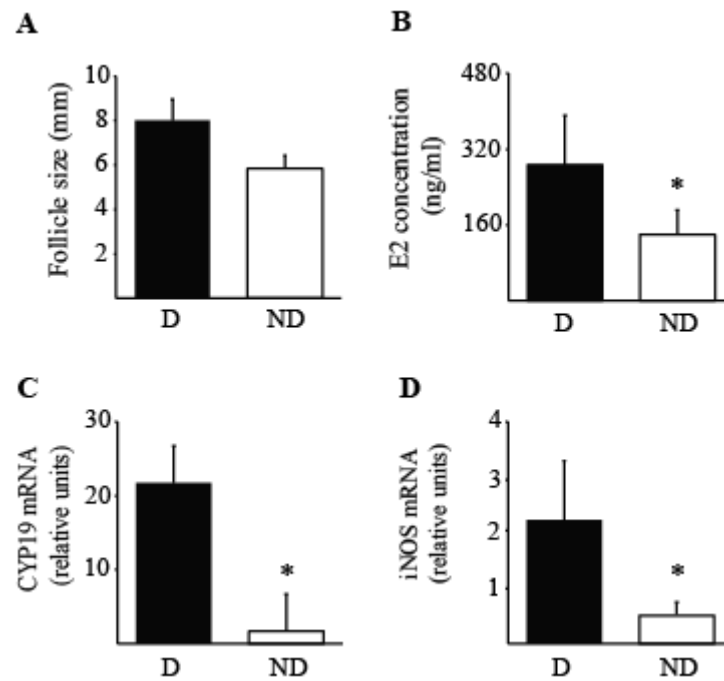
blockade of E2 receptors caused marked down-regulation of iNOS mRNA levels in FSH- and IGF1-stimulated cells. These data suggest that the effects of gonadotropins and growth factors on iNOS mRNA is mediated by E2. This is in agreement with studies in other cell types that show stimulatory effects of E2 on NOS enzyme genes [34-36]. This regulation is physiologically relevant, as E2 directly stimulated NO production in cultured granulosa cells in this study.

The function of NOS in the follicle remains to be clarified. In porcine [5], bovine [13] and human [4] GC, NO inhibited steroidogenesis. However, these data should be interpreted with caution, as NO donors have been shown to be cytotoxic [14, 37]. It has also been suggested that iNOS-derived NO in GC of rat immature follicles may prevent ovarian follicle atresia by inhibiting GC apoptosis [15]. The same anti-apoptotic property was demonstrated in rat preovulatory follicles [16]. One of the critical mediators of the apoptosis in ovarian follicle atresia is the Fas/FasL system, and [17] we demonstrated that FasL-mediated apoptosis is accompanied by a significant decrease in iNOS expression in rat GC. In the present study, inhibition of NOS activity with AG did not alter steroidogenesis, but increased the proportion of dead cells, and this was associated with increased abundance of mRNA encoding FasL. Collectively, these data are consistent with the decrease in iNOS mRNA levels observed here in subordinate follicles, whose GC undergo apoptosis as the follicle regresses. E2 is believed to promote follicle growth in the dominant follicle at least in part by inhibiting GC apoptosis [18]. The present data suggest that one mechanism by which E2 prevents GC cell apoptosis is through increased NOS activity.

In conclusion, bovine granulosa cells express predominantly iNOS, and increased iNOS mRNA levels are associated with emergence of the dominant follicle. Gonadotropic factors stimulate iNOS mRNA levels through increased estradiol secretion, and physiological levels of NOS activity may contribute to growth and survival of granulosa cells.

