

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

Peptídeos Natriuréticos e Angiotensina-(1-7) durante o  
processo de ovulação em bovinos

**TESE DE DOUTORADO**

**Joabel Tonello dos Santos**

Santa Maria, RS, Brasil  
2015

# **PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS E ANGIOTENSINA-(1-7) DURANTE O PROCESSO DE OVULAÇÃO EM BOVINOS**

**Joabel Tonellotto dos Santos**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado 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  
**Doutor em Medicina Veterinária**

Orientador: Prof. Paulo Bayard Dias Gonçalves

Santa Maria, RS, Brasil

2015

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

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado**

**PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS E ANGIOTENSINA-(1-7) DURANTE O  
PROCESSO DE OVULAÇÃO EM BOVINOS**

**Elaborada por  
Joabel Tonellotto dos Santos**

**Como requisito parcial para obtenção do grau de  
Doutor em Medicina Veterinária**

**Comissão Examinadora**

**Paulo Bayard Dias Gonçalves, PhD (UFSM)  
(Presidente/Orientador)**

**Alfredo Quites Antoniazzi, Dr (UFSM)**

**Fernando Silveira Mesquita, PhD (UNIPAMPA)**

**Marcos Henrique Barreta, Dr (UFSC)**

**Mateus José Sudano, Dr (UNIPAMPA)**

**Santa Maria, 20 de fevereiro de 2015**

## **DEDICATÓRIA**

Presto minha homenagem ao professor João Francisco Coelho de Oliveira (*in memoriam*). Além de todos os ensinamentos, dedicação, honestidade e amizade como co-orientador ao longo desses anos de convivência, ficarão para sempre os momentos alegres, a leveza no dia a dia e sua figura “humana” como exemplos a serem seguidos.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida.

À minha família, em especial meus pais (Avelino e Judite), meus irmãos (Adriana e Edegar) e a minha namorada (Francini), pelo apoio incondicional e que souberam lidar com minha ausência para que eu pudesse alcançar meus objetivos e seguir a profissão que escolhi.

Aos meus orientadores durante a vida acadêmica.

Aos colegas do Biorep, pela amizade, apoio, companheirismo e pelo excelente convívio ao longo da minha formação. Em especial aos principais “parceiros” de experimento.

A UFSM pela oportunidade e formação acadêmica.

A UNIPAMPA, na figura dos professores, alunos e servidores pelo apoio e confiança durante o período em que fui professor substituto.

À CAPES e ao CNPq pela bolsa e apoio financeiro para realização dos experimentos.

À Estância Boa Vista da Quinta LTDA e Fazenda do Leão pela disponibilidade dos animais e estrutura para os experimentos. Sem eles, a realização do presente trabalho não seria possível.

Aos meus amigos

Enfim, a todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

### **PEPTÍDEOS NATRIURÉTICOS E ANGIOTENSINA-(1-7) DURANTE O PROCESSO DE OVULAÇÃO EM BOVINOS**

AUTOR: JOABEL TONELLOTTO DOS SANTOS

ORIENTADOR: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 20 de Fevereiro de 2015.

A ovulação é controlada por uma complexa e dinâmica interação de fatores, incluindo mecanismos endócrinos e vasoativos, mensageiros celulares e enzimas ativadoras. Fatores produzidos localmente exercem papel essencial durante o período ovulatório. Alguns peptídeos como Angiotensina II (AngII) e os Peptídeos Natriuréticos (NPs) têm se destacado na regulação local das funções reprodutivas, além de suas atividades sistêmicas. Ao contrário da AngII, a função da Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] ainda não está caracterizada no ovário de espécies monovulatórias, como o bovino. No primeiro estudo foi avaliado o efeito da Ang-(1-7) e de seu receptor (MAS) na regulação da ovulação. Para isso foi realizada a suplementação com Ang-(1-7) ou bloqueio de seu receptor, em células da granulosa cultivadas *in vitro*, sobre a expressão de RNAm para epirregulina (EREG – marcador inicial do processo de ovulação). Utilizando um modelo *in vivo*, foi realizada a injeção intrafolicular do inibidor do receptor MAS (A-779) para avaliar a taxa de ovulação. Os resultados demonstraram que a Ang-(1-7) e o inibidor A-779 quando em cultivo *in vitro*, não foram capazes de regular a expressão de RNAm para EREG. Da mesma forma que injeção intrafolicular de A-779 não inibiu o processo ovulatório, indicando que a Ang-(1-7) não possui papel relevante no início da cascata ovulatória em bovinos. No segundo estudo o objetivo foi caracterizar a expressão dos NPs, seus receptores e enzimas convertases durante a ovulação induzida a partir de GnRH/LH em bovinos. Utilizando modelo *in vivo* foram demonstrados como principais resultados a presença de vários componentes do sistema NPs durante a ovulação em bovinos, bem como um aumento na expressão de RNAm para NPPC (precursor do peptídeo natriurético tipo C) após indução da ovulação GnRH / LH em células da granulosa. Esses resultados fornecem a primeira evidência que o peptídeo natriurético tipo C (NPC) é regulado positivamente pelo LH e pode estar envolvido na ovulação e luteinização de bovinos. O terceiro estudo foi realizado para responder como ocorre a regulação do RNAm para NPPC pelo LH, se essa regulação é via receptor de EGF (EGF-R). Além disso, avaliamos se o NPC regula genes da cascata ovulatória e se o bloqueio EGF-R é capaz de alterar a taxa de ovulação. Para isso foram utilizados modelos *in vitro* de cultivo de células da granulosa de folículos grandes (> 12 mm) e modelos *in vivo* para estudo da ovulação aliados à injeção intrafolicular com ovariectomia em momentos estratégicos e/ou dinâmica folicular. Nossos principais resultados foram: NPC não regula a expressão de RNAm para anfirregulina (AREG) e EREG *in vitro*; RNAm para NPPC é regulado via EGF-R porém o bloqueio de EGF-R não foi capaz de alterar a taxa de ovulação em bovinos. Estes resultados sugerem que a regulação e função dos NPs durante a ovulação pode diferir entre espécies mono e multiovulatórias.

**Palavras chave:** Bovinos, granulosa, A-779, Receptor MAS, NPPC, EGF-R.

## ABSTRACT

Doctoral Thesis  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

### NATRIURETIC PEPTIDES AND ANGIOTENSIN- (1-7) DURING OVULATION IN CATTLE

AUTHOR: JOABEL TONELLOTTO DOS SANTOS

ADVISOR: PAULO BAYARD DIAS GONÇALVES

Santa Maria, February 20<sup>th</sup>, 2015.

Ovulation is controlled by a complex and dynamic interaction of factors, including endocrine and vasoactive mechanisms, cellular messengers and activating enzymes. It is well established that locally produced factors exert pivotal roles during ovulation. Some peptides such as angiotensin II (Ang II) and Natriuretic Peptides (NPs) have been prominent in local regulation of reproductive functions of mammals, beyond its systemic activities. Unlike angiotensin II (AngII), the role of angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] has not been characterized in the ovary of mono-ovulatory species. In the first study, was evaluated the effect of Ang-(1-7) and its receptor (MAS) in the regulation of the ovulatory cascade. For this we used an *in vitro* model of supplementation with Ang- (1-7) or blocking its receptor on EREG mRNA expression in granulosa cells. Using an *in vivo* model, the intrafollicular injection of Ang-(1-7) antagonist (A-779 - MAS receptor inhibitor) was performed to evaluate the ovulation rate. Results showed that the Ang- (1-7) and A-779 inhibitor when *in vitro* culture, were not able to regulate to EREG mRNA expression. Likewise, the intrafollicular injection of A-779 did not block ovulation before the expected time of LH peak, suggesting that Ang-(1-7) has no role in the early ovulatory cascade in cattle. In the second experiment, the aim was to evaluate the pattern of mRNA expression in bovine granulosa cells for the Natriuretic Peptides Precursors (NPPs), receptors (NPRs) and key enzymes of this system after GnRH-induced ovulation *in vivo*. Using *in vivo* model main results have been shown the presence of several components of NPs system during ovulation in cattle, as well as increased mRNA expression for NPPC (natriuretic peptide precursor C) in granulosa cells after induction of ovulation with GnRH / LH. These results provide the first evidence that the C-type natriuretic peptide (NPC) is upregulated by LH and may be involved in ovulation and bovine luteinizing. Third study was conducted to answer like LH controls the mRNA expression for NPPC if this is up-regulated through EGF receptor (EGF-R). Moreover, we evaluated if the NPC regulates genes in ovulatory cascade and blockade EGF-R is capable of altering ovulation rate. For this we used an *in vitro* model of granulosa cell culture from large follicles (> 12 mm) and *in vivo* models to study ovulation, combined with intrafollicular injection and follicular dynamics and / or ovariectomy at strategic times. Our main results were: NPC does not regulate mRNA expression for amphiregulin (AREG) and EREG *in vitro*; NPPC mRNA coding is regulated by EGF-R but block EGF-R was not able to change the ovulation rate in bovines. These results suggest that the regulation and function of NPs during ovulation may differ between monovular and polyovular species.

**Keywords:** Bovine, granulosa, A-779, MAS receptor, NPPC, EGF-R.

## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO 1

Figura 1- Detecção proteica do receptor MAS em fragmento ovariano e células da granulosa isoladas de folículo pré-ovulatório (15mm) bovino (A). Note que a foto do gel foi cortada, tendo em vista que as amostras não relacionadas com o presente experimento foram retiradas para melhor representação dos resultados. Expressão relativa de RNAm (média  $\pm$  erro padrão da média) para epirregulina (EREG) em células da granulosa tratadas com diferentes doses de Ang-(1-7) (B) e A-779 (C). Letras diferentes representam diferença estatística entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ). ..... 29

### ARTIGO 2

Figure 1- Concentration of Estradiol (A) and Progesterone (P4- B; ng/ml mean  $\pm$  standard error of mean; n= at least 5-6/time point) in follicular fluid obtained from preovulatory follicles at 0, 3, 6, 12, or 24 h after GnRH analogue challenge. Different letters represent statistical difference ( $P < 0.05$ ) ..... 45

Figure 2- Relative mRNA expression (mean  $\pm$  standard error of mean) of NPPA (A), NPPC (B), CORIN (C) and FURIN (D) in granulosa cells at different times after application of GnRH. Different letters represent statistical difference ( $P < 0.05$ ) ..... 46

Figure 3- Relative mRNA expression (mean  $\pm$  standard error of mean) of NPR-1 (A), NPR-2 (B) and NPR-3 (C) in granulosa cells at different times after application of GnRH. Different letters represent statistical difference ( $P < 0.05$ ) ..... 47

### ARTIGO 3

Figura 1- Expressão relativa de RNAm (média  $\pm$  erro padrão da média) para AREG (A) e AREG (B) em células da granulosa obtidas após 0, 3, 6, 12 e 24 h (n= 5/6 animais por tempo) após tratamento com GnRH para a indução do pico de LH. Expressão de RNAm de AREG (C) e EREG (D) APÓS 6 h de cultivo em células da granulosa tratadas com e sem LH (400 ng/ml) combinado ou não ao NPC. Diferentes letras indicam diferença estatística ( $P < 0.05$ ) ..... 68

Figura 2- Expressão relativa de RNAm (média  $\pm$  erro padrão da média) para NPPC (A), NPR-2 (B) e NPR-3 (C) em células da granulosa tratadas com LH (400ng/ml) e com inibidor de EGF-R (AG1478 0,5 e 5 $\mu$ M) após 6 h de cultivo. Diferentes letras indicam diferença estatística ( $P < 0.05$ ) ..... 69

Figura 3- Expressão relativa de RNAm (média  $\pm$  erro padrão da média) para NPPC (A), NPR-2 (B) e NPR-3 (C) em células da granulosa tratadas com LH (400ng/ml) e com inibidor de EGF-R (AG1478 0,5 e 5 $\mu$ M) após 6 h de cultivo. Diferentes letras indicam diferença estatística ( $P < 0.05$ ) ..... 70



## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 2

Table 1- Primers used in the expression analysis of candidate genes. Primer sequences and concentrations used to amplify each product are described ..... 44

### ARTIGO 3

Tabela 1 - Sequencia e concentração dos *primers* usados na análise de expressão dos genes candidatos ..... 67

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>ARTIGO 1</b> .....	<b>13</b>
Resumo .....	14
Abstract .....	15
Introdução .....	15
Material e métodos .....	17
Resultados .....	21
Discussão .....	22
Conclusão .....	24
Referências .....	24
<b>ARTIGO 2</b> .....	<b>30</b>
Abstract .....	31
Introduction.....	32
Material and method .....	33
Results.....	35
Discussion.....	36
References .....	41
<b>ARTIGO 3</b> .....	<b>48</b>
Resumo .....	49
Abstract .....	50
Introdução.....	50
Material e métodos .....	53
Resultados .....	56
Discussão .....	58
Conclusão .....	61
Referências .....	61
<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>71</b>
<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>76</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>77</b>

## INTRODUÇÃO

Atualmente o agronegócio é um dos principais setores da economia brasileira, tendo fundamental importância para o crescimento do país. Inserida no agronegócio temos a bovinocultura, que busca entender e aprimorar a criação de bovinos, possibilitando incrementar sua produção como fonte alimentar e/ou outras finalidades. O Brasil possui o segundo maior rebanho de bovinos, sendo este o maior rebanho comercial do mundo. Um dos principais problemas do setor pecuário é a reprodução, pois afeta diretamente a produtividade dos rebanhos sejam eles voltados para produção de carne ou leite. Por ser possuidor de aproximadamente 208 milhões de cabeças (ABIEC, 2013), o Brasil dispõe desses animais para pesquisa e demanda da utilização de biotécnicas reprodutivas como: superovulação e desenvolvimento de protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF – por exemplo), as quais têm seu sucesso intimamente relacionado ao processo ovulatório.

Tendo em vista esse vasto potencial, nosso grupo vem trabalhando há mais de 10 anos com esta espécie, tanto na pesquisa aplicada quanto básica. O modelo bovino vem sendo utilizado na identificação de fatores envolvidos na seleção folicular, maturação oocitária, ovulação e luteólise sob o mesmo ambiente endócrino, preservando a interação entre as células ovarianas (FERREIRA et al., 2007b; BARRETA et al., 2008; FERREIRA et al., 2011; SANTOS et al., 2011; GASPERIN et al., 2012; BARRETA et al., 2013; GASPERIN et al., 2014). Embora o estudo nesta área seja de grande interesse econômico além de uma possível extrapolação do conhecimento acerca da fisiologia para outras espécies monovulatórias, ainda existem diversas lacunas no conhecimento de eventos como a ovulação. Os modelos experimentais desenvolvidos em nosso laboratório nos permitem obter resultados fidedignos e representativos da fisiologia e, futuramente, para geração de tecnologia. O modelo de injeção intrafolicular aliado à dinâmica folicular e à ovariectomia em momentos estratégicos, nos permite determinar a expressão de diferentes fatores e seus receptores momentos antes, durante e após o pico de LH, por exemplo. A associação do uso de modelos *in vivo* confirmando resultados obtidos *in vitro* se torna uma importante ferramenta para elucidar mecanismos fisiológicos de sistemas locais ovarianos em eventos reprodutivos.

A importância de sistemas hormonais circulantes atuando no processo de ovulação tem sido demonstrada, entre eles o Sistema Renina-Angiotensina (RAS), que sugere uma função local ovariana deste sistema. Resultados demonstram participação dos componentes do sistema Angiotensina II (AngII) durante o processo de ovulação em bovinos (FERREIRA et

al., 2007a). No entanto, alguns trabalhos têm demonstrado que a AngII não é o único peptídeo ativo do RAS. Outros peptídeos gerados a partir da AngI e AngII, como AngIII (ZINI et al., 1996), AngIV (WRIGHT et al., 1993) e Ang-(1-7; FELIX et al., 1991), também podem mediar as ações do RAS em diferentes sistemas, especialmente a Ang-(1-7; (COSTA et al., 2003; SAMPAIO et al., 2007; LEAL et al., 2009). A presença da Ang-(1-7) tem sido demonstrada em ovários de ratas e mulheres (COSTA et al., 2003; PEREIRA et al., 2009; REIS et al., 2010). Esse mesmo grupo demonstrou ainda que as células foliculares expressam RNAm para MAS [receptor de Ang-(1-7)] e da principal enzima que cliva angiotensina II em Ang-(1-7): a enzima conversora da angiotensina 2 (ECA<sub>2</sub>) e que esse padrão de expressão é modulado nos ovários de ratas tratadas com gonadotrofina coriônica eqüina (ECG; (PEREIRA et al., 2009).

A Ang-(1-7) também foi demonstrada como um potencial regulador da esteroidogênese folicular modulando as concentrações de estradiol e progesterona ao longo do ciclo estral de ratas (COSTA et al., 2003). Em bovinos, o sistema Ang-(1-7) foi demonstrado durante o período de desenvolvimento folicular (BARRETA et al., 2013) e processo ovulatório (SANTOS et al., 2011). Apesar dos resultados apontarem uma possível ação e regulação da Ang-(1-7) na função ovariana, pouco se sabe até o momento em relação a sua função em espécies monovulares, como a bovina. Para isso, nossos objetivos no primeiro estudo foram detectar a proteína do receptor MAS nas células da granulosa de folículos pré-ovulatórios, avaliar a Ang-(1-7) é um mediador necessário durante o processo ovulatório em bovinos e determinar o efeito do bloqueio do receptor MAS sobre a taxa de ovulação induzida por GnRH *in vivo*.

Outro sistema hormonal circulante que têm se destacado na regulação local das funções reprodutivas, além de suas atividades sistêmicas são os Peptídeos Natriuréticos (NPs). A participação dos NPs na maturação, foliculogênese e ovulação tem sido estudada através de modelos animais, em sua maioria roedores. O sistema NPs consiste em três peptídeos endógenos com elevada homologia: atrial (NPA), do tipo B (NPB) e do tipo C (NPC) mais três receptores (NPR-1, 2 e 3) localizados na superfície da membrana celular (GARDNER et al., 2007; MISONO et al., 2011; POTTER, 2011) e duas enzimas convertases: corin (YAN et al., 2000) e furin (WU et al., 2003). Os NPs são expressos na forma de precursores: NPPA, NPPB e NPPC que darão origem ao NPA, NPB e NPC, respectivamente (NAKAO et al., 1992; POTTHAST & POTTER, 2005; POTTER et al., 2006). NPPA e NPPB tem alta afinidade pelo NPR-1 (SUGA et al., 1992), enquanto o NPC é o principal ligante do NPR-2 (KOLLER et al., 1991), ao passo que o NPR-3 é responsável pela internalização e degradação

dos ligantes (MAACK et al., 1987; POTTER et al., 2006). Além dos precursores e receptores duas enzimas convertases, corin e furin são responsáveis pela clivagem em peptídeos ativos de NPPA (YAN et al., 2000) e NPPC (WU et al., 2003).

Durante os processos reprodutivos destaca-se a participação dos NPs principalmente de NPC atuando via NPR-2. Em células da granulosa de camundongos, o FSH/eCG estimula a expressão de NPC, atingindo os níveis mais elevados, *in vivo*, concomitantemente com o pico pré-ovulatório do LH (KAWAMURA et al., 2011; LEE et al., 2013). Nessa mesma espécie foi demonstrado que o NPC produzido pelas células murais da granulosa, se liga ao NPR-2 do cumulus e impede o reinício da meiose (ZHANG et al., 2010). Camundongos knockout para NPR-2 não apresentavam corpo lúteo e por citologia vaginal esses animais não possuíam indícios de ciclo estral (TAMURA et al., 2004). Fatores derivados do oócito, principalmente GMP15, GDF9 e FGF8, juntamente com o estradiol promovem a expressão e manutenção da funcionalidade do NPR-2 no cumulus. (ZHANG et al., 2010; ZHANG et al., 2011; LEE et al., 2013). Contrariamente a isso, o LH/hCG através dos EGFs reduzem a expressão do NPC na granulosa de roedores (KAWAMURA et al., 2011; LEE et al., 2013).

Até então há a caracterização de alguns componentes do sistema NPs e sua regulação por gonadotrofinas em ovários de espécies multiovulatórias. Em espécies monovulares, a regulação e função dos NPs ainda não estão claras. Por isso o estudo da regulação deste sistema ao longo do período pré-ovulatório fornecerá subsídios para melhor compreendermos funções elementares como esteroidogênese e diferenciação, assim como a interação dos mesmos com outros elementos já conhecidos (por ex.: LH e EGF). Os objetivos do nosso segundo e terceiro estudos foram determinar o padrão de expressão dos precursores dos NPs, receptores e enzimas em células da granulosa durante o processo ovulatório, bem como sua possível regulação por LH e ainda demonstrar que a expressão para NPPC é regulada através de EGF-R em células da granulosa de bovinos. Para isso, utilizamos abordagens *in vivo* e *in vitro* que possibilitam o estudo simultâneo de eventos transcricionais e traducionais nas células da granulosa coletadas antes, durante ou após a indução (tratamento) do pico de LH.

## **ARTIGO 1**

**TRABALHO PUBLICADO:**

**Angiotensina-(1-7) durante o processo inicial na cascata da  
ovulação em bovinos**

**Joabel Tonello dos Santos, Vitor Braga Rissi, Matheus Pedrotti De  
Cesaro, Alfredo Skrebsky Cezar, Bernardo Garziera Gasperin, João  
Francisco Coelho de Oliveira, Paulo Bayard Dias Gonçalves.**

**CIENCIA RURAL, 2012**

## **Angiotensina-(1-7) durante o processo inicial na cascata da ovulação em bovinos**

### **Angiotensin-(1-7) during the initial process of ovulatory cascade in cattle**

**Joabel Tonello dos Santos<sup>I</sup>, Vitor Braga Rissi<sup>I</sup>, Matheus Pedrotti De Cesaro<sup>I</sup>,  
Alfredo Skrebsky Cezar<sup>I</sup>, Bernardo Garziera Gasperin<sup>I</sup>, João Francisco Coelho de  
Oliveira<sup>I</sup>, Paulo Bayard Dias Gonçalves<sup>I\*</sup>**

#### **RESUMO**

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da Ang-(1-7) e de seu receptor (MAS) na regulação da ovulação. No experimento I, utilizando um modelo *in vitro* de cultivo de células foliculares, foi avaliado o efeito do tratamento com Ang-(1-7) ou do bloqueio do receptor MAS através do inibidor d-Ala<sup>7</sup>-Ang-(1-7) (A-779) na expressão de RNAm para eprregulina (EREG; um marcador inicial do processo de ovulação) em células da granulosa. No experimento II, foi utilizado um modelo *in vivo* de injeção intrafolicular no qual vinte vacas tiveram o ciclo estral sincronizado e, quando os folículos atingiram um diâmetro mínimo de 12 mm, foi realizada a injeção intrafolicular de A-779 ou solução salina 0,9%. No momento da injeção intrafolicular, foi realizada uma aplicação IM de análogo de GnRH. A suplementação com Ang-(1-7) ou o bloqueio de seu receptor MAS em sistema de cultivo de células da granulosa não alteraram o padrão de expressão de RNAm para EREG. A aplicação intrafolicular de A-779 ( $10^{-5}$  M) não bloqueou a ovulação quando realizada antes do início do pico esperado de LH (100% das vacas ovularam nos grupos A-779 e controle), sugerindo que a Ang-(1-7) não possui papel relevante no início da cascata ovulatória em bovinos.

**Palavras-chave:** angiotensina (1-7), ovulação, receptor MAS, ECA2, bovino.

#### **ABSTRACT**

This study aimed to evaluate the effect of Ang-(1-7) and its receptor (MAS) in the regulation of the ovulatory cascade. In the experiment I, the effect of Ang-(1-7) or d-Ala7-Ang-(1-7) (A-779; Ang-(1-7) antagonist) on the epirregulin (EREG; initial marker of ovulation process) mRNA expression in granulosa cells was assessed using an *in vitro* model of follicular cell culture. In experiment II, it was used an *in vivo* intrafollicular injection model, in which twenty cows had their follicular waves synchronized and the ovarian follicular size was daily monitored by ultrasound. Follicles that reached a minimum diameter of 12 mm were injected with A-779 or saline 0.9%. At the time of the intrafollicular injection, cows were challenged with an intramuscular application of GnRH analogue. Ang-(1-7) or the blockade of its receptor MAS had no effect in EREG mRNA expression in granulosa cells cultured *in vitro*. Likewise, the intrafollicular injection of MAS receptor inhibitor ( $10^{-5}$  M of A-779) did not block ovulation before the expected time of LH peak (100% of the cows ovulated after GnRH challenge in the treatment and control groups), suggesting that Ang-(1-7) has no role in the early ovulatory cascade in cattle.

**Key words:** angiotensin (1-7), ovulation, MAS receptor, ACE<sub>2</sub>, bovine.

## INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, uma série de fatores de crescimento e peptídeos regulatórios foram identificados como reguladores do crescimento folicular, ovulação e luteinização (YOSHIMURA, 1997; RICHARDS et al., 2002). Nesse sentido, alguns modelos de sinalização para o desencadeamento da ovulação têm sido propostos para mamíferos, a partir do pico ovulatório de gonadotrofina (BRIDGES et al., 2006; FORTUNE et al., 2009). Os modelos mais estudados e aceitos são aqueles que envolvem os fatores de crescimento semelhantes ao EGF (*Epidermal Growth Factor*) como a ampirregulina (AREG) e a epirregulina (EREG), os quais são induzidos pelo pico de LH e estimulam a síntese de PTGS2



(*Prostaglandin-endoperoxide synthase 2*), iniciando os processos de proteólise e remodelação tecidual (PARK et al., 2004). Apesar de vários fatores terem sido descobertos através desses modelos, a complexa interação entre fatores locais e rotas intracelulares reguladas entre o pico de gonadotrofina e o rompimento do folículo com liberação do oócito maturo capaz de ser fecundado ainda é desconhecida. Entre os sistemas locais atuantes nesses processos, destaca-se o sistema renina-angiotensina (SRA), através de seus peptídeos com funções já bem estabelecidas na ovulação (FERREIRA et al., 2007) e maturação de oócitos (BARRETA et al., 2008).

No processo de ovulação, entre os componentes do SRA, a angiotensina II (Ang II) tem sido amplamente estudada. Em bovinos, a Ang II é indispensável nos momentos iniciais da cascata ovulatória induzida pelo LH (FERREIRA et al., 2007), além de possuir uma função vasoativa importante para a formação e regressão do corpo lúteo (ACOSTA & MIYAMOTO, 2004). A regulação dos componentes do sistema Ang II demonstra a participação deles durante a ovulação; no entanto, a Ang II não é o único peptídeo ativo do SRA. Outros peptídeos gerados a partir da Ang I e Ang II, como a Ang-(1-7) (FELIX et al., 1991), também podem mediar as ações do SRA em diferentes processos fisiológicos (COSTA et al., 2003; SAMPAIO et al., 2007).

A Ang-(1-7) é o ligante para o receptor MAS (SANTOS et al., 2003) e suas ações são especificamente inibidas quando o receptor MAS é bloqueado com d-Ala<sup>7</sup>-Ang-(1-7), também conhecido como A-779 (DILAURO & BURNS, 2009). A expressão de RNAm para MAS foi verificada em vários tecidos, incluindo ovários de roedores e bovinos (COSTA et al., 2003; SANTOS et al., 2011) e testículos de ratos e homens (METZGER et al., 1995; REIS et al., 2010). No entanto, pouco se sabe sobre a possível função ou via de ação da Ang-(1-7) na ovulação.

Em ratas, os níveis ovarianos de Ang-(1-7) estão mais elevados no proestro e estro, quando comparados aos níveis do metaestro e diestro (COSTA et al., 2003). Os mesmos autores demonstraram que Ang-(1-7) induz um aumento nas concentrações de estradiol e progesterona, sendo esse efeito inibido por A-779. Isso demonstra que a Ang-(1-7) utiliza receptor específico para atuar na esteroidogênese em roedores. A localização da Ang-(1-7) e do receptor MAS nas células intersticiais e tecais de folículos antrais e pré-ovulatórios de ratas tratadas com eCG também já foram observadas (COSTA et al., 2003; PEREIRA et al., 2009). Foi também demonstrado que a expressão de RNAm para MAS e para a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA<sub>2</sub>), responsável pela clivagem de Ang II em Ang-(1-7), aumenta em homogenatos de ovário de ratas tratadas com eCG (PEREIRA et al., 2009). Isso sugere uma possível função da Ang-(1-7) a partir de um estímulo por gonadotrofina.

Apesar de resultados apontarem uma possível ação e regulação da Ang-(1-7) na função ovariana, pouco se sabe até o momento em relação a sua função em espécies monovulares, como a bovina. Para tanto, testou-se a hipótese de que a Ang-(1-7) é um mediador necessário durante o processo ovulatório em bovinos, regulando a expressão de epirregulina. O objetivo deste estudo foi detectar a proteína do receptor MAS e avaliar o efeito da Ang-(1-7) sobre a expressão de RNAm para EREG nas células da granulosa bovina. Além disso, o efeito do bloqueio do receptor MAS sobre a expressão de EREG, induzida por LH *in vitro*, e sobre a taxa de ovulação induzida por GnRH *in vivo*, também foi avaliado.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### Experimento I

#### Identificação do receptor MAS em células da granulosa bovina

Ovários bovinos foram obtidos imediatamente após o abate e transportados para o laboratório em solução salina a 30°C. A proteína total de um fragmento ovariano (contendo

tecido cortical e medular) e células da granulosa provenientes de folículo bovino com 15mm de diâmetro (cujo par não possuía corpo lúteo) foram extraídas utilizando o buffer M-PER (Thermo Scientific, USA) e quantificadas usando NanoDrop (Thermo Scientific, USA). Após desnaturação a 95°C, 25µg de cada amostra foi submetida a um gel de SDS a 10% e eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose. Após bloqueio por 2h com leite desnatado a 5% em PBS contendo 0.1% tween-20 (PBS-T), a membrana foi incubada *overnight* a 4°C com anticorpo de coelho anti-MAS humano na diluição de 1:200 (sc-135063; Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) em agitação. Após três lavagens (10 min cada) com PBS-T, a membrana foi incubada com anticorpo secundário caprino anti-IgG de coelho (ab6721; Abcam Inc., USA) na diluição de 1:5000 por 2h em agitação, seguido por três lavagens. Finalmente, as membranas foram incubadas com substrato Lumi-Light PLUS (Roche, USA) por três min e visualizadas usando o Chemidoc analyser (BioRad, CA, USA).

#### Cultivo de células foliculares

Foi usado um sistema de cultivo de células de folículos  $\geq 12$  mm como modelo experimental semelhante ao descrito por BRIDGES et al. (2006), com modificações. Brevemente, pares de ovários bovinos que não apresentavam corpo lúteo foram obtidos em abatedouro, imediatamente após o abate, e transportados para o laboratório em solução salina a 30°C. O tempo total decorrido durante a coleta dos ovários e o início do cultivo foi de cerca de 2h. A partir de cada par de ovários, foi feita a dissecação do folículo com diâmetro pré-ovulatório  $\geq 12$  mm. Os fragmentos foliculares contendo teca e granulosa foram cortados em porções de aproximadamente 2-3mm<sup>3</sup>, as quais foram cuidadosamente lavadas em meio MEM (Sigma Aldrich, USA) suplementado com 50UI/ml de penicilina (Sigma Aldrich, USA) e 50µg ml<sup>-1</sup> de estreptomicina (Sigma Aldrich, USA) a 37°C. Os fragmentos foram distribuídos aleatoriamente em placas de quatro poços em número de quatro fragmentos/poço com 400µl de meio de cultivo em que receberam os tratamentos.

Os fragmentos foliculares foram cultivados na presença ou ausência de LH (100ng ml<sup>-1</sup>) e diferentes concentrações de Ang-(1-7) (Sigma Aldrich, USA) e inibidor A-779 (Sigma Aldrich, USA), constituindo os seguintes grupos: células foliculares (controle negativo); células foliculares + LH (controle positivo); células foliculares + Ang-(1-7) 10<sup>-5</sup>M; células foliculares + Ang-(1-7) 10<sup>-7</sup>M; células foliculares + Ang-(1-7) 10<sup>-9</sup>M; células foliculares + LH + A-779 10<sup>-5</sup>M; células foliculares + LH + A-779 10<sup>-7</sup>M; células foliculares + LH + A-779 10<sup>-9</sup>M. As concentrações utilizadas foram baseadas nas concentrações fisiológicas de Ang-(1-7) encontradas por SANTOS et al. (2011). Após 3h de cultivo, as células da granulosa foram coletadas através de sucessivas pipetagens no meio de cultivo, fazendo com que as células se desprendessem dos fragmentos. Na sequência, o meio foi centrifugado e as células da granulosa recuperadas e congeladas a -80°C para extração de RNAm.

#### Extração de RNA, transcrição reversa e qPCR

O RNA total foi extraído usando Trizol (Invitrogen, Brasil) de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação de RNA e a verificação de contaminação foram realizadas conforme SANTOS et al. (2011), utilizando o NanoDrop (Thermo Scientific, USA). A integridade do RNA foi verificada submetendo 1µg de RNA de cada amostra, 3µl de *loading buffer* (Sigma Aldrich, USA) e 2µl de água ultra pura a 70°C por 5min. Após, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1,2% para a visualização das bandas de RNA ribossomal (RNAr). A presença de rastros abaixo das bandas referentes às porções 28S e 18S do RNAr indica degradação.

O RNA total foi tratado com DNase (Invitrogen, Brasil) a 37°C por 30min para digerir DNA genômico contaminante. A reação de transcrição reversa foi realizada com 1mM oligo (dT) primer, Omniscript (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) RTased, dNTP's e inibidor da RNase (Amersham Biosciences, CA, USA).

A expressão relativa dos genes foi realizada por PCR em tempo real (Step One Plus, Applied Biosystems) com Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA). As análises de expressão foram realizadas conforme SANTOS et al. (2011). As sequências dos primers para EREG (iniciador sense: ACTGCACAGCATTAGTTCAAAGTGA; iniciador anti-sense: TGTCCATGCAAACAGTAGCCATT) e ciclofilina (SANTOS et al., 2011) foram obtidas utilizando Primer Express Software v3.0 (Applied Biosystems, USA) e sintetizados pela Invitrogen. O experimento foi realizado em três replicações para cada grupo experimental.

## Experimento II

### Animais, injeção intrafolicular e dinâmica folicular

Vinte vacas adultas cíclicas não lactantes das raças Hereford e Red Angus com condição corporal  $\geq 3$  (1-5) e peso de aproximadamente 450Kg tiveram uma nova onda folicular induzida. Brevemente, no dia 0 do protocolo, foram realizadas duas aplicações de cloprostenol sódico (PGF2alfa, Ourofino, Brasil) com intervalo de 12 horas, totalizando 500 $\mu$ g (IM), 2mg de benzoato de estradiol (BE) e um implante intravaginal de progesterona (DIB; 1g; Intervet/Schering-Plough, Brasil), o qual permaneceu por nove dias. Os animais nos quais o maior folículo em crescimento que atingiu diâmetro  $\geq 12$  mm receberam GnRH (100 $\mu$ g de acetato de gonadorelina, IM; Tortuga, Brasil) e foram aleatoriamente distribuídos para receberem injeção intrafolicular de  $10^{-5}$  M de A-779 (grupo A-779), bloqueador do receptor de Ang-(1-7), ou solução salina 0,9% (grupo controle).

As injeções intrafoliculares foram guiadas por ultrassom (Aquila Vet, Pie Medical Equipment BV, Holanda) equipado com uma sonda convexa de 7,5MHz. Para a aplicação dos tratamentos no folículo-alvo, foi utilizado um sistema de duas vias acoplado a uma guia de biopsia, conforme descrito por FERREIRA et al. (2007). Após a aplicação dos tratamentos, foi realizado monitoramento ultrassonográfico a cada 24h. A ovulação foi caracterizada

quando se observou o desaparecimento do folículo tratado entre duas avaliações e, posteriormente, a formação do corpo lúteo.

#### Análise estatística

Os resultados de expressão gênica foram comparados por análise de variância (PROC GLM; General Linear Models Procedure). Quando verificado efeito do tratamento, as médias entre os grupos foram comparadas utilizando o teste de multi-comparação de médias (LSMEANS). As expressões de RNAm foram testadas para normalidade com o auxílio do teste de Shapiro-Wilk e normalizadas, quando necessário, de acordo com cada distribuição. Os resultados dos índices de ovulações não foram avaliados por testes estatísticos no experimento II, em decorrência de ter sido obtido 100% de ovulação nos dois grupos. As análises foram realizadas utilizando o programa estatístico SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) e os resultados estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média.

## **RESULTADOS**

### Experimento I

A proteína do receptor MAS (aproximadamente 30kDa; Figura 1A) foi detectada em fragmento de ovário bovino e células da granulosa isoladas de folículo > 12 mm (para Western blot, o folículo apresentou um tamanho de 15mm). A Ang-(1-7) nas doses utilizadas não alterou o padrão de expressão de RNAm para EREG (Figura 1B) nas células da granulosa, quando estas foram cultivadas na ausência de LH. O A-779 também não alterou o padrão de expressão de RNAm de EREG (Figura 1C) no cultivo celular suplementado com LH.

### Experimento II

Nove das vinte vacas foram utilizadas, sendo os outros animais descartados do estudo por não apresentarem diâmetro folicular esperado ( $\geq 12$  mm). Os nove animais foram

distribuídos aleatoriamente nos grupos A-779 (n= 5) e controle (n= 4). Todos os animais de ambos os grupos ovularam entre 24 e 48h após a injeção intrafolicular.

## **DISCUSSÃO**

Os principais achados deste estudo são: 1) a proteína do receptor MAS está presente no ovário bovino e nas células da granulosa de folículo pré-ovulatório; 2) no cultivo *in vitro*, as doses utilizadas de Ang-(1-7) não foram capazes de regular positivamente a expressão de RNAm de EREG; 3) no cultivo *in vitro*, o A-779 não reduziu a expressão de RNAm de EREG e; 4) a injeção intrafolicular de A-779 ( $10^{-5}$  M) não foi capaz de bloquear a ovulação em bovinos. Esses resultados sugerem que, ao contrário da Ang II (KUJI et al., 1996; FERREIRA et al., 2007), a Ang-(1-7) parece não ser necessária, nem essencial para desencadear o processo de ovulação em bovinos.