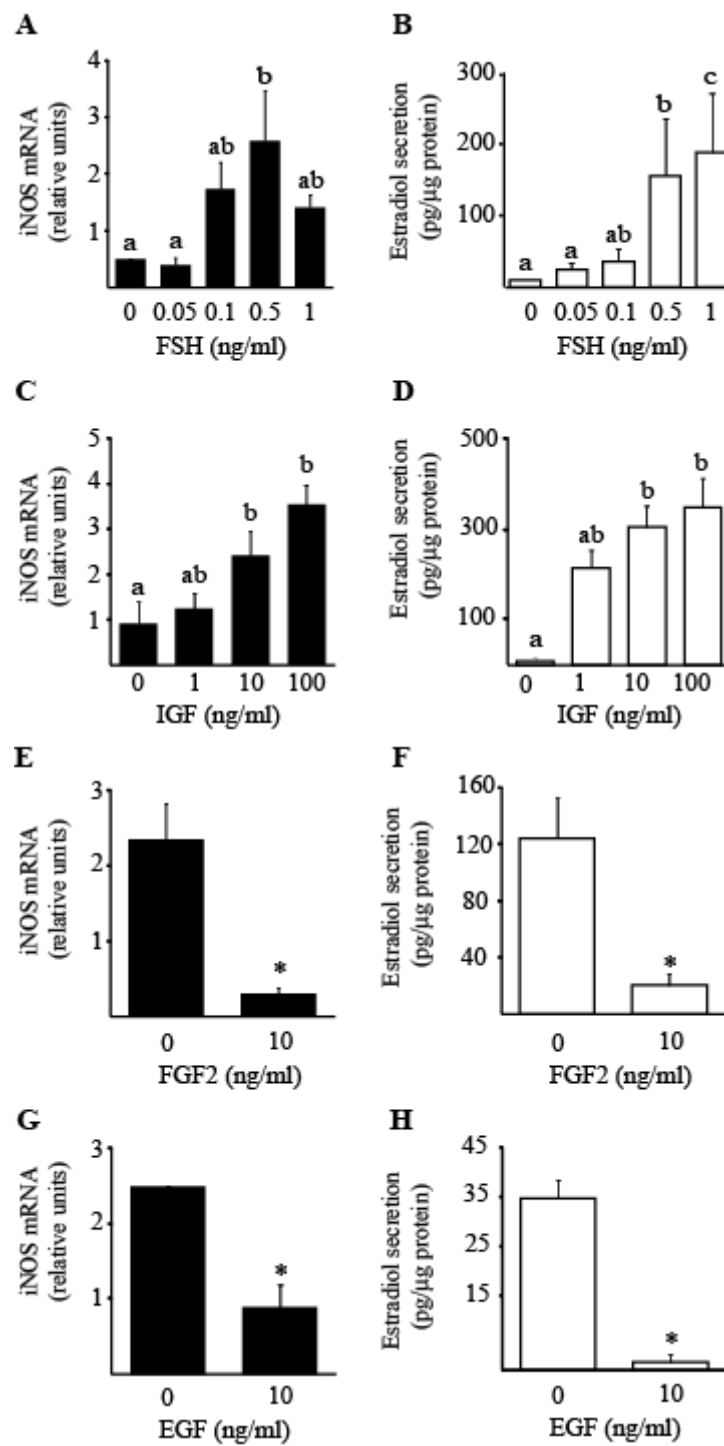
### **Acknowledgements**

This work was supported by NSERC (Canada) and CNPq (Brazil).

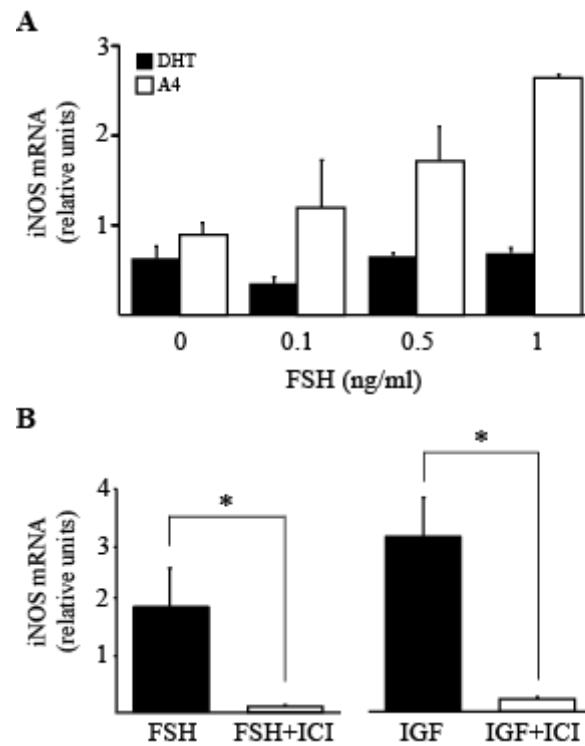


**Figure 1.** Follicle size, estradiol (E2) concentration and abundance of mRNA encoding aromatase (CYP19) and iNOS in six pairs of early dominant and non-dominant follicles. The two largest follicles were collected from cows between days 1 and 5 in the first wave of estrous cycle. The largest follicle was considered to be the early dominant. Data are means  $\pm$  SEM of six cows. Asterisks denote differences between dominant and non-dominant follicles ( $P < 0.05$ ).

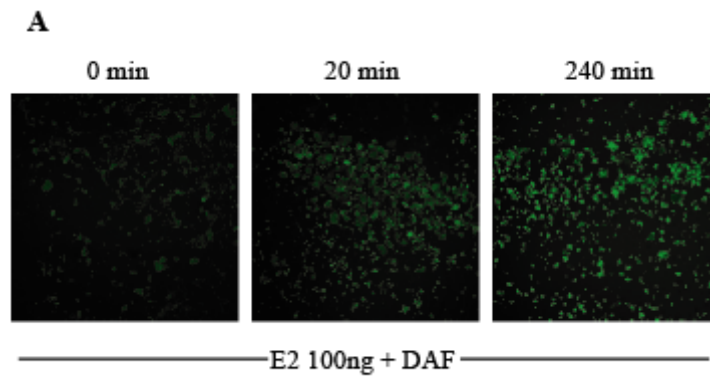




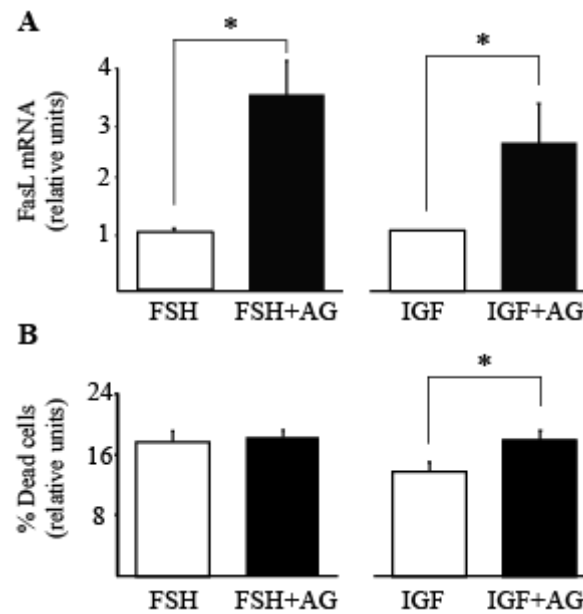
**Figure 2.** Effect of hormones and growth factors on abundance of iNOS mRNA and estradiol secretion from granulosa cells in vitro. Cells were cultured for 6 days under non-luteinizing conditions (see Materials and Methods for details). Data are means  $\pm$  SEM of three independent cultures. Bars with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).



**Figure 3.** iNOS mRNA abundance is stimulated by estradiol. **A)** Granulosa cells were cultured for 6 days under non-luteinizing conditions with graded doses of FSH and either an aromatizable (A4) or non- aromatizable androgen (DHT). **B)** Granulosa cells were cultured in the presence of IGF1 (10ng/ml) alone or with 10 $\mu$ M of ICI, a specific estrogen receptor antagonist; and FSH (1ng/ml) alone or in the presence of ICI. Data are means  $\pm$  SEM of three independent cultures. Asterisks denote differences between treatments (P<0.05).



**Figure 4.** NO production is stimulated by estradiol (E2). Granulosa cells were cultured for 6 days in the presence of Insulin (10ng/ml). On day 6, before the addition of 100ng of E2, cells were pre-incubated for two hours in the presence of 10 $\mu$ M of DAF-FM, a fluorescent NO-sensitive dye. The images were acquired through a laser-scanning confocal microscopy on time zero for background establishment, at 20 and 240 minutes after treatment with E2.



**Figure 5.** Effect of iNOS activity on abundance of mRNA encoding the pro-apoptotic factor, Fas ligand (FasL) **(A)** and on the proportion of dead cells **(B)**. Granulosa cells were cultured with FSH (1ng/ml) alone or with 100mM of AG, an iNOS-selective inhibitor; and IGF (10ng/ml) without or with AG. The mRNA abundance was measured by real-time polymerase chain reaction and cell survival data were generated by flow cytometry. Data are means  $\pm$  SEM of three independent cultures. Asterisks denote differences between treatments ( $P < 0.05$ ).

## References

1. Masa-aki Hattori ST. Nitric oxide and ovarian function. *Animal Science Journal* 2006; 77: 275-284.
2. Anteby EY, Hurwitz A, Korach O, Revel A, Simon A, Finci-yeheskel Z, Mayer M, Laufer N. Ovary and Ovulation: Human follicular nitric oxide pathway: relationship to follicular size, oestradiol concentrations and ovarian blood flow. *Hum. Reprod.* 1996; 11: 1947-1951.
3. Bonello N, McKie K, Jasper M, Andrew L, Ross N, Braybon E, Brannstrom M, Norman RJ. Inhibition of nitric oxide: effects on interleukin-1 beta-enhanced ovulation rate, steroid hormones, and ovarian leukocyte distribution at ovulation in the rat. *Biol Reprod* 1996; 54: 436-445.
4. Van Voorhis BJ, Dunn MS, Snyder GD, Weiner CP. Nitric oxide: an autocrine regulator of human granulosa-luteal cell steroidogenesis. *Endocrinology* 1994; 135: 1799-1806.
5. Masuda M, Kubota T, Karnada S, Aso T. Nitric oxide inhibits steroidogenesis in cultured porcine granulosa cells. *Mol. Hum. Reprod.* 1997; 3: 285-292.
6. Snyder GD, Holmes RW, Bates JN, Van Voorhis BJ. Nitric oxide inhibits aromatase activity: Mechanisms of action. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 1996; 58: 63-69.
7. Grasselli F, Ponderato N, Basini G, Tamanini C. Nitric oxide synthase expression and nitric oxide/cyclic GMP pathway in swine granulosa cells. *Domestic Animal Endocrinology* 2001; 20: 241-252.
8. Ishimaru RS, Leung K, Hong L, LaPolt PS. Inhibitory effects of nitric oxide on estrogen production and cAMP levels in rat granulosa cell cultures. *J Endocrinol* 2001; 168: 249-255.
9. Jablonka-Shariff A, Olson LM. Hormonal Regulation of Nitric Oxide Synthases and Their Cell-Specific Expression during Follicular Development in the Rat Ovary. *Endocrinology* 1997; 138: 460-468.
10. Masuda M, Kubota T, Aso T. Effects of nitric oxide on steroidogenesis in porcine granulosa cells during different stages of follicular development. *Eur J Endocrinol* 2001; 144: 303-308.
11. Matsumi H, Yano T, Koji T, Ogura T, Tsutsumi O, Taketani Y, Esumi H. Expression and Localization of Inducible Nitric Oxide Synthase in the Rat Ovary: A Possible Involvement of Nitric Oxide in the Follicular Development. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998; 243: 67-72.
12. Takesue K, Hattori MA, Nishida N, Kato Y, Fujihara N. Expression of endothelial nitric oxide synthase gene in cultured porcine granulosa cells after FSH stimulation. *J Mol Endocrinol* 2001; 26: 259-265.
13. Basini G, Baratta M, Ponderato N, Bussolati S, Tamanini C. Is nitric oxide an autocrine modulator of bovine granulosa cell function? *Reproduction, Fertility and Development* 1998; 10: 471-478.
14. Faes MR, Caldas-Bussiere MC, Viana KS, Dias BL, Costa FR, Escocard RM. Nitric oxide regulates steroid synthesis by bovine antral granulosa cells in a