Recentemente, este grupo de estudos demonstrou a presença da Ang-(1-7) no líquido folicular e expressão de RNAm para o receptor MAS e para as enzimas que dão origem a Ang-(1-7) através da clivagem de AngI e Ang II em folículos pré-ovulatórios bovinos (SANTOS et al., 2011). Em humanos, a Ang-(1-7) está presente no líquido folicular e a presença do seu receptor MAS foi detectada no ovário (REIS et al., 2010). Adicionalmente, em ratos, a expressão de RNAm para o receptor MAS, em homogenatos de ovário é regulada positivamente por eCG (PEREIRA et al., 2009). No presente estudo, usando o bovino como modelo para experimentos *in vivo*, não foram observados efeitos sobre a ovulação quando o receptor da Ang-(1-7) foi bloqueado. O estímulo com Ang-(1-7) ou bloqueio de seu receptor no cultivo *in vitro* de fragmentos de folículos pré-ovulatórios não alterou a expressão de EREG, um marcador inicial na cascata da ovulação.

Apesar da detecção do produto proteico do receptor MAS nas células da granulosa bovina, o bloqueio do receptor da Ang-(1-7) *in vivo* não foi efetivo para bloquear a ovulação

em bovinos, ao contrário do que acontece com o bloqueio dos receptores para Ang II (FERREIRA et al., 2007). O bloqueio dos receptores de Ang II só foi efetivo em períodos iniciais do processo de ovulação, até 6h após o desafio com GnRH (FERREIRA et al., 2007). No entanto, um estudo recente indica que as concentrações intrafoliculares de Ang-(1-7) só aumentam 24h após a aplicação de GnRH (SANTOS et al., 2011). As doses utilizadas de Ang-(1-7) (*in vitro*) e A-779 (*in vivo e in vitro*) foram similares ou superiores à concentração fisiológica de Ang-(1-7), encontrada no líquido folicular bovino (SANTOS et al., 2011). A perfusão cardíaca de Ang-(1-7) em camundongos produz efeitos vasculares complexos que envolvem a interação de seu receptor e dos receptores de Ang II, levando à liberação de prostaglandinas e óxido nítrico (CASTRO et al., 2005). Também, em cultivo de células endoteliais humanas, a Ang-(1-7) é capaz de estimular a liberação de prostaglandinas e óxido nítrico (SAMPAIO et al., 2007), importantes para o mecanismo final da ovulação. É possível que a Ang-(1-7) atue nos instantes finais da ovulação relacionados com a ruptura do folículo e luteinização, visto que neste estudo, ao contrário do que ocorre com Ang II (PORTELA et al., 2011), não foi observado efeito da Ang-(1-7) sobre EREG, importante marcador de eventos iniciais do processo ovulatório. Nesse sentido, cultivos *in vitro* com suplementação de tratamentos por um maior período podem agregar conhecimentos sobre um possível papel da Ang-(1-7) nesses eventos, podendo-se utilizar uma molécula ativada pela ligação Ang(1-7)/MAS. Entretanto, deve-se considerar que a Ang-(1-7) é um peptídeo derivado da clivagem da Ang II (FELIX et al., 1991) e pode não possuir uma ação direta no processo de ovulação em bovinos, contrariando os dados obtidos em espécies de ovulação múltipla.

VIANA et al. (2011), utilizando um modelo de perfusão de ovários de coelhas, demonstraram que a Ang-(1-7) é capaz de induzir a ovulação e produção de estradiol na ausência de gonadotrofinas. Além disso, o bloqueio de seu receptor foi capaz de inibir o efeito das gonadotrofinas na ovulação. Neste estudo, não foi possível evidenciar um papel relevante



da Ang-(1-7) durante os momentos iniciais da cascata da ovulação. No entanto, considerando que o antagonista da Ang-(1-7) (SANTOS et al., 1994) foi injetado no início do processo de ovulação (simultaneamente com a aplicação de GnRH), não pode ser excluído um efeito mais tardio.

## CONCLUSÃO

A Ang-(1-7) e o inibidor A-779, quando em cultivo *in vitro* por 3 horas, não são capazes de regular a expressão de EREG. A injeção intrafolicular na concentração de  $10^{-5}$ M de A-779 não inibe o processo ovulatório, indicando que a Ang-(1-7) não possui papel relevante no início da cascata ovulatória em bovinos.

## COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

**Processo número 23081.004717/2010-53.**

## REFERÊNCIAS

ACOSTA, T.J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. **Anim Reprod Sci**, v.82-83, p.127-140, 2004. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15271448](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15271448)>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: 10.1016/j.anireprosci.2004.04.022S0378432004000697[pii].

BARRETA, M.H. et al. Evidence that the effect of angiotensin II on bovine oocyte nuclear maturation is mediated by prostaglandins E2 and F2alpha. **Reproduction**, v.136, n.6, p.733-740, 2008. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/cgi/reprint/136/6/733.pdf>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: REP-08-0268 [pii]10.1530/REP-08-0268.

BRIDGES, P.J. et al. Gonadotropin-induced expression of messenger ribonucleic acid for cyclooxygenase-2 and production of prostaglandins E and F<sub>2</sub>α in bovine preovulatory follicles are regulated by the progesterone receptor. **Endocrinology**, v.147, n.10, p.4713-4722, 2006. Disponível em: <<http://endo.endojournals.org/cgi/reprint/147/10/4713.pdf>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: en.2005-1575[pii]10.1210/en.2005-1575.

CASTRO, C.H. et al. Evidence for a functional interaction of the angiotensin-(1-7) receptor Mas with AT1 and AT2 receptors in the mouse heart. **Hypertension**, v.46, n.4, p.937-942, 2005. Disponível em: < <http://hyper.ahajournals.org/cgi/reprint/46/4/937.pdf>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: 01.HYP.0000175813.04375.8a[pii]10.1161/01.HYP.0000175813.04375.8a.

COSTA, A.P. et al. Angiotensin-(1-7): a novel peptide in the ovary. **Endocrinology**, v.144, n.5, p.1942-1948, 2003. Disponível em: <<http://endo.endojournals.org/cgi/reprint/144/5/1942.pdf>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: 10.1210/en.2002-220787.

DILAURO, M.; BURNS, K.D. Angiotensin-(1-7) and its effects in the kidney. **Scientific World Journal**, v.9, p.522-535, 2009. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19578709](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19578709)>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: 10.1100/tsw.2009.70.

FELIX, D. et al. Neurophysiological responses to angiotensin-(1-7). **Hypertension**, v.17, n.6 Pt.2, p.1111-1114, 1991. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2045157](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2045157)>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: 10.1161/01.HYP.17.6.1111.

FERREIRA, R. et al. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. **Reproduction**, v.134, n.5, p.713-719, 2007. Disponível em: < <http://www.reproduction-online.org/cgi/reprint/134/5/713.pdf>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: 134/5/713[pii]10.1530/REP-07-0239.

FORTUNE, J.E. et al. The periovulatory period in cattle: progesterone, prostaglandins, oxytocin and ADAMTS proteases. **Anim Reprod**, v.6, n.1, p.60-71, 2009. Disponível em:

<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20390049](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20390049)>. Acesso em: 28 out. 2010.

KUJI, N. et al. Involvement of angiotensin II in the process of gonadotropin-induced ovulation in rabbits. **Biol Reprod**, v.55, n.5, p.984-991, 1996. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8902207](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8902207)>. Acesso em: 28 out. 2010. doi. 10.1095/biolreprod55.5.984.

METZGER, R. et al. Expression of the mouse and rat mas proto-oncogene in the brain and peripheral tissues. **FEBS Lett**, v.357, n.1, p.27-32, 1995. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8001672](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8001672)>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: 0014-5793(94)01292-9 [pii].

PARK, J.Y. et al. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. **Science**, v.303, n.5658, p.682-684, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/303/5658/682.full.pdf>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: 10.1126/science.10924631092463 [pii].

PEREIRA, V.M. et al. Gonadotropin stimulation increases the expression of angiotensin-(1--7) and MAS receptor in the rat ovary. **Reprod Sci**, v.16, n.12, p.1165-1174, 2009. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19703990](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19703990)>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: 1933719109343309 [pii]10.1177/1933719109343309.

PORTELA, V.M. et al. Role of Angiotensin II in the periovulatory epidermal growth factor-like cascade in bovine granulosa cells in vitro. **Biol Reprod**, v.85, n.6, p.1167-1164, 2011. Disponível em: <<http://www.biolreprod.org/content/early/2011/08/17/biolreprod.111.094193.full.pdf>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: biolreprod.111.094193[pii]10.1095/biolreprod.111.094193.

REIS, A.B. et al. Angiotensin (1-7) and its receptor Mas are expressed in the human testis: implications for male infertility. **J Mol Histol**, v.41, n.1, p.75-80, 2010. Disponível em:

<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20361351](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20361351)>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: 10.1007/s10735-010-9264-8.

RICHARDS, J.S. et al. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. **Recent Prog Horm Res**, v.57, p.195-220, 2002. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12017544](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12017544)>. Acesso em: 28 out. 2010.

SAMPAIO, W.O. et al. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. **Hypertension**, v.49, n.1, p.185-192, 2007. Disponível em: <<http://hyper.ahajournals.org/cgi/reprint/49/1/185.pdf>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: 01.HYP.0000251865.35728.2f [pii]10.1161.

SANTOS, R.A. et al. Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7): evidence that the actions of angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors. **Brain Res Bull**, v.35, n.4, p.293-298, 1994. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7850477](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7850477)>. Acesso em: 28 out. 2010.

SANTOS, R.A. et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.100, n.14, p.8258-8263, 2003. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/100/14/8258.full.pdf>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: 10.1073/pnas.14328691001432869100 [pii].

SANTOS, J. et al. Molecular characterization and regulation of the angiotensin-converting enzyme type 2/Angiotensin-(1-7)/MAS receptor axis during the ovulation process in cattle. **J Renin Ang Ald Syst**, v.13, n.1, p.1-8, 2012. Disponível em: <<http://jra.sagepub.com/content/early/2011/08/03/1470320311417273.full.pdf>>. Acesso em: 28 out. 2011. doi: 1470320311417273 [pii] 10.1177/1470320311417273.

VIANA, G.E. et al. Angiotensin-(1-7) induces ovulation and steroidogenesis in perfused rabbit ovaries. **Exp Physiol**, v.96, n.9, p.957-965, 2011. Disponível em:

<<http://ep.physoc.org/content/96/9/957.full.pdf>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: expphysiol.2011.058453 [pii] 10.1113.

YOSHIMURA, Y. The ovarian renin-angiotensin system in reproductive physiology. **Front Neuroendocrinol**, v.18, n.3, p.247-291, 1997. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9237079](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9237079)>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: S0091-3022(97)90152-7 [pii].

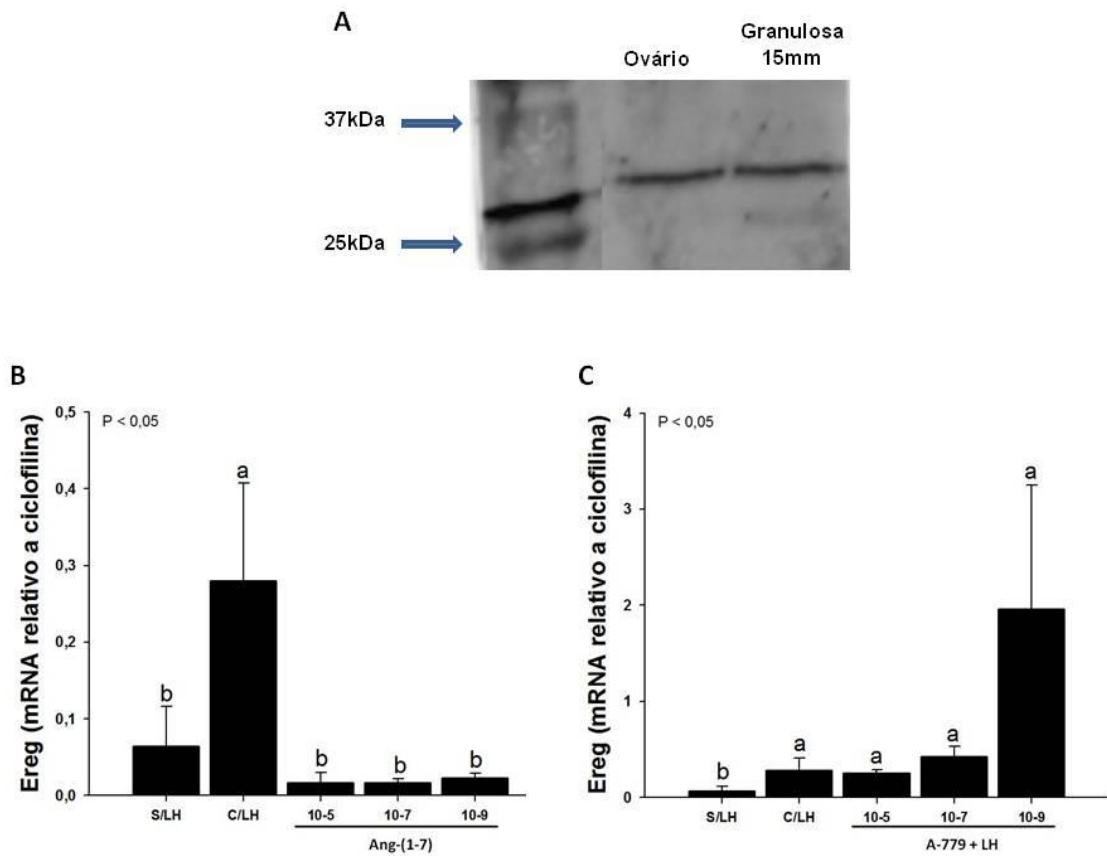


Figura 1 - Detecção proteica do receptor MAS em fragmento ovariano e células da granulosa isoladas de folículo pré-ovulatório (15mm) bovino (A). Note que a foto do gel foi cortada, tendo em vista que as amostras não relacionadas com o presente experimento foram retiradas para melhor representação dos resultados. Expressão relativa de RNAm (média  $\pm$  erro padrão da média) para epirregulina (EREG) em células da granulosa tratadas com diferentes doses de Ang-(1-7) (B) e A-779 (C). Letras diferentes representam diferença estatística entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ).

**ARTIGO 2**

**TRABALHO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO:**

**Natriuretic peptides during the ovulation process in cattle**

**Joabel Tonellotto dos Santos, Matheus Pedroti De Cesaro, Juliana Germano Ferst, Janduí Escarião da Nóbrega Jr., Rogério Ferreira, Bernardo Garziera Gasperin, Paulo Bayard Dias Gonçalves.**

**PEPTIDES, 2015**

## NATRIURETIC PEPTIDES DURING THE OVULATION PROCESS IN CATTLE

**Joabel Tonellotto dos Santos<sup>I\*</sup>, Matheus Pedroti De Cesaro<sup>I</sup>, Juliana Germano Ferst<sup>I</sup>,  
Janduí Escarião da Nóbrega<sup>I</sup>, Rogério Ferreira<sup>II</sup>, Bernardo Garziera Gasperin<sup>III</sup>, Paulo  
Bayard Dias Gonçalves<sup>I</sup>**

### 1. Abstract

The aim of this study was to evaluate the pattern of mRNA expression in bovine granulosa cells for the Natriuretic Peptides Precursors (NPPs), receptors (NPRs) and key enzymes of this system after GnRH-induced ovulation *in vivo*. Cyclic beef cows were synchronized using a progesterone-based protocol. After intravaginal device removal (day 9), ovaries were examined by transrectal ultrasonography and cows that had GnRH-responsive preovulatory follicles ( $\geq 12$  mm) were challenged with 100  $\mu$ g of gonadorelin acetate i.m. 12 h after intravaginal device removal. Treated cows were then ovariectomized 0, 3, 6, 12 and 24 h post-GnRH via colpotomy (n=5 to 6 animals in each time-point). Immediately after ovariectomy, follicular fluid and granulosa cells were recovered and properly stored. NPPA mRNA expression was not regulated after GnRH treatment *in vivo* and NPPB was not expressed, but its receptor (NPR-1) expression increased ( $P<0.05$ ) at 24 h compared to 0 h (time of GnRH treatment). Interestingly, NPPC was increased at 3 and 6 h after GnRH treatment ( $P<0.05$ ), returning to levels similar to hour 0 at 12 and 24 h whereas its receptor (NPR-2) was not regulated. However, NPR-3 gradually decreased after 3 h post GnRH, until 24 h ( $P<0.05$ ). The mRNA expression of the enzyme furin increased after 24 h of GnRH challenge ( $P<0.05$ ), whereas the enzyme corin did not change after GnRH ( $P<0.05$ ) in granulosa cells. In summary, NPPA, NPPC, NPRs and enzymes mRNA are expressed in granulosa cells, being NPPC mRNA upregulated by GnRH/LH *in vivo*. These results suggest that NPs are involved in the ovulatory process in cattle and that the regulation and function of NPs during ovulation may differ between monovular and polyovular species.

**Keywords:** NPPC, granulosa cells, bovine, LH.

<sup>I</sup>Laboratory of Biotechnology and Animal Reproduction — BioRep, Av. Roraima n. 1000, Prédio 97, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>II</sup>Department of Animal Science, Santa Catarina State University, Rua Benjamin Constant, n. 164, CEP 89801-070, Chapecó, SC, Brazil.

<sup>III</sup>Laboratory of Animal Reproduction - ReproPel, Federal University of Pelotas, Campus Universitário Capão do Leão, s/n., CEP 96010-900, Capão do Leão, RS, Brazil.

\*e-mail: joabelts@yahoo.com.br. \*Correspondence author.



## 1. Introduction

Ovulation is characterized as a sequence of events that happen in a responsive preovulatory follicle after a luteinizing hormone (LH) surge [8, 37]. Beyond their established role in systemic homeostasis, natriuretic peptides (NPs) are involved in regulation of reproductive function, especially in follicle development [14, 17]. The NPs system consists of three endogenous peptides with high homology: atrial (ANP), B-type (BNP), and C-type (CNP) plus three receptors (NPR-1, -2 and -3) located on the target cell surface [11, 27, 33] and two convertase enzymes: corin [48] and furin [47]. The natriuretic peptide precursors A (NPPA), B (NPPB) and C (NPPC) can be assessed at mRNA level encoding ANP, BNP and CNP, respectively [29, 34, 35]. NPPA and NPPB have a higher affinity for NPR-1 [42], while the main receptor for NPPC is NPR-2 [21], whereas NPR-3 is responsible for internalization and degradation of the ligands [26, 34]. Beyond precursors and receptors, two convertase enzymes, corin and furin are involved in NPs regulation, processing NPPA [48] and NPPC [47], respectively, to mature peptides.

In reproductive processes CNP has a pivotal role, acting via NPR-2. It was demonstrated the presence of NPs system in the rat ovary and uterus, wherein CNP levels varied during the estrous cycle, with greatest expression during proestrus [5, 17]. It was also shown that NP system in rat ovary is regulated by gonadotropins, especially FSH, and that CNP and NPR-2 are important regulators of ovarian function [14, 24]. In adult mice, CNP expression is mostly detected in uterus and ovaries [41], being CNP mRNA expression positively regulated by estradiol in the uterus. The knockout of NPR-2 in mice inhibited corpus luteum formation, whereas vaginal cytology was not influenced by different estrous cycle phases in those animals [43]. CNP has been also proven to be involved in meiotic arrest in mice [44, 50], and porcine oocytes [16, 51]. Its precursor (NPPC) mRNA expression is

downregulated in mice granulosa cells by hCG/LH *in vivo* [19] and by amphiregulin *in vitro* [44].