- chemically defined medium. *Animal Reproduction Science* 2009; 110: 222-236.
15. Matsumi H, Yano T, Osuga Y, Kugu K, Tang X, Xu JP, Yano N, Kurashima Y, Ogura T, Tsutsumi O, Koji T, Esumi H, Taketani Y. Regulation of Nitric Oxide Synthase to Promote Cytostasis in Ovarian Follicular Development. *Biol Reprod* 2000; 63: 141-146.
  16. Se-Jin Yoon K-HCK-AL. Nitric oxide-mediated inhibition of follicular apoptosis is associated with HSP70 Induction and Bax suppression. *Molecular Reproduction and Development* 2002; 61: 504-510.
  17. Chen Q, Yano T, Matsumi H, Osuga Y, Yano N, Xu J, Wada O, Koga K, Fujiwara T, Kugu K, Taketani Y. Cross-Talk between Fas/Fas Ligand System and Nitric Oxide in the Pathway Subserving Granulosa Cell Apoptosis: A Possible Regulatory Mechanism for Ovarian Follicle Atresia. *Endocrinology* 2005; 146: 808-815.
  18. Hsueh AJ, Billig H, Tsafiriri A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev* 1994; 15: 707-724.
  19. Fortune JE, Rivera GM, Yang MY. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal Reproduction Science* 2004; 82-83: 109-126.
  20. Evans ACO, Fortune JE. Selection of the Dominant Follicle in Cattle Occurs in the Absence of Differences in the Expression of Messenger Ribonucleic Acid for Gonadotropin Receptors. *Endocrinology* 1997; 138: 2963-2971.
  21. Mihm M, Baker PJ, Fleming LM, Monteiro AM, O'Shaughnessy PJ. Differentiation of the bovine dominant follicle from the cohort upregulates mRNA expression for new tissue development genes. *Reproduction* 2008; 135: 253-265.
  22. Gutierrez CG, Campbell BK, 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. *Biol Reprod* 1997; 56: 608-616.
  23. Cao M, Nicola E, Portela VM, Price CA. Regulation of serine protease inhibitor-E2 and plasminogen activator expression and secretion by follicle stimulating hormone and growth factors in non-luteinizing bovine granulosa cells in vitro. *Matrix Biology* 2006; 25: 342-354.
  24. Yi F-X, Zhang AY, Campbell WB, Zou A-P, van Breemen C, Li P-L. Simultaneous in situ monitoring of intracellular Ca<sup>2+</sup> and NO in endothelium of coronary arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: H2725-2732.
  25. Blondin P, Dufour M, Sirard MA. Analysis of atresia in bovine follicles using different methods: flow cytometry, enzyme-linked immunosorbent assay, and classic histology. *Biol Reprod* 1996; 54: 631-637.
  26. Mélanie Hamel JVESNCAP. Androstenedione increases cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid transcripts in nonluteinizing bovine granulosa cells. *Molecular Reproduction and Development* 2005; 70: 175-183.
  27. Tesfaye D, Kadanga A, Rings F, Bauch K, Jennen D, Nganvongpanit K, Holker M, Tholen E, Ponsuksili S, Wimmers K, Montag M, Gilles M, Kirfel G,

- Herzog V, Schellander K. The Effect of Nitric Oxide Inhibition and Temporal Expression Patterns of the mRNA and Protein Products of Nitric Oxide Synthase Genes During In Vitro Development of Bovine Pre-implantation Embryos. *Reproduction in Domestic Animals* 2006; 41: 501-509.
28. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl. Acids Res.* 2001; 29: e45-.
  29. Belanger A, Couture J, Caron S, Roy R. Determination of Nonconjugated and Conjugated Steroid Levels in Plasma and Prostate after Separation on C-18 Columns. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1990; 595: 251-259.
  30. Badinga L, Driancourt MA, Savio JD, Wolfenson D, Drost M, De La Sota RL, Thatcher WW. Endocrine and ovarian responses associated with the first-wave dominant follicle in cattle. *Biol Reprod* 1992; 47: 871-883.
  31. Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JC, Ginther OJ. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil* 1992; 94: 177-188.
  32. Faletti A, Perez Martinez S, Perotti C, de Gimeno MAF. Activity of Ovarian Nitric Oxide Synthase (NOs) during Ovulatory Process in the Rat: Relationship with Prostaglandins (PGs) Production. *Nitric Oxide* 1999; 3: 340-347.
  33. Beg MA, Bergfelt DR, Kot K, Ginther OJ. Follicle Selection in Cattle: Dynamics of Follicular Fluid Factors During Development of Follicle Dominance. *Biol Reprod* 2002; 66: 120-126.
  34. Ogando D, Farina M, Ribeiro ML, Martinez SP, Cella M, Rettori V, Franchi A. Steroid hormones augment nitric oxide synthase activity and expression in rat uterus. *Reproduction, Fertility and Development* 2003; 15: 269-274.
  35. Lapointe J, Roy M, St-Pierre I, Kimmins S, Gauvreau D, MacLaren LA, Bilodeau J-F. Hormonal and Spatial Regulation of Nitric Oxide Synthases (NOS) (Neuronal NOS, Inducible NOS, and Endothelial NOS) in the Oviducts. *Endocrinology* 2006; 147: 5600-5610.
  36. Karpuzoglu E, Fenaux JB, Phillips RA, Lengi AJ, Elvinger F, Ansar Ahmed S. Estrogen Up-Regulates Inducible Nitric Oxide Synthase, Nitric Oxide, and Cyclooxygenase-2 in Splenocytes Activated with T Cell Stimulants: Role of Interferon- $\gamma$ . *Endocrinology* 2006; 147: 662-671.
  37. Viana KS, Caldas-Bussiere MC, Matta SGC, Faes MR, Paes de Carvalho CS, Quirino CR. Effect of sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, on the in vitro maturation of bovine oocytes. *Animal Reproduction Science* 2007; 102: 217-227.



#### **4. CONCLUSÃO**

Concluindo, células da granulosa bovina expressam predominantemente iNOS, sendo que o aumento da expressão dessa isoforma está associado com a emergência do folículo dominante. O FSH e outros peptídeos intra-ovarianos que atuam no controle do desenvolvimento folicular, como o IGF1, FGF2 e EGF, regulam os níveis de RNAm para a iNOS através do estímulo ou inibição da secreção de E2. Portanto, níveis fisiológicos da atividade das NOS podem contribuir para o crescimento e sobrevivência das células da granulosa bovina.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G. P., et al. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 94, n. 1, p. 177-188, 1992.

ANTEBY, E. Y., et al. Ovary and ovulation: human follicular nitric oxide pathway: relationship to follicular size, oestradiol concentrations and ovarian blood flow. **Human Reproduction**, v. 11, n. 9, p. 1947-1951, 1996.

BADINGA, L., et al. Endocrine and ovarian responses associated with the first-wave dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 47, n. 5, p. 871-883, 1992.

BASINI, G., et al. Is nitric oxide an autocrine modulator of bovine granulosa cell function? **Reproduction, Fertility and Development**, v. 10, n. 6, p. 471-478, 1998.

BASINI, G., et al. Lipid hydroperoxide and cGMP are not involved in nitric oxide inhibition of steroidogenesis in bovine granulosa cells. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 12, n. 6, p. 289-295, 2000.

BASINI, G.; TAMANINI, C. Interrelationship between nitric oxide and prostaglandins in bovine granulosa cells. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 66, n. 3, p. 179-202, 2001.

BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. **Reproduction**, v. 132, n. 3, p. 365-377, 2006.

BILODEAU-GOESEELS, S. Effects of manipulating the nitric oxide/cyclic GMP pathway on bovine oocyte meiotic resumption in vitro. **Theriogenology**, v. 68, n. 5, p. 693-701, 2007.

BLASHKIV, T.V., et al. Role of nitric oxide in ovulation, meiotic maturation of oocytes, and implantation in mice. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 132, p. 1034-1036, 2001.

BONELLO, N., et al. Inhibition of nitric oxide: effects on interleukin-1 beta-enhanced ovulation rate, steroid hormones, and ovarian leukocyte distribution at ovulation in the rat. **Biology of Reproduction**, v. 54, n. 2, p. 436-445, 1996.

BU, S., et al. Nitric oxide influences the maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes cultured in spontaneous maturation medium and hypoxanthine-supplemented medium through different signaling pathways. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 223, n. 1-2, p. 85-93, 2004.