ANP is known to regulate ovarian functions, such as follicular growth and steroid hormone production [15, 18]. Recently, it was determined that low ovarian ANP levels may contribute to the abnormal steroid hormone balance in polycystic ovaries in rodents [31] and may play a role in the pathogenesis of polycystic ovary syndrome (PCOS) in women [22]. In cattle, ANP and NPR-3 were detected in corpus luteum [20, 46] and in mature follicles [1], and it was proposed that ANP increases prostaglandins (PGs) production and modulates steroidogenesis in follicular cells, providing evidence of a local functional NPs system.

The regulation of NPs remains unclear in monovular species during ovulation process. Characterization of NPs system during ovulation would allow a better understanding of the role of these factors in monovulatory species and guide functional studies. The aim of this study was to evaluate the pattern of mRNA expression in bovine granulosa cells for the NPs precursors (NPPs), receptors and key enzymes convertases of this system after GnRH/LH-induced ovulation *in vivo*.

## **2. Material and method**

### **1.1. Animals and experimental design**

Twenty-seven cyclic beef cows with body condition scores of 3 and 4 (1 = thin, 5 = obese) were pre-synchronized to obtain a GnRH responsive follicle ( $\geq 12$  mm) [40] at the beginning of the experiment according to a previous study [9]. Briefly, after intravaginal device (DIB – Intervet Schering Plough, Brazil) removal (day 9), ovaries were examined by transrectal ultrasonography, using a 8 MHz linear-array transducer (AquilaVet scanner, Pie Medical, Netherlands) and cows that had gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-responsive preovulatory follicles ( $\geq 12$  mm) were challenged with 100  $\mu\text{g}$  of gonadorelin acetate

(Profertil®, Tortuga, Brazil) i.m. 12 hours (h) after removal of the intravaginal progesterone device. The ovaries were removed 0, 3, 6, 12 and 24 h after GnRH treatment by colpotomy in standing position [6]. After the ovariectomy, follicular fluid and granulosa cells were collected and stored in liquid nitrogen [39]. All procedures involving animals performed in this experiment were approved by the Ethics and Animal Welfare Committee from Universidade Federal de Santa Maria, protocol number 23081.007716/2010-61.

### 1.2. Nucleic Acid Extraction and Real-Time RT-PCR

Total RNA was extracted using silica based protocol (granulosa cells; Qiagen, Mississauga, Canada) according to the manufacturer's instructions and was quantified by absorbance at 260 nm. Total RNA (1 µg) was first treated with 0.2U DNase (Invitrogen, Brazil) at 37°C for 5 minutes, to digest any contaminating DNA, and then heated to 65°C for 3 minutes. The RNA was reverse transcribed (RT) in the presence of 1 µM oligo(dT), primer, 4 U Omniscript RTase (Omniscript RT Kit; Qiagen, Mississauga, Canada), 0.5µM dideoxynucleotide triphosphate (dNTP) mix and 10 U RNase Inhibitor (Invitrogen, Brazil) in a volume of 20 µL at 37°C for 1 hour. The reaction was terminated by incubation at 93°C for 5 minutes.

The Real-time polymerase chain reaction (PCR) was conducted in a Step One Plus instrument (Applied Biosystems, Foster City, Canada) with Platinum SYBR Green qPCR SuperMix (Invitrogen, Brazil) and bovine-specific primers (Table 1). The primers were taken from literature or obtained using Primer Express Software v3.0 (Applied Biosystems, USA) and synthesized by Invitrogen. Common thermal cycling parameters (3 minutes at 95°C, 40 cycles of 15 seconds at 95°C, 30 seconds at 60°C, and 30 seconds at 72°C) were used to amplify each transcript. Melting-curve analyses were performed to verify the product identity. Samples were run in duplicate and were expressed relative to Cyclophilin as the housekeeping gene. The relative quantification of gene expression across treatments was evaluated using the

ddCT method [25]. Briefly, the dCT is calculated as the difference between the CT of the investigated gene and the CT of housekeeping gene in each sample. The ddCT of each investigated gene is calculated as the difference between the dCT in each treated sample and the dCT of the sample with lower gene expression (higher dCT). The fold change in relative mRNA concentrations was calculated using the  $2^{-ddCT}$  formula. The cross-contamination in granulosa and theca cells was tested by Real-time PCR [3, 39]. To further verify primers specificity (presence of only one band at the expected size), the amplicons were submitted to 2.5% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide, and observed under UV light.

### 1.3. Follicular fluid steroid concentrations

The follicular fluid was assayed using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), to determine estradiol and progesterone concentration, following the manufacturer's instructions (Cayman Biochemical).

### 1.4. Statistical analysis

The differences on continuous data between hours during the ovulation process were accessed by analysis of variance (ANOVA) and multi-comparison between hours was performed by least square means Student's t test. Data were tested for normal distribution using the Shapiro-Wilk test and normalized when necessary. All analyses were performed using the JMP software (SAS Institute Inc., Cary, USA) and a  $P < 0.05$  was considered statistically significant. Data are presented as means  $\pm$  sem.

## 3. Results

### 1.5. *In vivo* model validation

Follicular diameter was evaluated through ultrasound and no differences were observed at different time points before ovariectomy (data not shown). Follicular fluid estradiol concentration increased 3 h after treatment with GnRH, when the endogenous LH surge was expected to occur, and gradually decreased thereafter, up to 24 h (Figure 1A). A marked increase in follicular fluid progesterone concentration was observed 3 h after GnRH followed by a decrease from 3 to 12 h and increasing again 24 h post GnRH, indicating follicular cells luteinization (Figure 1B). The results were similar to those observed in previous studies of pre-ovulatory follicles, both estradiol [39], and progesterone [10].

#### 1.6. NPPs, NPRs and convertase enzymes gene expression profile in granulosa cells after GnRH-induced ovulation *in vivo*.

Firstly, the presence of mRNA coding for NPs, their receptors and convertase enzymes was investigated using real time qRT-PCR in bovine granulosa cells from follicles  $\geq$  12 mm. Real-Time PCR amplicons were run in agarose gel and revealed a single band consistent with the expected size for each of the following targets: NPPA, NPPC, NPR-1, NPR-2, NPR-3, corin and furin, whereas mRNA expression of NPPB was absent in granulosa cells. Based on these results, the expression of NPs precursors, their receptors and key enzymes was characterized in response to LH using an *in vivo* model.

Analysis of NPPA mRNA expression in granulosa cells revealed no significant differences between time points whereas NPPC mRNA expression increased at 3 and 6 h after GnRH treatment ( $P < 0.05$ ), returning to levels similar to hour 0 at 12 and 24 h (Figure 2B). The mRNA expression of furin increased 24 h after GnRH treatment ( $P < 0.05$ ; Figure 2D) whereas corin mRNA expression was not regulated by GnRH ( $P > 0.05$ ; Figure 2C) in granulosa cells. NPR-2 mRNA expression levels did not change after GnRH treatment (Figure 3B). However, NPR-1 expression increased 24 h after GnRH treatment in comparison

to 0 h ( $P < 0.05$ ; Figure 3A) whereas NPR-3 mRNA abundance gradually decreased from 3 to 12 h after GnRH remained low at 24 h ( $P < 0.05$ ; Figure 3C).

#### 4. Discussion

In the present study, we used a well-established ovulation model to investigate, for the first time, the regulation of natriuretic peptides system members in granulosa cells obtained after GnRH treatment *in vivo* in a monovular species. Our significant findings are: 1) the expression of NPPC mRNA is upregulated by GnRH/LH in contrast to what was previously shown in the rodent model; 2) NPR-1 and -3 mRNA expression in granulosa cells is up and downregulated, respectively, after GnRH-stimulated ovulation and 3) granulosa cells from preovulatory follicles express corin and furin mRNA, being furin expression increased just before follicle rupture.

The experimental model used in the present study allows the investigation of factors involved in the ovulation process after GnRH treatment, which induces a LH surge 2 h after [36]. The fact that follicular fluid estradiol levels decreased from 3 h after treatment whereas progesterone levels increased just before ovulation validates the model mimicking the physiological shift in steroidogenesis occurring before follicle rupture [2, 10]. The main advantage of using cattle as a model resides in the fact that samples can be collected from individual follicles and the interaction between different cell types is preserved being all the cells under the same physiological endocrine environment.

In the present study, NPPC mRNA expression increased 3 h after GnRH administration (Figure 2B), suggesting that LH surge triggers an increase in CNP levels in cattle. These results are in contrast to the downregulation of NPPC mRNA by LH in mouse granulosa cells [19, 24]. In another study using goat granulosa cells stimulated *in vitro* with FSH, a dose- and time-dependent increase in NPPC expression was observed and a rapid

decline was induced by LH stimulation [30]. It is important to highlight that most *in vitro* studies do not allow the interaction between different cell types and that in cattle both LH and FSH increase concomitantly after GnRH treatment [7]. The different results observed in cattle and other species may also indicate that there are significant disparities in the ovulation mechanism in polyovular and monovular species. In rodents it was observed that the downregulation of NPPC occurs through epidermal growth factor receptor (EGFR) in granulosa cells [45]. However data obtained by our group using granulosa cell culture indicate that the NPPC is up-regulated by EGF-L (like growth factors) in cattle (unpublished data).

The mRNA expression for NPPB was absent in bovine granulosa cells, while mRNA for NPPA presence was confirmed, but was not regulated after GnRH administration (Figure 2-A). Similarly, NPPA mRNA was detected in mouse ovarian cells but its expression was not regulated by eCG and hCG [19]. In goats, NPPA and NPPB mRNA expression is observed in the ovary, but it not regulated after FSH or LH treatment [30]. In human ovary and uterus it was reported that NPPB has a low expression level [12]. Taken together, these data suggest that NPPA is not directly regulated by gonadotropins, while NPPB does not seem to have a major role in the ovulation process.

The expression of convertase enzymes corin and furin has not been thoroughly examined in the ovary from monovular species so far. In rats, furin may play an important role in regulating apoptosis and proliferation of granulosa cells [49]. The increase of mRNA expression of furin 24 h after GnRH is in accordance with the increase in NPPC observed 3 h after GnRH and suggests that NPC levels increase after LH surge. The regulation of these enzymes by LH in other models has not been investigated but it is known that growth factors such as BMP4 and BMP7 significantly increased furin mRNA and protein in human granulosa-lutein cells [4]. The absence of regulation of corin mRNA expression after GnRH treatment (Figure 2-C) is also in accordance to the absence of NPPA mRNA regulation

(Figure 2-A), which may indicate that ANP is not regulated by LH, especially in the early stages of ovulation in cattle.

All the three NPs receptors mRNA expression was detected in bovine granulosa cells from preovulatory follicles (Figure 3). This is the first study demonstrating the regulation of NPR-3 in response to GnRH/LH. Considering that the ANP and CNP levels depends not only on their synthesis but also on the degradation, the decrease in NPR-3 mRNA 6 h post GnRH (Figure 3-C) suggests a lower degradation of these peptides, especially CNP, because in addition to NPR-3, neutral endopeptidase (NEP), a cell surface metallopeptidase [13], also degrades ANP. It is known that NEP enzymatic activity decreases after eCG treatment [32] and increases in polycystic ovary (PCO) in rats [31]. In our experimental model, the mRNA expression pattern of NEP increased 12 h after GnRH [39]. This result indicates that CNP is more important than ANP in ovulatory process, since NPPA and corin mRNA expression are not regulated by GnRH/LH, and ANP levels depend on the balance between the peptide synthesis and its degradation that can be mediated by NEP or by NPR-3.

The increase in mRNA expression for NPR-1 near ovulation (24 h after GnRH- Figure 3-A) corroborates with previous studies that demonstrated an effect of ANP on steroidogenesis and corpus luteum formation [1, 20, 28]. However, no significant differences in NPR-2 mRNA expression was observed after GnRH injection, differently to what was observed in rodents, in which it was shown that LH signaling decreases NPR-2 expression in granulosa cells [38]. These results provide evidence of species-specific regulation of CNP/NPR-2 during the ovulatory process. Also suggesting a possible regulation occurs through CNP synthesis, in our model.

In summary, this study using an *in vivo* approach confirms the presence of some components of the NPs during ovulation in cattle. The increase in the expression of NPPC and furin and the decrease in NPR-3 after GnRH/LH provide the first evidence that NPC may be



involved in ovulation and luteinization in cattle. Functional studies are necessary to elucidate the signaling pathways and the exact role of NPs in the ovulatory process in monovular species.

## **5. Acknowledgements**

The Laboratory of Biotechnology and Animal Reproduction (BioRep) members for critical discussion during the collection of the data. This study was supported by the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES*, *Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul - FAPERGS* and *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq*. The authors would like to thank Leão and Guassupi ranches for providing the animals used in this study.

## **Declaration of Conflicting Interests**

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

## References

- [1] Acosta TJ, Berisha B, Ozawa T, Sato K, Schams D, Miyamoto A. Evidence for a local endothelin-angiotensin-atrial natriuretic peptide system in bovine mature follicles in vitro: effects on steroid hormones and prostaglandin secretion. *Biol Reprod.* 1999;61:1419-25.
- [2] Bridges PJ, Komar CM, Fortune JE. Gonadotropin-induced expression of messenger ribonucleic acid for cyclooxygenase-2 and production of prostaglandins E and F<sub>2</sub>α in bovine preovulatory follicles are regulated by the progesterone receptor. *Endocrinology.* 2006;147:4713-22.
- [3] Buratini J, Jr., Teixeira AB, Costa IB, Glapinski VF, Pinto MG, Giometti IC, et al. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. *Reproduction.* 2005;130:343-50.
- [4] Chang HM, Cheng JC, Klausen C, Leung PC. Recombinant BMP4 and BMP7 increase activin A production by up-regulating inhibin betaA subunit and furin expression in human granulosa-lutein cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2015;jc20143026.
- [5] Dos Reis AM, Fujio N, Dam TV, Mukaddam-Daher S, Jankowski M, Tremblay J, et al. Characterization and distribution of natriuretic peptide receptors in the rat uterus. *Endocrinology.* 1995;136:4247-53.
- [6] Drost M, Savio JD, Barros CM, Badinga L, Thatcher WW. Ovariectomy by colpotomy in cows. *J Am Vet Med Assoc.* 1992;200:337-9.
- [7] Dufour JJ, Mermillod P, Mariana JC, Romain RF. The effect of a GnRH agonist on follicular dynamics and response to FSH stimulation in prepubertal calves. *Reproduction, nutrition, development.* 1999;39:133-44.
- [8] Espey LL. Ovulation as an inflammatory reaction--a hypothesis. *Biol Reprod.* 1980;22:73-106.
- [9] Ferreira R, Oliveira JF, Fernandes R, Moraes JF, Goncalves PB. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. *Reproduction.* 2007;134:713-9.
- [10] Fortune JE, Willis EL, Bridges PJ, Yang CS. The periovulatory period in cattle: progesterone, prostaglandins, oxytocin and ADAMTS proteases. *Anim Reprod.* 2009;6:60-71.
- [11] Gardner DG, Chen S, Glenn DJ, Grigsby CL. Molecular biology of the natriuretic peptide system: implications for physiology and hypertension. *Hypertension.* 2007;49:419-26.
- [12] Gerbes AL, Dagnino L, Nguyen T, Nemer M. Transcription of brain natriuretic peptide and atrial natriuretic peptide genes in human tissues. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 1994;78:1307-11.
- [13] Gros C, Souque A, Schwartz JC. Inactivation of atrial natriuretic factor in mice in vivo: crucial role of enkephalinase (EC 3.4.24.11). *European journal of pharmacology.* 1990;179:45-56.
- [14] Gutkowska J, Jankowski M, Sairam MR, Fujio N, Reis AM, Mukaddam-Daher S, et al. Hormonal regulation of natriuretic peptide system during induced ovarian follicular development in the rat. *Biol Reprod.* 1999;61:162-70.
- [15] Gutkowska J, Tremblay J, Antakly T, Meyer R, Mukaddam-Daher S, Nemer M. The atrial natriuretic peptide system in rat ovaries. *Endocrinology.* 1993;132:693-700.
- [16] Hiradate Y, Hoshino Y, Tanemura K, Sato E. C-type natriuretic peptide inhibits porcine oocyte meiotic resumption. *Zygote.* 2014;22:372-7.
- [17] Jankowski M, Reis AM, Mukaddam-Daher S, Dam TV, Farookhi R, Gutkowska J. C-type natriuretic peptide and the guanylyl cyclase receptors in the rat ovary are modulated by the estrous cycle. *Biol Reprod.* 1997;56:59-66.
- [18] Johnson KM, Hughes FM, Jr., Fong YY, Mathur RS, Williamson HO, Gorospe WC. Effects of atrial natriuretic peptide on rat ovarian granulosa cell steroidogenesis in vitro. *Am J Reprod Immunol.* 1994;31:163-8.

- [19] Kawamura K, Cheng Y, Kawamura N, Takae S, Okada A, Kawagoe Y, et al. Pre-ovulatory LH/hCG surge decreases C-type natriuretic peptide secretion by ovarian granulosa cells to promote meiotic resumption of pre-ovulatory oocytes. *Hum Reprod.* 2011;26:3094-101.
- [20] Kobayashi S, Acosta TJ, Ozawa T, Hayashi K, Berisha B, Ohtani M, et al. Intraluteal release of angiotensin II and progesterone in vivo during corpora lutea development in the cow: effect of vasoactive peptides. *Biol Reprod.* 2002;66:174-9.
- [21] Koller KJ, Lowe DG, Bennett GL, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, et al. Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science.* 1991;252:120-3.
- [22] Lauria PB, Del Puerto HL, Reis AM, Candido AL, Reis FM. Low plasma atrial natriuretic peptide: a new piece in the puzzle of polycystic ovary syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2013;98:4882-9.
- [23] Ledoux S, Campos DB, Lopes FL, Dobias-Goff M, Palin MF, Murphy BD. Adiponectin induces periovulatory changes in ovarian follicular cells. *Endocrinology.* 2006;147:5178-86.
- [24] Lee KB, Zhang M, Sugiura K, Wigglesworth K, Uliasz T, Jaffe LA, et al. Hormonal coordination of natriuretic peptide type C and natriuretic peptide receptor 3 expression in mouse granulosa cells. *Biol Reprod.* 2013;88:42.
- [25] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25:402-8.
- [26] Maack T, Suzuki M, Almeida FA, Nussenzveig D, Scarborough RM, McEnroe GA, et al. Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science.* 1987;238:675-8.
- [27] Misono KS, Philo JS, Arakawa T, Ogata CM, Qiu Y, Ogawa H, et al. Structure, signaling mechanism and regulation of the natriuretic peptide receptor guanylate cyclase. *FEBS J.* 2011;278:1818-29.
- [28] Montrezor LH, Piccinato CA, Collares CV, Vireque AA, Silva AA. Effects of angiotensin II, atrial natriuretic peptide and endothelin-1 on proliferation and steroidogenic output of bovine granulosa cells cultured in a chemically defined system. *Animal reproduction science.* 2015;152:8-16.
- [29] Nakao K, Ogawa Y, Suga S, Imura H. Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. I: Natriuretic peptides. *J Hypertens.* 1992;10:907-12.
- [30] Peng JY, Xin HY, Han P, Zhao HB, Bai L, An XP, et al. Identification and gene expression analyses of natriuretic peptide system in the ovary of goat (*Capra hircus*). *Gene.* 2013;524:105-13.
- [31] Pereira VM, Honorato-Sampaio K, Martins AS, Reis FM, Reis AM. Downregulation of natriuretic peptide system and increased steroidogenesis in rat polycystic ovary. *Peptides.* 2014;60:80-5.
- [32] Pereira VM, Reis FM, Santos RA, Cassali GD, Santos SH, Honorato-Sampaio K, et al. Gonadotropin stimulation increases the expression of angiotensin-(1--7) and MAS receptor in the rat ovary. *Reprod Sci.* 2009;16:1165-74.
- [33] Potter LR. Natriuretic peptide metabolism, clearance and degradation. *FEBS J.* 2011;278:1808-17.
- [34] Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev.* 2006;27:47-72.
- [35] Potthast R, Potter LR. Phosphorylation-dependent regulation of the guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors. *Peptides.* 2005;26:1001-8.
- [36] Quirk SM, Cowan RG, Harman RM. Progesterone receptor and the cell cycle modulate apoptosis in granulosa cells. *Endocrinology.* 2004;145:5033-43.
- [37] Richards JS, Russell DL, Ochsner S, Espey LL. Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. *Annu Rev Physiol.* 2002;64:69-92.