CAO, M., et al. Regulation of serine protease inhibitor-E2 and plasminogen activator expression and secretion by follicle stimulating hormone and growth factors in non-luteinizing bovine granulosa cells in vitro. **Matrix Biology**, v. 25, n. 6, p. 342-354, 2006.

CHEN, Q., et al. Cross-talk between fas/fas ligand system and nitric oxide in the pathway subserving granulosa cell apoptosis: a possible regulatory mechanism for ovarian follicle atresia. **Endocrinology**, v. 146, n. 2, p. 808-815, 2005.

CHO, H. J., et al. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. **Journal of Experimental Medicine**, v. 176, n. 2, p. 599-604, 1992.

CHUN, S.-Y.; HSUEH, A. J. W. Paracrine mechanisms of ovarian follicle apoptosis. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 39, n. 1-2, p. 63-75, 1998.

CHUN, S. Y., et al. Interleukin-1 beta suppresses apoptosis in rat ovarian follicles by increasing nitric oxide production. **Endocrinology**, v. 136, n. 7, p. 3120-3127, 1995.

CHUNG, H.-T., et al. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 282, n. 5, p. 1075-1079, 2001.

ELLMAN, C., et al. Nitric oxide mediates interleukin-1-induced cellular cytotoxicity in the rat ovary: a potential role for nitric oxide in the ovulatory process. **Journal of Clinical Investigation**, v.92, p.3053-3056, 1993.

ENGELS, K., et al. NO signaling confers cytoprotectivity through the survivin network in ovarian carcinomas. **Cancer Research**, v. 68, n. 13, p. 5159-5166, 2008.

FAES, M. R., et al. Nitric oxide regulates steroid synthesis by bovine antral granulosa cells in a chemically defined medium. **Animal Reproduction Science**, v. 110, n. 3-4, p. 222-236, 2009.

FALETTI, A., et al. Activity of ovarian nitric oxide synthase (nos) during ovulatory process in the rat: relationship with prostaglandins (PGs) production. **Nitric Oxide**, v. 3, n. 4, p. 340-347, 1999.

FORSTERMANN, U., et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. **Hypertension**, v. 23, n. 6, p. 1121-1131, 1994.

FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, v. 50, n. 2, p. 225-232, 1994.

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; YANG, M. Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 109-126, 2004.

GELLER, D. A., et al. Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 8, p. 3491-3495, 1993.

GHAFOURIFAR, P.; RICHTER, C. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. **FEBS Letters**, v. 418, n. 3, p. 291-296, 1997.

GIBBONS, J. R.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the follicle-stimulating hormone surge in heifers. **Biol Reprod**, v. 57, n. 5, p. 1066-1073, 1997.

GINTHER, O. J., et al. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v. 48, n. 1, p. 75-87, 1997.

GLISTER, C., et al. Interactions between follicle-stimulating hormone and growth factors in modulating secretion of steroids and inhibin-related peptides by nonluteinized bovine granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 4, p. 1020-1028, 2001.

GRASSELLI, F., et al. Nitric oxide synthase expression and nitric oxide/cyclic GMP pathway in swine granulosa cells. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 20, n. 4, p. 241-252, 2001.

GUIX, F. X. et al. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Progress in Neurobiology**, v. 76, n. 2, p. 126-152, 2005.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-776, 2000.

HSUEH, A. J.; BILLIG, H.; TSAFRIRI, A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. **Endocrine Reviews**, v. 15, n. 6, p. 707-724, 1994.

HU, C.-L., et al. Apoptosis of bovine granulosa cells after serum withdrawal is mediated by Fas antigen (CD95) and Fas ligand. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 2, p. 518-526, 2001.

HUANG, H., et al. Expression of cardiac cytokines and inducible form of nitric oxide synthase (NOS2) in Trypanosoma cruzi-infected Mice. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 31, n. 1, p. 75-88, 1999.

HUO, L.-J., et al. Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide regulates germinal vesicle breakdown and first polar body emission in the mouse oocyte. **Reproduction**, v. 129, n. 4, p. 403-409, 2005.

IGNARRO, L. J. Nitric Oxide: Biology and Pathobiology. 1. ed. San Diego, USA: Academic Press, 2000. v. 1.

IGNARRO, L. J., et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 24, p. 9265-9269, 1987.

ISHIMARU, R. S., et al. Inhibitory effects of nitric oxide on estrogen production and cAMP levels in rat granulosa cell cultures. **Journal of Endocrinology**, v. 168, n. 2, p. 249-255, 2001.

JABLONKA-SHARIFF, A.; OLSON, L. M. Hormonal regulation of nitric oxide synthases and their cell-specific expression during follicular development in the rat ovary. **Endocrinology**, v. 138, n. 1, p. 460-468, 1997.

JAROSZEWSKI, J. J.; SKARZYNSKI, D. J.; HANSEL, W. Nitric oxide as a local mediator of prostaglandin F<sub>2</sub>{alpha}-induced regression in bovine corpus luteum: an in vivo study. **Experimental Biology and Medicine**, v. 228, n. 9, p. 1057-1062, 2003.

JEE, B.C., et al. The Role of Nitric Oxide on Apoptosis in Human Luteinized Granulosa Cells. **Gynecologic and obstetric investigation**, v.56, p.143-147, 2003.

KAGABU, S., et al. Inhibitory effects of nitric oxide on the expression and activity of aromatase in human granulosa cells. **Molecular Human Reproduction**, v. 5, n. 5, p. 396-401, 1999.

LACZA, Z., et al. Mitochondrial nitric oxide synthase is not eNOS, nNOS or iNOS. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, n. 10, p. 1217-1228, 2003.

LIU, X., et al. DFF, a Heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. **Cell**, v. 89, n. 2, p. 175-184, 1997.

MASA-AKI HATTORI, S. T. Nitric oxide and ovarian function. **Animal Science Journal**, v. 77, n. 3, p. 275-284, 2006.

MASUDA, M.; KUBOTA, T.; ASO, T. Effects of nitric oxide on steroidogenesis in porcine granulosa cells during different stages of follicular development. **European Journal of Endocrinology**, v. 144, n. 3, p. 303-308, 2001.

MASUDA, M., et al. Nitric oxide inhibits steroidogenesis in cultured porcine granulosa cells. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, n. 4, p. 285-292, 1997.

MATSUMI, H. et al. Expression and localization of inducible nitric oxide synthase in the rat ovary: a possible involvement of nitric oxide in the follicular development. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 243, n. 1, p. 67-72, 1998.

MATSUMI, H. et al. Regulation of nitric oxide synthase to promote cytotaxis in ovarian follicular development. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 1, p. 141-146, 2000.

MATTA, S. G. C., et al. Effect of inhibition of synthesis of inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide by aminoguanidine on the in vitro maturation of oocyte-cumulus complexes of cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 111, n. 2-4, p. 189-201, 2009.

MITSUBE, K., et al. Effects of a nitric oxide donor and nitric oxide synthase inhibitors on luteinizing hormone-induced ovulation in the ex-vivo perfused rat ovary. **Human Reproduction**, v. 14, n. 10, p. 2537-2543, 1999.

MOTTA, A. B., et al. Regulation of lipid peroxidation by nitric oxide and PGF<sub>2</sub>α during luteal regression in rats. **Reproduction**, v. 121, n. 4, p. 631-637, 2001.

MOTTA, A. B.; FRANCHI, A. M.; GIMENO, M. F. Role of nitric oxide on uterine and ovarian prostaglandin synthesis during luteolysis in the rat. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 56, n. 4, p. 265-269, 1997.

NISHIKIMI, A., et al. Localization of nitric oxide synthase activity in unfertilized oocytes and fertilized embryos during preimplantation development in mice. **Reproduction**, v. 122, n. 6, p. 957-963, 2001.

OLSON, L. M.; JONES-BURTON, C. M.; JABLONKA-SHARIFF, A. Nitric oxide decreases estradiol synthesis of rat luteinized ovarian cells: possible role for nitric oxide in functional luteal regression. **Endocrinology**, v. 137, n. 8, p. 3531-3539, 1996.

PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, n. 6122, p. 524-526, 1987.

PORTER, D. A., et al. Susceptibility of ovarian granulosa cells to apoptosis differs in cells isolated before or after the preovulatory LH surge. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 176, n. 1-2, p. 13-20, 2001.

PORTER, D. A., et al. Expression and Function of Fas antigen vary in bovine granulosa and theca cells during ovarian follicular development and atresia. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 1, p. 62-66, 2000.

QUIRK, S. M.; COWAN, R. G.; HARMAN, R. M. The susceptibility of granulosa cells to apoptosis is influenced by oestradiol and the cell cycle. **Journal of Endocrinology**, v. 189, n. 3, p. 441-453, 2006.

QUIRK, S. M.; HARMAN, R. M.; COWAN, R. G. Regulation of Fas Antigen (Fas, CD95)-mediated apoptosis of bovine granulosa cells by serum and growth factors. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 5, p. 1278-1284, 2000.

RICCIARDOLO, F. L. M., et al. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 3, p. 731-765, 2004.

RIVERA, G. M.; FORTUNE, J. E. Selection of the dominant follicle and insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: evidence that pregnancy-associated plasma protein a contributes to proteolysis of IGF-binding protein 5 in bovine follicular fluid. **Endocrinology**, v. 144, n. 2, p. 437-446, 2003.

ROSSELLI, M.; KELLER, R. J.; DUBEY, R. K. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. **Human Reproduction Update**, v. 4, n. 1, p. 3-24, 1998.

SALERNO, J. C., et al. An autoinhibitory control element defines calcium-regulated isoforms of nitric oxide synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 47, p. 29769-29777, 1997.

SALVEMINI, D. Regulation of cyclooxygenase enzymes by nitric oxide. **Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)**, v. 53, n. 7, p. 576-582, 1997.