- [38] Robinson JW, Zhang M, Shuhaibar LC, Norris RP, Geerts A, Wunder F, et al. Luteinizing hormone reduces the activity of the NPR2 guanylyl cyclase in mouse ovarian follicles, contributing to the cyclic GMP decrease that promotes resumption of meiosis in oocytes. *Dev Biol.* 2012;366:308-16.
- [39] Santos J, Ferreira R, Gasperin BG, Siqueira LC, de Oliveira JF, Santos RA, et al. Molecular characterization and regulation of the angiotensin-converting enzyme type 2/Angiotensin-(1-7)/MAS receptor axis during the ovulation process in cattle. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2011.
- [40] Sartori R, Fricke PM, Ferreira JC, Ginther OJ, Wiltbank MC. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol Reprod.* 2001;65:1403-9.
- [41] Stepan H, Leitner E, Bader M, Walther T. Organ-specific mRNA distribution of C-type natriuretic peptide in neonatal and adult mice. *Regul Pept.* 2000;95:81-5.
- [42] Suga S, Nakao K, Hosoda K, Mukoyama M, Ogawa Y, Shirakami G, et al. Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. *Endocrinology.* 1992;130:229-39.
- [43] Tamura N, Doolittle LK, Hammer RE, Shelton JM, Richardson JA, Garbers DL. Critical roles of the guanylyl cyclase B receptor in endochondral ossification and development of female reproductive organs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:17300-5.
- [44] Tsuji T, Kiyosu C, Akiyama K, Kunieda T. CNP/NPR2 signaling maintains oocyte meiotic arrest in early antral follicles and is suppressed by EGFR-mediated signaling in preovulatory follicles. *Molecular Reproduction and Development.* 2012;n/a-n/a.
- [45] Tsuji T, Kiyosu C, Akiyama K, Kunieda T. CNP/NPR2 signaling maintains oocyte meiotic arrest in early antral follicles and is suppressed by EGFR-mediated signaling in preovulatory follicles. *Mol Reprod Dev.* 2012;79:795-802.
- [46] Vollmar AM, Mytzka C, Arendt RM, Schulz R. Atrial natriuretic peptide in bovine corpus luteum. *Endocrinology.* 1988;123:762-7.
- [47] Wu C, Wu F, Pan J, Morser J, Wu Q. Furin-mediated processing of Pro-C-type natriuretic peptide. *J Biol Chem.* 2003;278:25847-52.
- [48] Yan W, Wu F, Morser J, Wu Q. Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:8525-9.
- [49] Yang X, Wang Q, Gao Z, Zhou Z, Peng S, Chang WL, et al. Proprotein convertase furin regulates apoptosis and proliferation of granulosa cells in the rat ovary. *PloS one.* 2013;8:e50479.
- [50] Zhang M, Su YQ, Sugiura K, Xia G, Eppig JJ. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. *Science.* 2010;330:366-9.
- [51] Zhang W, Chen Q, Yang Y, Liu W, Zhang M, Xia G, et al. Epidermal growth factor-network signaling mediates luteinizing hormone regulation of BNP and CNP and their receptor NPR2 during porcine oocyte meiotic resumption. *Mol Reprod Dev.* 2014;81:1030-41.

*Table 1* - Primers used in the expression analysis of candidate genes. Primer sequences and concentrations used to amplify each product are described.

Gene	Sequence	Conc. (nM)	Reference accession n°	or
Cyclophilin	F GGTTCATCGGTCTCTTTGGAA	200	[23]	
	R TCCTTGATCACACGATGGAA	200		
NPPA	F GGAGCAAATCCCGTGTATGG	200	NM_174124.1	
	R CCTCATCTTCTAAAGGCATCTTGT C	200		
NPPB	F GCAACGTGCTGAGGAGGTA	200	NM_001166570.1	
	R GAGAAGAACCATCTTATATAAAA CAACCAA	200		
NPPC	F CAACGCGCGCAAATACAA	200	NM_174125.2	
	R TCAGCAAACGCAGCAAGTC	200		
NPR-1	F AATTATGGCTCCCTACTAACCACA GA	200	ENSBTAT00000008184	
	R TCCGGTTCACACGTTTCACA	200		
NPR-2	F TCTGCTCCTAAGCTGGGTGAGT	200	ENSBTAT00000015204	
	R CGGTCATCTGTGCGAGCAT	200		
NPR3	F TTTGAAGCTAAGCAAGCGTACTCA	200	NM_174127.2	
	R CAGAACTTTTCACCTCCATGGAA	200		
Corin	F TTGGAACCTCTGCTTGAATTTGC	200	XM_002688245.1	
	R GAGAAGACTCCCAGCTGATGGA	200		
Furin	F CCTGCGGCAGAAGTGTACAG	200	NM_174136.2	
	R CCCGCCAAGTGAGGTTCTTA	200		

F, Forward primer; R, Reverse primer; Conc., primer concentration used for gene amplification.

FIG - 1

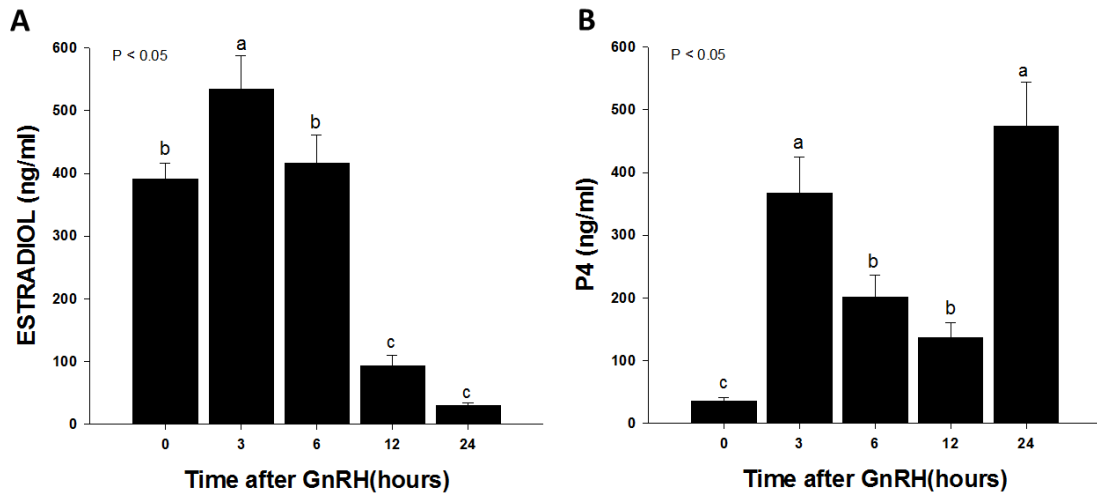


Figure 1 - Concentration of Estradiol (A) and Progesterone (P4- B; ng/ml mean  $\pm$  standard error of mean; n= at least 5-6/time point) in follicular fluid obtained from preovulatory follicles at 0, 3, 6, 12, or 24 h after GnRH analogue challenge. Different letters represent statistical difference (P<0.05).

FIG - 2

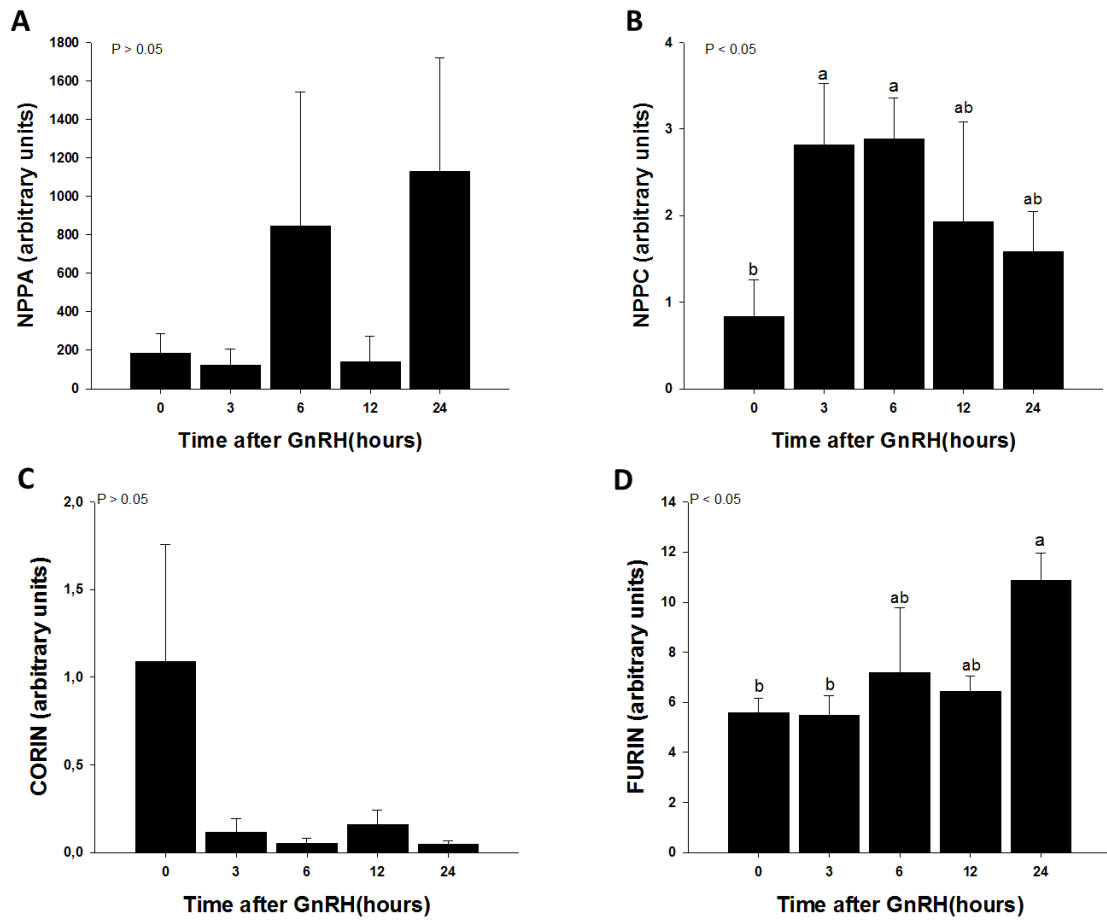
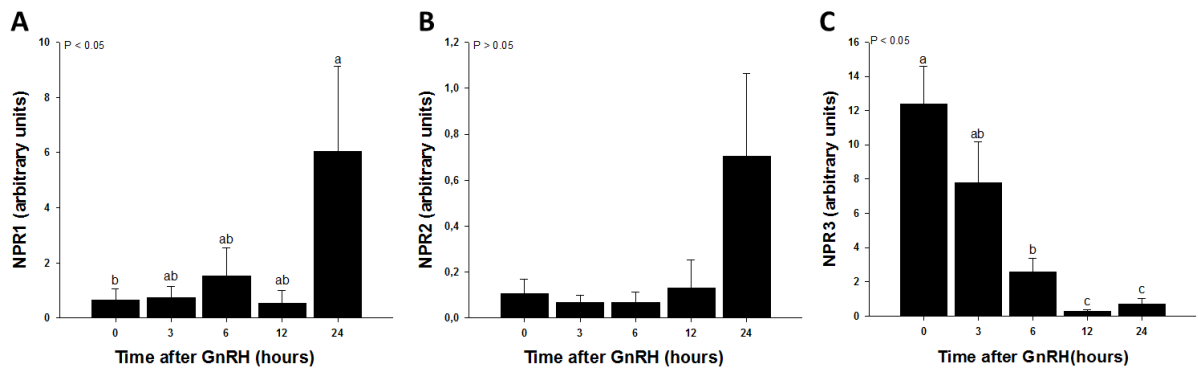


Figure 2 - Relative mRNA expression (mean  $\pm$  standard error of mean) of NPPA (A), NPPC (B), CORIN (C) and FURIN (D) in granulosa cells at different times after application of GnRH. Different letters represent statistical difference ( $P < 0.05$ ).

FIG - 3



*Figure 3* - Relative mRNA expression (mean  $\pm$  standard error of mean) of NPR-1 (A), NPR-2 (B) and NPR-3 (C) in granulosa cells at different times after application of GnRH. Different letters represent statistical difference ( $P < 0.05$ ).



### **ARTIGO 3**

**TRABALHO A SER SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO:**

**RNA<sub>m</sub> para NPPC é regulado através de EGF-R durante o  
processo ovulatório em bovinos**

**Joabel Tonello dos Santos, Matheus Pedrotti De Cesaro, Juliana  
Germano Ferst, Andressa Minuzzi Pereira Dau, Bernardo Garziera  
Gasperin, Paulo Bayard Dias Gonçalves.**

**CIENCIA RURAL, 2015**

**RNA<sub>m</sub> para NPPC é regulado através de EGF-R durante o processo ovulatório em bovinos.**

**NPPC mRNA expression is upregulated through EGF-R during ovulation in cattle.**

**Joabel Tonello dos Santos<sup>I</sup>, Matheus Pedrotti De Cesaro<sup>I</sup>, Juliana Germano Ferst<sup>I</sup>, Andressa Minuzzi Pereira Dau, Bernardo Garziera Gasperin<sup>I</sup>, Paulo Bayard Dias Gonçalves<sup>I\*</sup>**

## **RESUMO**

Em roedores está bem estabelecido que o peptídeo natriurético tipo-C (NPC) atua via receptor peptídeo natriurético tipo 2 (NPR-2) nas células da granulosa e que LH/hCG diminuem os níveis de RNA<sub>m</sub> para o precursor do NPC (NPPC) através da ligação da anfirregulina (AREG) ao receptor EGF-R (*epidermal growth factor receptor*). Utilizando modelos *in vitro* e *in vivo* para estudo das células da granulosa, o objetivo do presente estudo foi avaliar se o NPC regula importantes mediadores da função do LH, AREG e EREG (epirregulina), e se a expressão de seu precursor (NPPC) é regulada positivamente por LH através do EGF-R durante o período ovulatório. Inicialmente, utilizando um modelo *in vivo* de ovulação observou-se um aumento 3h após GnRH na expressão de RNA<sub>m</sub> para AREG e EREG sendo o pico de expressão às 6h após GnRH. Resultados similares foram obtidos utilizando cultivo de células da granulosa (de folículos  $\geq 12$  mm), no qual o LH também aumentou a expressão de RNA<sub>m</sub> para AREG e EREG. No entanto, o tratamento com NPC não alterou a expressão desses genes. A adição de LH ao cultivo aumentou a expressão de RNA<sub>m</sub> para NPPC, sendo essa expressão diminuiu com a utilização do AG-1478 (inibidor do receptor de EGF). O tratamento com diferentes doses de EGF não alterou a expressão dos genes NPPC, NPR-2 e -3 *in vitro*. Finalmente, utilizando o modelo de injeção intrafolicular *in vivo*, constatou-se que o AG-1478 diminuiu a expressão de RNA<sub>m</sub> para NPPC e NPR-3, porém não bloqueou a ovulação quando injetado antes do início do pico esperado de LH (100% das vacas ovularam). A partir desses resultados conclui-se que o NPC não regula AREG e EREG, no entanto, RNA<sub>m</sub> para NPPC é regulado através de EGF-R em células da granulosa de bovinos.

**Palavras-chave:** NPC, AREG, EREG, AG-1478, ovulação, células da granulosa.

## ABSTRACT

In rodents, it is well established that the C-type natriuretic peptide (NPC) acts through natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) and that in granulosa cells LH / hCG decrease mRNA expression of NPC precursor (NPPC) through amphiregulin (AREG) binding to EGF-R (epidermal growth factor receptor). Using *in vitro* and *in vivo* models to study bovine granulosa cells, the objective of this study was to evaluate whether NPC regulates important mediators of LH function, AREG and EREG (epiregulin), and if the expression of its precursor (NPPC) is upregulated by LH through EGF-R during the ovulatory period. Initially, using an *in vivo* model, it was observed an increase in the expression for AREG and EREG 3h after GnRH, peaking at 6 h after GnRH. Using a granulosa cell culture (from  $\geq 12$  mm follicles), LH also increased the expression of mRNA for AREG and EREG. However, the NPC treatment did not alter the expression of these genes. The addition of LH to the cell culture increased mRNA expression for NPPC, and this upregulation decreased after treatment with AG-1478 (EGF receptor inhibitor). Treatment with different doses of EGF did not alter the expression of NPPC, NPR-2 and -3 genes *in vitro*. Finally, using the intrafollicular injection model, AG-1478 decreased mRNA expression for NPPC and NPR-3, but did not block ovulation when performed before the expected LH surge (100% of ovulated cows). From these results, it is concluded that the NPC does not regulate AREG and EREG; however NPPC mRNA is regulated by EGF-R in bovine granulosa cells.

**Key words:** NPC, AREG, EREG, AG-1478, ovulation, granulosa cells.

## INTRODUÇÃO

A ovulação em bovinos é um evento complexo que se assemelha a um processo inflamatório e cursa com a ruptura do estigma ovulatório e liberação do oócito apto a ser fecundado. Esta se inicia no momento em que o tecido folicular é estimulado pelo pico pré-ovulatório de LH. Dentre as rotas de sinalização envolvidas na cascata de eventos celulares que ocorre após o pico do LH *in vivo* e que desencadeiam a ovulação e o reinício da meiose, o sistema EGF (Fator de crescimento epidermal) é descrito como indispensável para a ocorrência destes eventos (PARK et al., 2004; CONTI et al., 2006; PORTELA et al., 2011). Em células da granulosa cultivadas *in vitro* a expressão de RNAm para AREG e EREG está

aumentada após o tratamento com LH (PORTELA et al., 2011). Já *in vivo* foi determinado um aumento da expressão dos fatores de crescimento semelhantes ao EGF (EGF-L) AREG e EREG 6 h após a indução de ovulação (SAYASITH et al., 2013).

O sistema NPs consiste em três peptídeos endógenos com elevada homologia: atrial (NPA), do tipo B (NPB) e do tipo C (NPC) mais três receptores (NPR-1, 2 e 3) localizados na superfície da membrana celular (GARDNER et al., 2007; MISONO et al., 2011; POTTER, 2011) e duas enzimas convertases: corin (YAN et al., 2000) e furin (WU et al., 2003). Os NPs são expressos na forma de precursores: NPPA, NPPB e NPPC que darão origem ao NPA, NPB e NPC respectivamente (NAKAO et al., 1992; POTTHAST & POTTER, 2005; POTTER et al., 2006). NPPA e NPPB tem alta afinidade pelo NPR-1 (SUGA et al., 1992), enquanto o NPC é o principal ligante do NPR-2 (KOLLER et al., 1991), ao passo que o NPR-3 é responsável pela internalização e degradação dos ligantes (MAACK et al., 1987; POTTER et al., 2006).

Os NPs exercem seus efeitos fisiológicos através da interação com receptores na célula-alvo. Foi demonstrada a presença do sistema NPs, ligantes e receptores, no ovário de ratos (JANKOWSKI et al., 1997). Também foi demonstrado que o sistema NPs no ovário de ratas é regulado por gonadotrofinas, especialmente FSH, e que NPC e NPR-2 aparecem como um importante sistema de regulação intraovariano (GUTKOWSKA et al., 1999). Nessa mesma espécie, o estradiol induz a expressão gênica de NPC no útero (ACUFF et al., 1997). Camundongos knockout para NPR-2 não apresentavam corpo lúteo no ovário, e por citologia vaginal esses animais não possuíam indícios de ciclo estral (TAMURA et al., 2004). O NPC atuando via NPR-2 (ZHANG et al., 2010; ZHANG et al., 2011; ZHANG et al., 2014) destaca-se atuando em processos reprodutivos. Em ratos a expressão de NPC e NPR-2, no ovário e útero, é modulada pelo ciclo estral, com máxima expressão no pró-estro (DOS REIS et al., 1995).

Ovários de roedores tratados com hCG exibem marcada diminuição nos níveis de RNAm para NPPC em células da granulosa de folículos pré-ovulatórios (KAWAMURA et al., 2011). Em camundongos, foi demonstrado que o NPC, produzido pelas células murais da granulosa, se liga ao NPR-2 do cumulus e impede o reinício da meiose (ZHANG et al., 2010). Estudos utilizando AREG (anfirregulina - um mediador da atividade do LH/hCG através de EGF-R-*epidermal growth factor receptor*) suprimiram os níveis de RNAm para NPPC e seu receptor em cultura de células da granulosa em roedores (TSUJI et al., 2012). O envolvimento dos NPs na determinação da capacidade ovulatória tem sido demonstrado através da realização de experimentos utilizando modelos de roedores knockout na maioria das vezes (KIYOSU et al., 2012). No entanto, estudos prévios realizados por nosso grupo utilizando bovino evidenciaram uma regulação de expressão diferente, através da ativação LH/EGF/EGF-R.

O LH estimula os EGF-L (AREG e EREG- epirregulina), e também o precursor de NPC (NPPC - dados enviados para publicação) *in vivo*. No entanto não se sabe em espécies monovulares se os NPs regulam ou são regulados através de EGF-R nas células da granulosa, bem como se a via EGF-R é essencial pra ovulação. O entendimento dos mecanismos envolvidos na ovulação possibilita um melhor controle sobre essa função fisiológica servindo como bases para melhor explorar o potencial reprodutivo de fêmeas e/ou técnicas contraceptivas com menos efeitos colaterais. O modelo de injeção intrafolicular aliado à dinâmica folicular e à ovariectomia em momentos estratégicos, nos permite determinar a expressão de diferentes fatores e seus receptores momentos antes, durante e após o pico de LH. Os objetivos do presente estudo foram avaliar se o NPC regula AREG e EREG e se a expressão de RNAm para NPPC, NPR-2 e NPR-3 é regulada positivamente por LH através de EGF-R *in vivo* e *in vitro* em células da granulosa de bovinos durante o período ovulatório.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### *Animais, injeção intrafolicular e dinâmica folicular*

Foram utilizadas vacas adultas cíclicas não lactantes das raças Hereford e Red Angus com condição corporal  $\geq 3$  (1-5) e peso de aproximadamente 450Kg. Os animais tiveram uma nova onda folicular induzida. Brevemente, no dia 0 do protocolo, foram realizadas duas aplicações de cloprostenol sódico (PGF2alfa, Ourofino, Brasil) com intervalo de 12 horas, totalizando 500 $\mu$ g (IM), 2mg de benzoato de estradiol (BE) e um implante intravaginal de progesterona (DIB; 1g; Intervet/Schering-Plough, Brasil), o qual permaneceu por nove dias. Os animais nos quais o maior folículo em crescimento que atingiu diâmetro  $\geq 12$  mm receberam GnRH (100 $\mu$ g de acetato de gonadorelina, IM; Tortuga, Brasil) e foram submetidos a injeção intrafolicular (todas a injeções ou ovariectomia conforme o experimento).

As injeções intrafoliculares foram guiadas por ultrassom (Aquila Vet, Pie Medical Equipment BV, Holanda) equipado com uma sonda convexa de 7,5MHz. Para a aplicação dos tratamentos no folículo-alvo, foi utilizado um sistema de duas vias acoplado a uma guia de biopsia, conforme descrito por Ferreira et al. (2007). Após a aplicação dos tratamentos, foi realizado monitoramento ultrassonográfico a cada 24h. A ovulação foi caracterizada quando se observou o desaparecimento do folículo tratado entre duas avaliações e, posteriormente, a formação do corpo lúteo.

### *Cultivo primário de células da granulosa*

Para a obtenção das células da granulosa, pares de ovários bovinos que não apresentaram corpo lúteo foram obtidos em abatedouro, imediatamente após o abate, e transportados para o laboratório em solução salina a 30°C. O tempo total decorrido durante a coleta dos ovários e o início do cultivo não ultrapassou 2 h. A partir de cada par de ovários, foi realizado o isolamento das células da granulosa de folículos com diâmetro pré-ovulatório ( $\geq 12$  mm). Após o isolamento as células foram centrifugadas a 200g por 10 min com solução

Dulbecco's PBS por três vezes e filtradas. A seguir as células foram ressuspensas no meio de cultivo, sendo neste momento realizada a contagem e estimativa de viabilidade celular pelo uso da coloração azul de tripano. As células foram cultivadas em uma densidade de  $1 \times 10^6$  células viáveis/mL de meio DMEM-(Invitrogen), adicionado de 0,1% de BSA (Sigma), 10ng mL<sup>-1</sup> de Insulina (Sigma), 100UI/mL de penicilina (Invitrogen), 100µg mL<sup>-1</sup> de streptomina (Invitrogen) e 25 µg mL<sup>-1</sup> anfotericina (Sigma) em estufa com condição apropriada (37°C, 21% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>) por 6 horas em placas de cultura (4 poços). As células da granulosa foram congeladas a -80°C para a extração de RNA. Os experimentos utilizando cultivo de células da granulosa *in vitro* foram realizados com no mínimo três réplicas por tratamento.

#### Estudos de expressão gênica

As células recuperadas após o cultivo celular ou ovariectomia tiveram o RNA total extraído através do protocolo de extração utilizando tiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio (Trizol®) ou colunas de sílica (AllPrep® DNA/RNA/Protein), respectivamente. Para quantificar o RNA extraído, a densidade ótica foi determinada através de espectrofotômetro (NanoDrop) e a pureza avaliada através da taxa de absorção da relação OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> onde não foram utilizados valores inferiores a 1.8. O RNA total foi tratado com DNase (Promega, Madison, WI) a 37°C por 15 min para digerir qualquer DNA contaminante. A reação de transcrição reversa foi realizada com 1mM oligo (dT) primer, Omniscript RTase, dNTP's e inibidor da RNase. A expressão gênica foi realizada por PCR em tempo real, sendo a variabilidade na quantidade de RNAm acessada em relação a amplificação do gene *housekeeping* ciclofilina (LEDOUX et al., 2006). A sequência dos *primers* utilizada está descrita na tabela 1.

#### *Experimento 1- Validação do modelo de estudo in vivo.*

Para validar o modelo para estudo do processo ovulatório *in vivo* através da expressão dos EGF-L (AREG e EREG), trinta vacas tiveram uma nova onda sincronizada conforme descrito acima. Vacas que tiveram folículos pré-ovulatórios responsivos ao GnRH ( $\geq 12$  mm)

foram desafiadas com 100 µg de acetato gonadorelina (Profertil®, Tortuga, Brasil) im 12 h após a remoção do dispositivo intravaginal de progesterona. Após o tratamento os animais foram ovariectomizados nos diferentes tempos pós-GnRH (0, 3, 6, 12 e 24 h) por colpotomia, como descrito por Drost et al. (1992).

*Experimento 2 - Efeito do NPC na expressão de RNAm de AREG e EREG em células da granulosa in vitro.*

Neste experimento, utilizando um modelo de cultivo de células da granulosa, foi avaliado o efeito do tratamento com NPC sobre a expressão de RNAm dos genes AREG e EREG nas células da granulosa após 6 h de cultivo. As células foram cultivadas conforme descrito acima na presença ou ausência de LH (400ng ml<sup>-1</sup>) combinado ou não com NPC (1 µg ml<sup>-1</sup>-Sigma Aldrich, USA), constituindo os seguintes grupos: células da granulosa (controle negativo; C-); células da granulosa + LH (LH); células da granulosa + NPC (NPC) e células da granulosa + LH + NPC (LH + NPC).

*Experimento 3 – LH estimula a expressão de NPPC via EGF-R em células da granulosa in vitro.*

Buscou-se responder se o tratamento com LH *in vitro* também altera a expressão de RNAm para NPPC, NPR-2 e NPR-3, para melhor validar o modelo de estudo *in vitro*. Também foi utilizado um inibidor do receptor de EGF (AG-1478) para testar a hipótese de que a ação do LH através desse receptor determina o aumento da expressão de RNAm para NPPC. As células da granulosa foram cultivadas conforme descrito acima na presença ou ausência de LH (400ng ml<sup>-1</sup>) combinado ou não com AG 1478 (Sigma Aldrich, USA), constituindo os seguintes grupos: células da granulosa (controle negativo; C-); células da granulosa + LH (LH); células da granulosa + LH + AG 1478 (0,5 µM – AG0,5) e células da granulosa + LH + AG 1478 (5 µM – AG5).

*Experimento 4 – Bloqueio da sinalização via EGF-R in vivo: efeito sobre NPPC e NPRs.*

Para avaliar o efeito do bloqueio de EGF-R na expressão de RNAm para NPPC, NPR-2 e NPR-3 nas células da granulosa do folículo pré-ovulatório, 20 vacas cíclicas foram



sincronizadas conforme descrito acima. Quando o diâmetro do maior folículo atingiu 12 mm ou mais, os animais foram aleatoriamente distribuídos para receber uma injeção intrafolicular dos seguintes tratamentos: solução salina fosfatada (PBS - Controle) ou AG-1478 (5  $\mu$ M de concentração intrafolicular – AG5). Juntamente com a injeção intrafolicular os animais receberam GnRH (100 $\mu$ g de acetato de gonadorelina, im; Tortuga, Brasil). Após 6 h da injeção intrafolicular foi realizada a castração dos animais pra recuperação das células da granulosa.

*Experimento 5 – O bloqueio da sinalização via EGF-R: efeito sobre a ovulação.*

Para avaliar o efeito do bloqueio de EGF-R na ovulação, 30 vacas cíclicas tiveram uma nova onda folicular induzida e monitorada conforme descrito acima. Quando o diâmetro do maior folículo atingiu 12 mm ou mais, os animais foram aleatoriamente distribuídos para receber uma injeção intrafolicular dos seguintes tratamentos: PBS (Controle); AG 1478 (0,5  $\mu$ M de concentração intrafolicular – AG0,5) e AG 1478 (5  $\mu$ M de concentração intrafolicular – AG5). Juntamente com a injeção intrafolicular os animais receberam GnRH (100 $\mu$ g de acetato de gonadorelina, im; Tortuga, Brasil). A ovulação foi monitorada diariamente conforme descrito acima.

Análise estatística

As variáveis foram testadas para normalidade e, quando necessário, foi aplicado um método de normalização de acordo com a distribuição dos dados. Quando verificado um efeito do tratamento, a média entre os grupos foi comparada utilizando o LSM (*least squares means*). Todas as análises foram realizadas com o pacote estatístico SAS e adotado como nível de significância  $P \leq 0,05$ .

## **RESULTADOS**

*Experimento 1 - Validação do modelo de estudo in vivo.*

Foi observado um aumento na expressão de RNAm para AREG (Figura 1A) e EREG (Figura 1B) já nas 3h após o GnRH, sendo o pico de expressão às 6 h, ocorrendo uma marcada diminuição em relação ao pico de expressão nas 12 e 24h após GnRH.

*Experimento 2 – Efeito do NPC na expressão de RNAm de AREG e EREG em células da granulosa in vitro.*

De forma similar ao observado *in vivo*, o LH aumentou a expressão de RNAm para AREG (Figura 1C) e EREG (Figura 1D) em cultivo de células da granulosa 6h após o tratamento. Entretanto, o tratamento com NPC combinado ou não com LH não alterou a expressão de RNAm para AREG e EREG (Figura 1C e 1D).

*Experimento 3 - LH estimula a expressão de NPPC via EGF-R em células da granulosa in vitro.*

O LH regulou positivamente a expressão de RNAm para NPPC e este efeito foi inibido após o bloqueio do EGF-R (Figura 2A). Não foi observada regulação na expressão de RNAm para NPR-2 e NPR-3 (Figura 2B e C) por LH associado ou não ao AG 1478.

*Experimento 4 – Bloqueio da sinalização via EGF-R in vivo: efeito sobre NPPC e NPRs.*

Onze das vinte vacas foram utilizadas para castração, sendo os outros animais descartados do estudo por não apresentarem diâmetro folicular esperado ( $\geq 12$  mm) ou pela diminuição do diâmetro folicular logo após o procedimento de injeção intrafolicular. Três das onze vacas foram descartadas por falhas na técnica de castração ou contaminação cruzada das células da granulosa com outros tipos celulares. Os oito animais restantes foram distribuídos aleatoriamente nos grupos Controle (n= 4) e AG5 (n=4). A injeção intrafolicular de AG1478 (5  $\mu$ g/mL) foi capaz de diminuir a expressão de RNAm para NPPC em relação ao grupo controle (Figura 3A). A expressão de RNAm para NPR-2 não foi regulada nas células da

granulosa. Entretanto, a expressão de RNAm para NPR-3 teve um aumento no grupo AG5 em relação ao grupo controle.

*Experimento 5 – O bloqueio da sinalização via EGF-R: efeito sobre a ovulação.*

Para complementar o experimento 5, foi avaliado ainda se a ativação do EGF-R é essencial para ovulação na espécie bovina. Trinta vacas cíclicas tiveram uma nova onda folicular induzida e monitorada conforme descrito acima. Vinte e duas das 30 vacas foram utilizadas, sendo os outros animais descartados do estudo por não apresentarem diâmetro folicular esperado ( $\geq 12$  mm) ou pela ocorrência de algum erro na técnica de injeção intrafolicular. Quando o diâmetro do maior folículo atingiu 12 mm ou mais, os vinte e dois animais foram aleatoriamente distribuídos para receber uma injeção intrafolicular dos seguintes tratamentos: PBS (Controle; n=7) e AG 1478 (0,5  $\mu$ M – AG0,5; n=7) e AG 1478 (5  $\mu$ M – AG5; n=8). A ovulação foi monitorada diariamente conforme descrito acima, sendo que todas as vacas ovularam entre 24-48 h após a injeção intrafolicular, independente do grupo.

## **DISCUSSÃO**

Os principais achados deste estudo são: 1) Os modelos *in vivo* e *in vitro* utilizados são adequados para estudos de ovulação uma vez que em ambos o tratamento com GnRH/LH aumenta a expressão de RNAm para AREG e EREG nas células da granulosa; 2) O NPC não regula a expressão de RNAm para AREG e EREG *in vitro*; 3) O RNAm para NPPC é regulado através do EGF-R *in vivo* e *in vitro* enquanto que RNAm para NPR-3 também é regulado via EGF-R *in vivo*; 4) O bloqueio do EGF-R não foi capaz de bloquear a ovulação em bovinos nas condições do presente estudo. Esses resultados sugerem que o NPC em bovinos está relacionado a eventos pró-ovulação e luteinização, diferindo do que foi relatado em espécies multiovulatórias. (TSUJI et al., 2012; ZHANG et al., 2014). Além disso, este é o

primeiro trabalho a demonstrar a regulação do NPR-3 em processos reprodutivos regulados por LH.

Embora já fosse determinado um aumento na expressão nos níveis de AREG e EREG a partir de LH *in vitro* (PORTELA et al., 2011) e *in vivo* (SAYASITH et al., 2013), a expressão destes genes ao longo de todo o processo ovulatório *in vivo* ainda não era conhecida. No experimento 1, já nas primeiras horas após o tratamento com GnRH se observou um aumento na expressão nos níveis de AREG e EREG, tendo o seu pico de expressão após 6 h (Figura 1A e 1B). Esses resultados, aliado aos resultados dos estudos citados acima utilizando modelos semelhantes, validaram o modelo utilizado e forneceram subsídios para a escolha dos melhores horários para análise de expressão dos genes de interesse neste estudo.

Apesar da grande quantidade de trabalhos sobre a regulação dos NPs nas células foliculares (TSUJI et al., 2012; ZHANG et al., 2014; ZHANG et al., 2015) a regulação destes em bovinos permanecia desconhecida. Uma das hipóteses seria que o NPC pudesse agir como cofator da ação do LH na regulação dos EGF-L, semelhante a AngII (PORTELA et al., 2011). No entanto, no experimento 2 não foi observado nenhum efeito na expressão de AREG e EREG (Figura 1C e 1D) nos grupos tratados com NPC. Não houve regulação de RNAm para AREG e EREG por NPC, sugerindo que a ativação do NPC ocorre posteriormente à ativação do EGF-R durante a ovulação.

Estudos anteriores do nosso grupo demonstraram um aumento na expressão de RNAm para NPPC após o tratamento com GnRH (dados submetidos para publicação). Para melhor entender a regulação da expressão de RNAm para NPPC *in vivo*, buscou-se responder se o tratamento com LH *in vitro* também alterava a expressão de RNAm para NPPC em células da granulosa. No experimento 3, utilizando cultivo de células da granulosa, foi observado um aumento na expressão de RNAm para NPPC 6 h após o tratamento com LH (Figura 2A),

semelhante aos resultados *in vivo* (dados submetidos para publicação). Também nesse experimento foi demonstrado que a ação do LH sobre o NPPC ocorre através de EGF-R, uma vez que, quando foi utilizado o inibidor do receptor de EGF (AG-1478; 0,5 e 5 $\mu$ M) combinado com LH não foi observado o aumento na expressão de RNAm para NPPC em comparação com o grupo LH (Figura 2A). Uma regulação via EGF-R foi demonstrada em roedores, porém oposta aos nossos resultados, na qual o AG-1478 reestabelece os níveis de RNAm para NPPC anteriores à diminuição provocada pelo LH (TSUJI et al., 2012). A expressão de RNAm para NPR-2 não foi regulada por LH nem por AG-1478 em células da granulosa cultivadas *in vitro* (Figura 2B). Resultados obtidos *in vivo* por nosso grupo haviam demonstrado não haver regulação após aplicação de GnRH de RNAm para NPR-2. No entanto, a expressão de RNAm para NPR-3 estava diminuída em células da granulosa 6 h após o tratamento com GnRH (dados submetidos para publicação). Embora não tenha havido uma diminuição significativa para o NPR-3 no cultivo *in vitro* de células da granulosa, houve uma tendência à diminuição de RNAm para este gene no grupo LH em relação ao grupo C- (Figura 2C).