SE-JIN YOON, K.-H. C. K.-A. L. Nitric oxide-mediated inhibition of follicular apoptosis is associated with HSP70 Induction and Bax suppression. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n. 4, p. 504-510, 2002.

SIROIS, J., et al. Cyclooxygenase-2 and its role in ovulation: a 2004 account. **Human Reproduction Update**, v. 10, n. 5, p. 373-385, 2004.

SISCO, B., et al. Isolation of genes differentially expressed in dominant and subordinate bovine follicles. **Endocrinology**, v. 144, n. 9, p. 3904-3913, 2003.

SKARZYNSKI, D. J., et al. Administration of a nitric oxide synthase inhibitor counteracts prostaglandin F<sub>2</sub>-induced luteolysis in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 5, p. 1674-1681, 2003.

SKARZYNSKI, D. J.; JAROSZEWSKI, J. J.; OKUDA, K. Role of tumor necrosis factor-[alpha] and nitric oxide in luteolysis in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, n. 2, p. 340-346, 2005.

SKARZYNSKI, D. J.; KOBAYASHI, S.; OKUDA, K. Influence of nitric oxide and noradrenaline on prostaglandin F<sub>2</sub>{alpha}-induced oxytocin secretion and intracellular calcium mobilization in cultured bovine luteal cells. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 4, p. 1000-1005, 2000.



SNYDER, G. D., et al. Nitric oxide inhibits aromatase activity: mechanisms of action. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 58, n. 1, p. 63-69, 1996.

SPICER, L. J. Proteolytic degradation of insulin-like growth factor binding proteins by ovarian follicles: a control mechanism for selection of dominant follicles. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 5, p. 1223-1230, 2004.

STADLER, J., et al. Inhibition of cytochromes P4501A by nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 9, p. 3559-3563, 1994.

STAMLER, J. S.; MEISSNER, G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 1, p. 209-237, 2001.

STUEHR, D. J. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 37, n. 1, p. 339-359, 1997.

STUEHR, D. J.; GHOSH, S. Enzymology of nitric oxide synthases. In: MAYER, B., (Ed.). **Nitric Oxide**. Berlin, Germany: Springer, 2000. p. 33-70.

TAKESUE, K., et al. Expression of endothelial nitric oxide synthase gene in cultured porcine granulosa cells after FSH stimulation. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 26, n. 3, p. 259-265, 2001.

TAO, Y., et al. Immunohistochemical localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in porcine ovaries and effects of NO on antrum formation and oocyte meiotic maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 222, n. 1-2, p. 93-103, 2004.

TESFAYE, D., et al. The effect of nitric oxide inhibition and temporal expression patterns of the mRNA and protein products of nitric oxide synthase genes during in vitro development of bovine pre-implantation embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, n. 6, p. 501-509, 2006.

TETSUKA, T.; BAIER, L. D.; MORRISON, A. R. Antioxidants inhibit interleukin-1-induced cyclooxygenase and nitric-oxide synthase expression in rat mesangial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 20, p. 11689-11693, 1996.

TILLY, J. L., et al. Apoptosis in atretic ovarian follicles is associated with selective decreases in messenger ribonucleic acid transcripts for gonadotropin receptors and cytochrome P450 aromatase. **Endocrinology**, v. 131, n. 4, p. 1670-1676, 1992.

VAN VOORHIS, B. J., et al. Nitric oxide: an autocrine regulator of human granulosa-luteal cell steroidogenesis. **Endocrinology**, v. 135, n. 5, p. 1799-1806, 1994.

VAN VOORHIS, B. J., et al. Expression and localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in the rat ovary. Effects of gonadotropin stimulation in vivo. **Journal of Clinical Investigation**, v.96, p.2719–2726, 1995.

VAN WEZEL, I. L., et al. Evidence for alternative pathways of granulosa cell death in healthy and slightly atretic bovine antral follicles. **Endocrinology**, v. 140, n. 6, p. 2602-2612, 1999.

VIANA, K. S., et al. Effect of sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, on the in vitro maturation of bovine oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 102, n. 3-4, p. 217-227, 2007.

WANDJI, S. A.; EPPIG, J. J.; FORTUNE, J. E. FSH and growth factors affect the growth and endocrine function in vitro of granulosa cells of bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v. 45, n. 4, p. 817-832, 1996.

WEI, X.-Q., et al. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Nature**, v. 375, n. 6530, p. 408-411, 1995.

YAMAUCHI, J., et al. Effects of nitric oxide on ovulation and ovarian steroidogenesis and prostaglandin production in the rabbit. **Endocrinology**, v. 138, n. 9, p. 3630-3637, 1997.

YANG, M. Y.; RAJAMAHENDRAN, R. Morphological and biochemical identification of apoptosis in small, medium, and large bovine follicles and the effects of follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on spontaneous apoptosis in cultured bovine granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 5, p. 1209-1217, 2000.