Contrariando os dados demonstrados em suínos (ZHANG et al., 2014) e roedores (TSUJI et al., 2012), o bloqueio do EGF-R tanto *in vivo* quanto *in vitro* diminuiu os níveis de RNAm para NPPC nas células da granulosa de bovinos. A expressão de RNAm para NPR-2 não foi regulada após bloqueio do EGF-R. Entretanto foi observado um aumento na expressão do NPR-3 após bloqueio do EGF-R em relação ao grupo Controle. Este resultado sugere que a diminuição na expressão de NPR-3 observada 6 h após aplicação de GnRH *in vivo* é mediada pela ativação do EGF-R (dados submetidos para publicação). Em conjunto, esses resultados sugerem que o NPPC tem um papel importante na cascata ovulatória, uma vez que a expressão de RNAm para NPPC está aumentada e a expressão de RNAm para NPR-3 (receptor responsável pela sua degradação) está diminuída. No experimento 5 a injeção

intrafolicular de AG-1478, embora diminua a expressão de RNAm para NPPC, não foi capaz de bloquear a ovulação em bovinos, uma vez que, todos os animais ovularam no tempo esperado (24 a 48 h após aplicação de GnRH). A função de mediadores da função do LH dada aos EGF-L é incontestável, entretanto a ovulação dos animais com AG-1478 pode sugerir uma rota alternativa durante a ovulação de bovinos. Em resumo, o LH regula positivamente a expressão de RNAm para NPPC. Quando é bloqueado o EGF-R esse aumento na expressão RNAm para NPPC é inibido *in vitro* e *in vivo*.

## **CONCLUSÃO**

A expressão de RNAm para NPPC é induzida por LH através da ativação do EGF-R em células da granulosa de bovinos. O fato da expressão do NPR-3 ser positivamente regulada após bloqueio do EGF-R em vacas tratadas com GnRH sugere que a degradação do NPC é inibida após o pico de LH. Coletivamente, os resultados do presente estudo demonstram evidências de que, ao contrário do observado em roedores, o NPC possui uma função positiva durante a ovulação/luteinização em bovinos.

## **SUPORTE FINANCEIRO**

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul - FAPERGS e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

## **COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA**

**Processos número 23081.004717/2010-53 e 115/2014**

## **REFERÊNCIAS**

ACUFF, C. G., et al. Estradiol induces C-type natriuretic peptide gene expression in mouse uterus. **Am J Physiol**, v.273, n.6 Pt 2, p.H2672-7. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9435603>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi.

CONTI, M., et al. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. **Mol Endocrinol**, v.20, n.4, p.715-23. 2006. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16051667](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16051667)

<<http://mend.endojournals.org/cgi/reprint/20/4/715.pdf>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: me.2005-0185 [pii]

10.1210/me.2005-0185.

DOS REIS, A. M., et al. Characterization and distribution of natriuretic peptide receptors in the rat uterus. **Endocrinology**, v.136, n.10, p.4247-53. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7664642>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi.

DROST, M., et al. Ovariectomy by colpotomy in cows. **J Am Vet Med Assoc**, v.200, n.3, p.337-9. 1992. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1548167](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1548167)>. Acesso em: 28 out. 2010. doi.

FERREIRA, R., et al. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. **Reproduction**, v.134, n.5, p.713-9. 2007. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17965262](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17965262)

<<http://www.reproduction-online.org/cgi/reprint/134/5/713.pdf>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: 134/5/713 [pii]

10.1530/REP-07-0239.

GARDNER, D. G., et al. Molecular biology of the natriuretic peptide system: implications for physiology and hypertension. **Hypertension**, v.49, n.3, p.419-26. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17283251>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: 01.HYP.0000258532.07418.fa [pii]

10.1161/01.HYP.0000258532.07418.fa.

GUTKOWSKA, J., et al. Hormonal regulation of natriuretic peptide system during induced ovarian follicular development in the rat. **Biol Reprod**, v.61, n.1, p.162-70. 1999. Disponível em:

<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10377045](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10377045)>. Acesso em: 28 out. 2010. doi.

JANKOWSKI, M., et al. C-type natriuretic peptide and the guanylyl cyclase receptors in the rat ovary are modulated by the estrous cycle. **Biol Reprod**, v.56, n.1, p.59-66. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9002633>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi:

KAWAMURA, K., et al. Pre-ovulatory LH/hCG surge decreases C-type natriuretic peptide secretion by ovarian granulosa cells to promote meiotic resumption of pre-ovulatory oocytes. **Hum Reprod**, v.26, n.11, p.3094-101. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21865234>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: der282 [pii]

10.1093/humrep/der282.

KIYOSU, C., et al. NPPC/NPR2 signaling is essential for oocyte meiotic arrest and cumulus oophorus formation during follicular development in the mouse ovary. **Reproduction**, v.144, n.2, p.187-93. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22696190>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: 10.1530/REP-12-0050.

KOLLER, K. J., et al. Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). **Science**, v.252, n.5002, p.120-3. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1672777>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi:

LEDOUX, S., et al. Adiponectin induces periovulatory changes in ovarian follicular cells. **Endocrinology**, v.147, n.11, p.5178-86. 2006. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16916953](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16916953)

<<http://endo.endojournals.org/cgi/reprint/147/11/5178.pdf>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: en.2006-0679 [pii]

10.1210/en.2006-0679.

LI, Q., et al. Gene expression profiling of bovine preovulatory follicles: gonadotropin surge and prostanoid-dependent up-regulation of genes potentially linked to the ovulatory process. **Reproduction**, v.137, n.2, p.297-307. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18996975>

<<http://www.reproduction-online.org/content/137/2/297.full.pdf>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: REP-08-0308 [pii]

10.1530/REP-08-0308.



MAACK, T., et al. Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. **Science**, v.238, n.4827, p.675-8. 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2823385>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi.

MISONO, K. S., et al. Structure, signaling mechanism and regulation of the natriuretic peptide receptor guanylate cyclase. **FEBS J**, v.278, n.11, p.1818-29. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21375693>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08083.x.

NAKAO, K., et al. Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. I: Natriuretic peptides. **J Hypertens**, v.10, n.9, p.907-12. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1328371>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi.

PARK, J. Y., et al. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. **Science**, v.303, n.5658, p.682-4. 2004. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14726596](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14726596)

<<http://www.sciencemag.org/content/303/5658/682.full.pdf>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: 10.1126/science.1092463

1092463 [pii].

PORTELA, V. M., et al. Role of Angiotensin II in the Perioovulatory Epidermal Growth Factor-Like Cascade in Bovine Granulosa Cells In Vitro. **Biol Reprod**. 2011. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=21849708](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21849708)

<<http://www.biolreprod.org/content/early/2011/08/17/biolreprod.111.094193.full.pdf>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: biolreprod.111.094193 [pii]

10.1095/biolreprod.111.094193.

POTTER, L. R. Natriuretic peptide metabolism, clearance and degradation. **FEBS J**, v.278, n.11, p.1808-17. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21375692>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08082.x.

POTTER, L. R., et al. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. **Endocr Rev**, v.27, n.1, p.47-72. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16291870>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: er.2005-0014 [pii]

10.1210/er.2005-0014.

POTTHAST, R.; L. R. POTTER. Phosphorylation-dependent regulation of the guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors. **Peptides**, v.26, n.6, p.1001-8. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15911068>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: S0196-9781(05)00083-5 [pii]

10.1016/j.peptides.2004.08.033.

SAYASITH, K., et al. Human chorionic gonadotropin-dependent up-regulation of epiregulin and amphiregulin in equine and bovine follicles during the ovulatory process. **Gen Comp Endocrinol**, v.180, p.39-47. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23178756>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: 10.1016/j.ygcen.2012.10.012

S0016-6480(12)00422-4 [pii].

SUGA, S., et al. Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. **Endocrinology**, v.130, n.1, p.229-39. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1309330>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi:

TAMURA, N., et al. Critical roles of the guanylyl cyclase B receptor in endochondral ossification and development of female reproductive organs. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.101, n.49, p.17300-5. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15572448>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: 0407894101 [pii]

10.1073/pnas.0407894101.

TSUJI, T., et al. CNP/NPR2 signaling maintains oocyte meiotic arrest in early antral follicles and is suppressed by EGFR-mediated signaling in preovulatory follicles. **Mol Reprod Dev**, v.79, n.11, p.795-802. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22987720>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: 10.1002/mrd.22114.

WU, C., et al. Furin-mediated processing of Pro-C-type natriuretic peptide. **J Biol Chem**, v.278, n.28, p.25847-52. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12736257>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: 10.1074/jbc.M301223200

M301223200 [pii].

YAN, W., et al. Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.97, n.15, p.8525-9. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10880574>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: 10.1073/pnas.150149097

150149097 [pii].

ZHANG, M., et al. Estradiol promotes and maintains cumulus cell expression of natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) and meiotic arrest in mouse oocytes in vitro. **Endocrinology**, v.152, n.11, p.4377-85. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21914782>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: en.2011-1118 [pii]

10.1210/en.2011-1118.

ZHANG, M., et al. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. **Science**, v.330, n.6002, p.366-9. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20947764>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: 330/6002/366 [pii]

10.1126/science.1193573.

ZHANG, W., et al. Epidermal growth factor-network signaling mediates luteinizing hormone regulation of BNP and CNP and their receptor NPR2 during porcine oocyte meiotic resumption. **Mol Reprod Dev**, v.81, n.11, p.1030-41. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25348585>

<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mrd.22424/abstract>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: 10.1002/mrd.22424.

ZHANG, W., et al. Brain natriuretic peptide and C-type natriuretic peptide maintain porcine oocyte meiotic arrest. **J Cell Physiol**, v.230, n.1, p.71-81. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24912131>>. Acesso em: 28 out. 2010. doi: 10.1002/jcp.24682.

*Tabela 1* – Sequencia e concentração dos *primers* usados na análise de expressão dos genes candidatos.

Gene	Sequencia	Conc. (µM)	Referencia ou n° de acesso.
Ciclofilina	F GGTCATCGGTCTCTTTGGAA	200	<i>(LEDOUX et al., 2006)</i>
	R TCCTTGATCACACGATGGAA CCATTTTCTTGTCGAAGTTT	200	
AREG	F CTTTC	200	<i>(LI et al., 2009)</i>
	R TGTTTTTATTACAATCCTGCTTCG AA	200	
EREG	F ACTGCACAGCATTAGTTCAAAGTGA	200	XM_010806226.1
	R TGTCCATGCAAACAGTAGC CATT	200	
NPPC	F CAACGCGCGCAAATACAA	200	NM_174125.2
	R TCAGCAAAACGCAGCAAGTC	200	
NPR-1	F AATTATGGCTCCCTACTAACCACAGA	200	ENSBTAT0000 0008184
	R TCCGGTTCACACGTTTCACA	200	
NPR-2	F TCTGCTCCTAAGCTGGGTGAGT	200	ENSBTAT00000015204
	R CGGTCATCTGTGCGAGCAT	200	
NPR-3	F TTTGAAGCTAAGCAAGCGTACTCA	200	NM_174127.2
	R CAGAACTTTTCACCTCCATGGAA	200	

F, Forward primer; R, Reverse primer; Conc., primer concentration used for gene amplification.

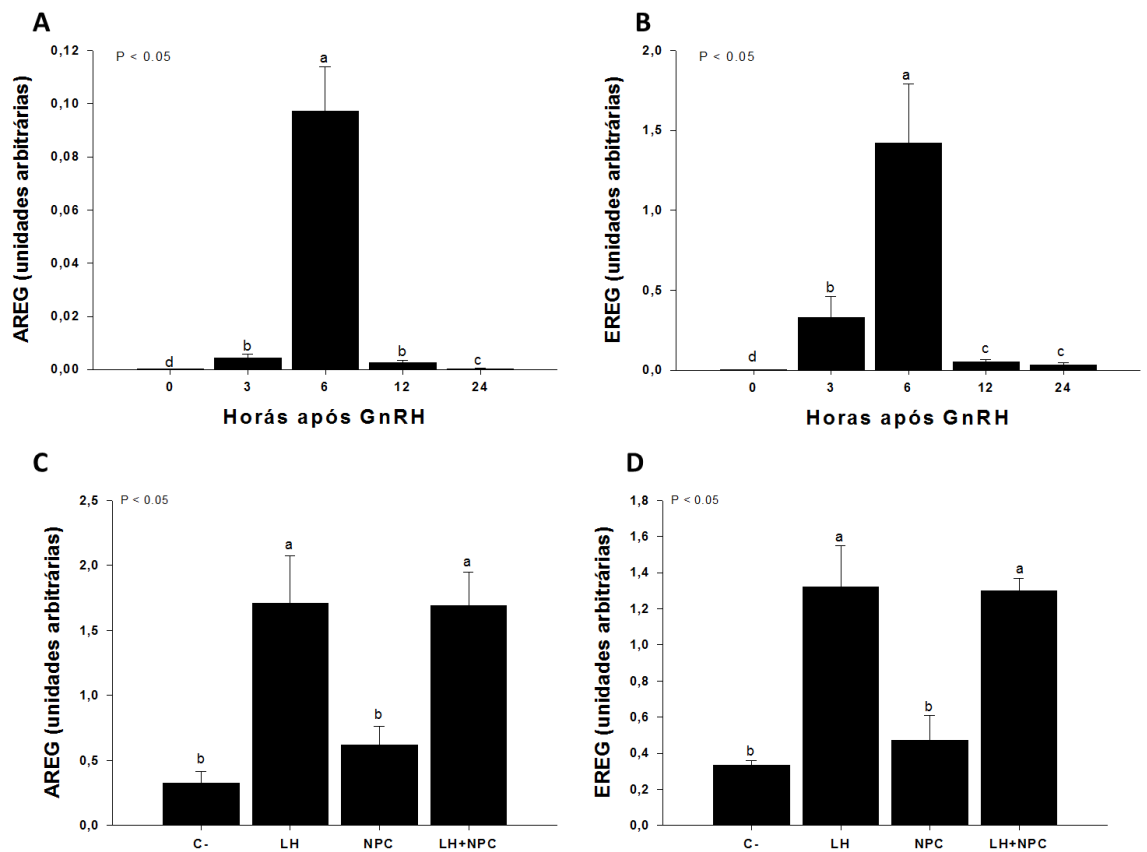


FIGURA 1: Expressão relativa de RNAm (média  $\pm$  erro padrão da média) para AREG (A) e EREG (B) em células da granulosa obtidas após 0, 3, 6, 12 e 24 h (n= 5/6 animais por tempo) após tratamento com GnRH para a indução do pico de LH. Expressão de RNAm de AREG (C) e EREG (D) APÓS 6 h de cultivo em células da granulosa tratadas com e sem LH (400 ng/ml) combinado ou não ao NPC. Diferentes letras indicam diferença estatística ( $P < 0.05$ ).

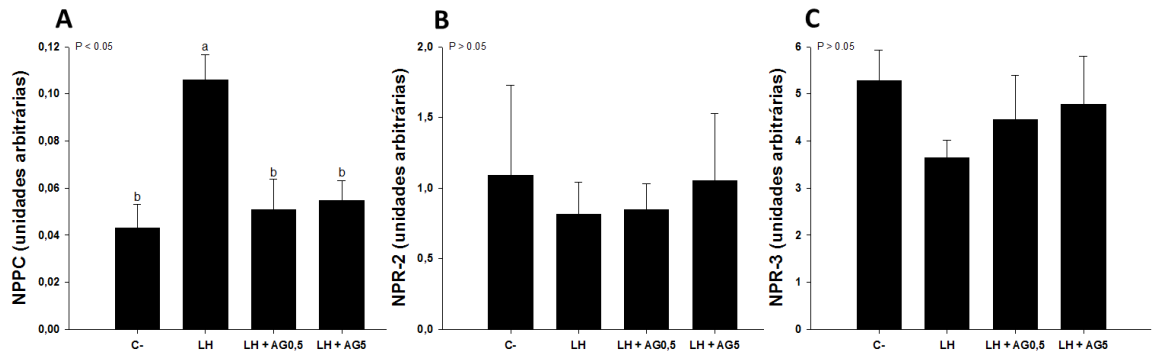


FIGURA 2: Expressão relativa de RNAm (média  $\pm$  erro padrão da média) para NPPC (A), NPR-2 (B) e NPR-3 (C) em células da granulosa tratadas com LH (400ng/ml) e com inibidor de EGF-R (AG1478 0,5 e 5 $\mu$ M) após 6 h de cultivo. Diferentes letras indicam diferença estatística ( $P < 0.05$ ).

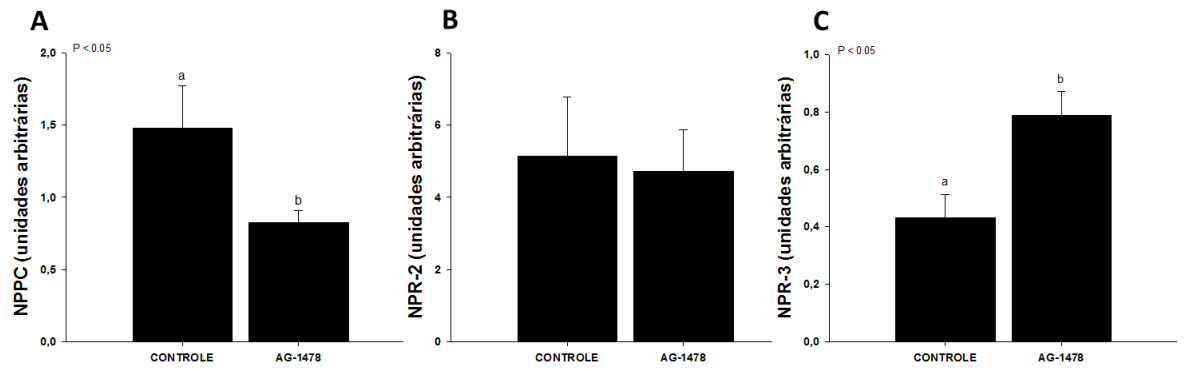


FIGURA 3: Expressão relativa de RNAm (média  $\pm$  erro padrão da média) para NPPC (A), NPR-2 (B) e NPR-3 (C) em células da granulosa tratadas com LH (400ng/ml) e com inibidor de EGF-R (AG1478 0,5 e 5 $\mu$ M) após 6 h de cultivo. Diferentes letras indicam diferença estatística (P<0.05).

## DISCUSSÃO

Participando da busca pelo conhecimento, nosso grupo iniciou uma série de estudos investigando o papel de determinados fatores em funções da fisiologia reprodutiva. Dentre eles destaca-se a participação de fatores locais em eventos como a ovulação. No entanto, a descoberta desses fatores, em sua maioria, se dá através de experimentos realizados *in vivo* ou *in vitro*, isoladamente. Além do interesse e importância econômica do bovino em nosso país, a vaca pode ser um modelo mais adequado para o estudo da fisiologia reprodutiva humana, pois é uma espécie monovulatória (ADAMS et al., 2012; GINTHER, 2012), diferente de roedores onde há ovulação de múltiplos folículos, ausência de divergência folicular e a coexistência de vários corpos lúteos durante a gestação (JAISWAL et al., 2009). Apesar disso, em um contexto global a maior parte do conhecimento utilizado para manipulação da fisiologia e tratamento em mulheres vem sendo gerado em roedores. A associação de experimentos *in vivo* e *in vitro* com a utilização do bovino como modelo experimental nos possibilita uma maior compreensão de como os sistemas locais agem em eventos como a ovulação. Além disso, a utilização do bovino nos permite a manipulação do ambiente folicular através da técnica de injeção intrafolicular, bem como uma caracterização temporal ao longo do processo ovulatório de diferentes fatores hipoteticamente envolvidos nesse processo. O entendimento destes mecanismos envolvidos na ovulação serve como base para melhor explorar o potencial reprodutivo de fêmeas e/ou elaborar técnicas contraceptivas com menos efeitos colaterais

Nosso primeiro estudo (artigo 1) teve como objetivos: detectar a proteína do receptor MAS e avaliar o efeito da Ang-(1-7) sobre a expressão de RNAm para EREG nas células da granulosa bovina, avaliar o efeito do bloqueio do receptor MAS sobre a expressão de EREG, induzida por LH *in vitro*, e sobre a taxa de ovulação induzida por GnRH *in vivo*. A proteína do receptor MAS foi detectada em fragmento de ovário bovino e em células da granulosa isoladas de folículo > 12 mm. A Ang-(1-7) não alterou o padrão de expressão de RNAm para EREG nas células da granulosa, quando estas foram cultivadas na ausência de LH, assim como o bloqueio do receptor MAS também não alterou o padrão de expressão de RNAm de EREG no cultivo celular suplementado com LH. O bloqueio do receptor da Ang-(1-7) *in vivo* não foi efetivo para bloquear a ovulação em bovinos, ao contrário do que acontece com o bloqueio dos receptores para Ang II (FERREIRA et al., 2007a).

É possível que a Ang-(1-7) atue nos instantes finais da ovulação relacionados com a ruptura do folículo e luteinização, visto que neste estudo, ao contrário do que ocorre com Ang



II (PORTELA et al., 2011), não foi observado efeito da Ang-(1-7) sobre a expressão de EREG. Nesse sentido, cultivos *in vitro* com suplementação de tratamentos por um maior período podem agregar conhecimentos sobre um possível papel da Ang-(1-7) nesses eventos, podendo-se utilizar uma molécula ativada pela ligação Ang(1-7)/MAS. Entretanto, deve-se considerar que a Ang-(1-7) é um peptídeo derivado da clivagem da Ang II (FELIX et al., 1991) e pode não possuir uma ação direta no processo de ovulação em bovinos, contrariando os dados obtidos em espécies de ovulação múltipla. (VIANA et al., 2011), utilizando um modelo de perfusão de ovários de coelhas, demonstraram que a Ang-(1-7) é capaz de induzir a ovulação e produção de estradiol na ausência de gonadotrofinas. Além disso, o bloqueio de seu receptor foi capaz de inibir o efeito das gonadotrofinas na ovulação. A partir dos nossos resultados, não foi possível evidenciar um papel relevante da Ang-(1-7) durante os momentos iniciais da cascata da ovulação. No entanto, considerando que o antagonista da Ang-(1-7) foi injetado no início do processo de ovulação (simultaneamente com a aplicação de GnRH), não pode ser excluído um efeito mais tardio.

Os NPs e suas funções vêm sendo descritas em células ovarianas de outras espécies como suínos (ZHANG et al., 2014) e caprinos (PENG et al., 2013) além de roedores, mas a regulação dos NPs ainda não está clara em espécies monovulatórias durante o processo de ovulação. O envolvimento funcional dos NPs na determinação da capacidade ovulatória tem sido demonstrada através da realização de experimentos utilizando modelos de roedores knockout na maioria das vezes (TAMURA et al., 2004; KIYOSU et al., 2012). A caracterização dos NPs, seus receptores e enzimas convertases durante a ovulação nos permite uma melhor compreensão do papel destes fatores em espécies monovulatórias além de nos possibilitar futuros estudos funcionais envolvendo os peptídeos. Para isso o objetivo do nosso segundo estudo foi avaliar o padrão de expressão de RNAm em células da granulosa de bovinos para os precursores dos NPs, receptores e enzimas convertases deste sistema após a ovulação induzida pelo GnRH/ LH *in vivo*.

No segundo estudo (artigo 2) foi caracterizada pela primeira vez a expressão de RNAm para os componentes do sistema NPS (exceto RNAm para NPPB) em células da granulosa em resposta ao LH em uma espécie monovulatória. Além disso, observou-se que a expressão de RNAm para NPPC é regulada positivamente pelo GnRH/ LH, em contraste ao que foi demonstrado anteriormente em roedores (KAWAMURA et al., 2011; LEE et al., 2013). Outros resultados importantes foram o aumento da expressão de mRNA para NPR-1 e furin nas 24 h e a diminuição na NPR-3 já nas 6 h após tratamento com GnRH. Considerando-se que os níveis de ANP e NPC dependem não só da sua síntese, mas também da degradação,

a diminuição na expressão de RNAm para NPR-3 6 h após GnRH sugere uma menor degradação destes peptídeos, especialmente NPC, porque além do NPR-3, a endopeptidase neutra (NEP) também degrada NPA. Sabe-se que a atividade enzimática da NEP diminui após o tratamento com eCG (PEREIRA et al., 2009) e aumenta em ovários policísticos (PCO) de ratas (PEREIRA et al., 2014). No nosso modelo experimental, o padrão de expressão de RNAm para NEP aumentou 12 h após o GnRH (SANTOS et al., 2011). Este resultado sugere que o NPC é mais importante que o NPA no processo ovulatório, uma vez que a expressão de RNAm para NPPA e corin não são reguladas pelo GnRH/LH e os níveis de NPA dependem do equilíbrio entre a síntese e degradação do peptídeo e, esta degradação pode ser mediada por NEP ou NPR-3. Em resumo, este estudo utilizando uma abordagem *in vivo* confirmou a presença de vários componentes do sistema NPs durante a ovulação em bovinos e que o aumento na expressão de RNAm para NPPC e furin aliada a diminuição na NPR-3 após GnRH / LH, é a primeira evidência de que NPC pode estar envolvido na ovulação e luteinização de bovinos.

A partir dos resultados obtidos no estudo anterior nos perguntamos qual a via de sinalização e função dos NPs (em especial NPC) durante a ovulação. Sabe-se que roedores tratados com hCG exibem marcada diminuição nos níveis de RNAm para NPPC em células da granulosa de folículos pré-ovulatórios (KAWAMURA et al., 2011). Estudos utilizando AREG (anfirregulina-um mediador da atividade do LH/hCG através de EGF-R-*epidermal growth factor receptor*) suprimiram os níveis de RNAm para NPPC e seu receptor em cultura de células da granulosa em roedores (TSUJI et al., 2012). Em suínos foi demonstrado um aumento nos níveis de RNAm para NPPC nas células da granulosa após o tratamento com inibidor dos EGF-R (ZHANG et al., 2014). Para entendermos melhor o papel do NPC realizamos um terceiro estudo para avaliar se NPC regula AREG e EREG ou a expressão de RNAm para seu precursor (NPPC) e, se seus receptores NPR-2 e NPR-3 são reguladas por LH através de EGF-R *in vivo* e *in vitro* em células da granulosa durante o período ovulatório.

No terceiro estudo (artigo 3) foi utilizado um modelo *in vitro* de cultivo de células da granulosa e modelos *in vivo* aliando castração, injeção intrafolicular e dinâmica folicular. Este estudo teve como objetivo determinar o efeito de NPC sobre a expressão de AREG e EREG, ou se a regulação de RNAm para NPPC se dá através de EGF-R. Primeiramente estabeleceu-se a expressão de RNAm para AREG e EREG como marcador em resposta a GnRH / LH em nosso modelo ovulatório *in vivo*. Embora já fosse determinado um aumento na expressão dos níveis de AREG e EREG a partir de LH *in vitro* (PORTELA et al., 2011) e *in vivo* (SAYASITH et al., 2013), precisávamos validar nossos modelos. No experimento 1 já nas

primeiras horas pós tratamento com GnRH se observou um aumento na expressão dos níveis de AREG e EREG, tendo o seu pico de expressão as 6 h após GnRH, esse resultado aliado aos resultados dos estudos citados acima utilizando modelos semelhantes além de validar nosso modelo, nos deu base para escolha dos melhores horários para análise de expressão de diferentes genes para os próximos experimentos. Então, no experimento 2 testamos a hipótese de que o NPC pudesse agir como cofator da ação do LH na regulação dos EGF-L, assim como outros peptídeos como a AngII (PORTELA et al., 2011). No entanto, não observamos nenhum efeito na expressão de AREG e EREG em células da granulosa cultivadas *in vitro* com NPC. Não houve regulação de RNAm para AREG e EREG, provavelmente por o NPC estar abaixo da cascata de ativação dos EGF-R durante a ovulação.

Para melhor entender a regulação da expressão de RNAm para NPPC, buscou-se responder se o tratamento com LH *in vitro* também alterava a expressão de RNAm para NPPC, assim como observado *in vivo* no segundo estudo. No experimento 3 utilizando o cultivo de células da granulosa também observamos um aumento na expressão de RNAm para NPPC 6 h após o tratamento com LH, também nesse experimento foi demonstrado que a ação do LH ocorre através de EGF-R. A regulação via EGF-R foi demonstrada em roedores, porém o AG-1478 (bloqueador de EGF-R) reestabelecia os níveis de RNAm para NPPC anteriores a indução de LH (TSUJI et al., 2012). Já a expressão de RNAm tanto para NPR-2 quanto para NPR-3 não tiveram regulação nem por LH nem por AG-1478 em células da granulosa de bovinos cultivadas *in vitro*. Resultados obtidos *in vivo* no segundo estudo demonstraram não haver regulação após aplicação de GnRH de RNAm para NPR-2, no entanto, a expressão de RNAm para NPR-3 estava diminuída em células da granulosa 6 h após o tratamento com GnRH.

Para confirmarmos que a regulação de RNAm para NPPC acontece via EGF-R, no experimento 4, utilizamos a injeção intrafolicular de AG-1478. A partir do bloqueio *in vivo* de EGF-R observamos uma diminuição nos níveis de RNAm para NPPC nas células da granulosa da mesma forma que se observou *in vitro* e exatamente ao contrário do que foi observado em roedores (TSUJI et al., 2012) e suínos (ZHANG et al., 2014). Já para expressão de RNAm para NPR-2 não se observou regulação através de EGF-R, entretanto para NPR-3 foi observado aumento no grupo AG-1478 em relação ao grupo controle, esse resultado está de acordo com nossos resultados *in vivo* que demonstraram uma diminuição de RNAm para NPR-3 6 h após aplicação de GnRH em relação a hora 0 (anterior ao GnRH). Esses resultados em conjunto sugerem que NPPC tem um papel importante na cascata ovulatória, uma vez que a expressão de RNAm para NPPC está aumentada e a expressão de RNAm para NPR-3

(receptor responsável pela sua degradação) está diminuída. No experimento 5, após a injeção intrafolicular de AG-1478, observamos que o bloqueio do EGF-R não foi capaz de bloquear a ovulação em bovinos, uma vez que, todos os animais ovularam no tempo esperado (24 a 48 h após GnRH). Embora 100% dos animais tenham ovulado não temos como descartar uma função do NPC, uma vez que, sua regulação foi demonstrada em momentos iniciais da ovulação. Além disso, a ovulação de folículos injetados com AG-1478 pode sugerir uma rota alternativa durante a ovulação de bovinos. Em resumo, o LH regula positivamente a expressão de RNAm para NPPC. Quando é bloqueado o EGF-R esse aumento na expressão RNAm para NPPC é inibido.

## CONCLUSÃO

A Ang-(1-7) e o inibidor A-779 quando em cultivo de células da granulosa *in vitro* por 3 horas, não são capazes de regular a expressão de EREG. A injeção intrafolicular na concentração de  $10^{-5}$ M de A-779 não inibe o processo ovulatório, indicando que a Ang-(1-7) não possui papel relevante no início da cascata ovulatória em bovinos.

Utilizando uma abordagem *in vivo* foi demonstrada a presença de vários componentes do sistema NPs durante a ovulação em bovinos. O aumento na expressão de RNAm para NPPC e furin aliada a diminuição na NPR-3 após GnRH / LH, fornecem a primeira evidência de que NPC pode estar envolvido na ovulação e luteinização de bovinos. Embora o NPC não regule o AREG e EREG, no entanto, RNAm para NPPC é regulado positivamente por LH através de EGF-R em células da granulosa de bovinos.

## REFERÊNCIAS

ABIEC. Brazilian Livestock. 2014 2013.

ADAMS, G.P., et al. Large animal models for the study of ovarian follicular dynamics in women. **Theriogenology**, v.78, n.8, p.1733-1748. 2012.

BARRETA, M.H., et al. The components of the angiotensin-(1-7) system are differentially expressed during follicular wave in cattle. **Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System**. 2013.

BARRETA, M.H., et al. Evidence that the effect of angiotensin II on bovine oocyte nuclear maturation is mediated by prostaglandins E2 and F2{alpha}. **Reproduction**, v.136, n.6, p.733-740. 2008.

COSTA, A.P., et al. Angiotensin-(1-7): a novel peptide in the ovary. **Endocrinology**, v.144, n.5, p.1942-8. 2003.

FELIX, D., et al. Neurophysiological responses to angiotensin-(1-7). **Hypertension**, v.17, n.6 Pt 2, p.1111-4. 1991.

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

FERREIRA, R., et al. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. **Reproduction**, v.134, n.5, p.713-9. 2007a.

FERREIRA, R., et al. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. **Reproduction**, v.134, n.5, p.713-719. 2007b.

GARDNER, D.G., et al. Molecular biology of the natriuretic peptide system: implications for physiology and hypertension. **Hypertension**, v.49, n.3, p.419-26. 2007.

GASPERIN, B.G., et al. Expression of receptors for BMP15 is differentially regulated in dominant and subordinate follicles during follicle deviation in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.144, n.3-4, p.72-78. 2014.

GASPERIN, B.G., et al. FGF10 inhibits dominant follicle growth and estradiol secretion in vivo in cattle. **Reproduction**, v.143, n.6, p.815-23. 2012.

GINTHER, O.J. The mare: A 1000-pound guinea pig for study of the ovulatory follicular wave in women. **Theriogenology**, v.77, n.5, p.818-828. 2012.

JAISWAL, R.S., et al. High-resolution ultrasound biomicroscopy for monitoring ovarian structures in mice. **Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E**, v.7, p.69. 2009.

KAWAMURA, K., et al. Pre-ovulatory LH/hCG surge decreases C-type natriuretic peptide secretion by ovarian granulosa cells to promote meiotic resumption of pre-ovulatory oocytes. **Hum Reprod**, v.26, n.11, p.3094-101. 2011.

KIYOSU, C., et al. NPPC/NPR2 signaling is essential for oocyte meiotic arrest and cumulus oophorus formation during follicular development in the mouse ovary. **Reproduction**, v.144, n.2, p.187-93. 2012.

KOLLER, K.J., et al. Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). **Science**, v.252, n.5002, p.120-3. 1991.

LEAL, M.C., et al. The role of angiotensin-(1-7) receptor Mas in spermatogenesis in mice and rats. **J Anat**, v.214, n.5, p.736-43. 2009.

LEE, K.B., et al. Hormonal coordination of natriuretic peptide type C and natriuretic peptide receptor 3 expression in mouse granulosa cells. **Biol Reprod**, v.88, n.2, p.42. 2013.

MAACK, T., et al. Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. **Science**, v.238, n.4827, p.675-8. 1987.

MISONO, K.S., et al. Structure, signaling mechanism and regulation of the natriuretic peptide receptor guanylate cyclase. **FEBS J**, v.278, n.11, p.1818-29. 2011.

NAKAO, K., et al. Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. I: Natriuretic peptides. **J Hypertens**, v.10, n.9, p.907-12. 1992.

PENG, J.Y., et al. Identification and gene expression analyses of natriuretic peptide system in the ovary of goat (*Capra hircus*). **Gene**, v.524, n.2, p.105-13. 2013.

PEREIRA, V.M., et al. Downregulation of natriuretic peptide system and increased steroidogenesis in rat polycystic ovary. **Peptides**, v.60, p.80-5. 2014.

PEREIRA, V.M., et al. Gonadotropin stimulation increases the expression of angiotensin-(1-7) and MAS receptor in the rat ovary. **Reprod Sci**, v.16, n.12, p.1165-74. 2009.

PORTELA, V.M., et al. Role of Angiotensin II in the Perioovulatory Epidermal Growth Factor-Like Cascade in Bovine Granulosa Cells In Vitro. **Biol Reprod**. 2011.

POTTER, L.R. Natriuretic peptide metabolism, clearance and degradation. **FEBS J**, v.278, n.11, p.1808-17. 2011.

POTTER, L.R., et al. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. **Endocr Rev**, v.27, n.1, p.47-72. 2006.

POTTHAST, R.; POTTER, L.R. Phosphorylation-dependent regulation of the guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors. **Peptides**, v.26, n.6, p.1001-8. 2005.

REIS, F.M., et al. Angiotensin-(1-7), its receptor Mas, and the angiotensin-converting enzyme type 2 are expressed in the human ovary. **Fertil Steril**. 2010.

SAMPAIO, W.O., et al. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. **Hypertension**, v.49, n.1, p.185-92. 2007.

SANTOS, J., et al. Molecular characterization and regulation of the angiotensin-converting enzyme type 2/Angiotensin-(1-7)/MAS receptor axis during the ovulation process in cattle. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**. 2011.

SAYASITH, K., et al. Human chorionic gonadotropin-dependent up-regulation of epiregulin and amphiregulin in equine and bovine follicles during the ovulatory process. **Gen Comp Endocrinol**, v.180, p.39-47. 2013.

SUGA, S., et al. Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. **Endocrinology**, v.130, n.1, p.229-39. 1992.

TAMURA, N., et al. Critical roles of the guanylyl cyclase B receptor in endochondral ossification and development of female reproductive organs. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.101, n.49, p.17300-5. 2004.

TSUJI, T., et al. CNP/NPR2 signaling maintains oocyte meiotic arrest in early antral follicles and is suppressed by EGFR-mediated signaling in preovulatory follicles. **Mol Reprod Dev**, v.79, n.11, p.795-802. 2012.

VIANA, G.E., et al. Angiotensin-(1-7) induces ovulation and steroidogenesis in perfused rabbit ovaries. **Exp Physiol**, v.96, n.9, p.957-65. 2011.



WRIGHT, J.W., et al. Angiotensin II(3-8) (ANG IV) hippocampal binding: potential role in the facilitation of memory. **Brain Res Bull**, v.32, n.5, p.497-502. 1993.

WU, C., et al. Furin-mediated processing of Pro-C-type natriuretic peptide. **J Biol Chem**, v.278, n.28, p.25847-52. 2003.

YAN, W., et al. Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.97, n.15, p.8525-9. 2000.

ZHANG, M., et al. Estradiol promotes and maintains cumulus cell expression of natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) and meiotic arrest in mouse oocytes in vitro. **Endocrinology**, v.152, n.11, p.4377-85. 2011.

ZHANG, M., et al. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. **Science**, v.330, n.6002, p.366-9. 2010.

ZHANG, W., et al. Epidermal growth factor-network signaling mediates luteinizing hormone regulation of BNP and CNP and their receptor NPR2 during porcine oocyte meiotic resumption. **Mol Reprod Dev**, v.81, n.11, p.1030-41. 2014.

ZINI, S., et al. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.93, n.21, p.11968-73. 1996.