

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

**EXPRESSÃO DAS AQUAPORINAS 1 E 9 DURANTE O
DESENVOLVIMENTO FOLICULAR EM RATAS**

CARINA DE OLIVEIRA DUMONT HORTA

Belo Horizonte – MG

Novembro-2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA

Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

EXPRESSÃO DAS AQUAPORINAS 1 E 9 DURANTE O DESENVOLVIMENTO FOLICULAR EM RATAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Mestranda: Carina de Oliveira Dumont Horta

Orientadora: Dra. Adelina Martha dos Reis

Co-Orientadora: Dra. Cleida Aparecida de Oliveira

Belo Horizonte – MG

Novembro-2013

RESUMO

As aquaporinas (AQPs) constituem uma família de proteínas integrais de membrana com distribuição ampla pelos sistemas fisiológicos. As AQPs são detectadas em vários órgãos do sistema genital feminino como placenta, útero, tubas uterinas, colo uterino, vagina e ovários. Em ovários, as AQPs poderiam exercer importante papel durante a foliculogênese, pois podem contribuir para a formação da cavidade antral através da mediação do transporte de água para o interior do folículo. As AQPs 1 e 9 podem ser especialmente importantes, pois a AQP1 tem sido associada com a angiogênese e a AQP9 pode ser regulada por esteroides gonadais. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a expressão das aquaporinas 1 e 9 durante o desenvolvimento folicular e o processo ovulatório induzidos por gonadotrofinas em ovários de ratas. Ratas Wistar pré-púberes (24-26 dias de idade) receberam injeção sc de 20UI de gonadotropina sérica de égua prenha (PMSG - NHPP, Torrance, CA, EUA) para indução do desenvolvimento de múltiplos folículos. Após 48h, metade delas recebeu 20UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG- Choragon, Ferring Pharmaceuticals, Wittland, Alemanha) para indução da ovulação. As ratas controle receberam injeções de salina. A expressão do RNA mensageiro (mRNA) para a AQPs foi determinada por PCR-real time (RT-PCR) e a sua distribuição nos ovários foi avaliada por imuno-histoquímica. Os dados obtidos nos experimentos foram submetidos à análise de variância one-way, seguidos por teste de Newman-Keuls, utilizando-se o programa GraphPad Prism versão 5.00. As ratas tratadas com PMSG apresentaram aumento da expressão do mRNA para a AQP9 quando comparadas às controles ($2,05 \pm 0,71$ vs. $1,02 \pm 0,18$; $p < 0,05$). O grupo tratado com PMSG+hCG apresentou resultado semelhante ao grupo tratado apenas com PMSG ($2,70 \pm 1,16$ vs. $2,05 \pm 0,71$). A expressão proteica de AQP9 em ovários de ratas pré-púberes controle foi observada em células da granulosa de folículos primários unilaminares e multilaminares. Em folículos antrais, a marcação positiva encontra-se nas células da teca e da granulosa. As células intersticiais localizadas no estroma ovariano apresentaram-se não reativas para a AQP9. Nos ovócitos das ratas controle foi detectada uma fraca marcação para a AQP9. O tratamento com PMSG promoveu aumento da imunomarcação para AQP9 nas células da teca de folículos antrais e pré-ovulatórios. Marcação positiva foi observada também nas células intersticiais do estroma. As ratas tratadas com PMSG+hCG apresentaram o mesmo padrão de marcação induzido pelo tratamento com PMSG. Houve diminuição na expressão da AQP1 em ovários tratados com PMSG ($0,36 \pm 0,07$) e PMSG+hCG ($0,26 \pm 0,06$) quando comparados ao grupo controle ($1,01 \pm 0,07$). Marcação positiva para AQP1 foi restrita ao endotélio de vasos ovarianos. A quantificação dos vasos nos folículos antrais e pré-ovulatórios foi realizada por morfometria. O tratamento com PMSG+hCG induziu aumento da vascularização na teca dos folículos antrais e pré-ovulatórios ($0,57 \pm 0,05$) comparado aos grupos controle ($0,45 \pm 0,08$) e PMSG ($0,46 \pm 0,06$). Além do aumento mencionado, os resultados mostraram alteração no perfil de marcação dos vasos foliculares. O grupo tratado com PMSG+hCG apresentou menor área de vasos negativos para AQP1 quando comparado aos grupos controle e PMSG ($0,09 \pm 0,06$; $0,28 \pm 0,11$; $0,29 \pm 0,05$, respectivamente). O tratamento com hCG induziu aumento da marcação para AQP1, o que promoveu aumento da área de vasos marcados para AQP1 ($0,48 \pm 0,05$) quando comparado aos grupos controle e PMSG ($0,16 \pm 0,03$; $0,17 \pm 0,03$). A progesterona (P4) parece ser importante para os processos pré-ovulatórios e tem produção estimulada por LH/hCG. Para avaliar a participação da progesterona na regulação da AQP1, o antagonista do receptor de progesterona RU-486 foi utilizado (5mg/rata). O RU-486 não alterou a expressão da AQP1 ou a sua imunolocalização, indicando que o aumento da AQP1 e vascularização induzidos pelo hCG são independentes da progesterona. Em conjunto, nossos resultados indicam que alterações importantes na expressão das AQP1 e AQP9 ocorrem durante o desenvolvimento folicular e início do processo ovulatório e ampliam o conhecimento sobre o envolvimento de AQPs no processo reprodutivo.

ABSTRACT

Aquaporins (AQPs) constitute a family of integral membrane proteins with a wide distribution in different physiological systems. The AQPs are present in several organs of the female genital tract as placenta, uterus, fallopian tubes, cervix, vagina and ovaries. In ovaries, AQPs may play an important role during folliculogenesis, contributing for the antral cavity expansion through the water transport into the follicle. The AQP1 and AQP9 may be especially important in folliculogenesis. AQP1 is associated with angiogenesis and gonadal steroids seems to regulate AQP9 expression. The aim of this study was to evaluate the expression of Aquaporins 1 and 9 during follicular development and ovulatory process induced by gonadotropins in the rat ovary. Prepubertal female Wistar rats (24-26 days old) received subcutaneous injection of 20UI of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG - NHPP, Torrance, CA, USA) to induce the development of multiple follicles. After 48 hours, half of them received 20UI of human chorionic gonadotropin (hCG - Choragon, Ferring Pharmaceuticals, Wittland, Germany) for ovulation induction. The control rats received saline injections. The messenger RNA (mRNA) expression for the AQPs was determined by real time - PCR (RT-PCR). The distribution of AQPs in the ovaries was evaluated by immunohistochemistry. The data were analyzed by one-way analysis of variance, followed by Newman - Keuls test using the GraphPad Prism version 5.00. The rats treated with PMSG showed increased expression of AQP9 mRNA compared to controls (2.05 ± 0.71 vs. 1.02 ± 0.18 , $p < 0.05$). The results of PMSG + hCG treated group were similar to the PMSG treated group (2.70 ± 1.16 vs. 2.05 ± 0.71). In ovaries of prepubertal control rats, the AQP9 protein expression was observed in granulosa cells from primary follicles. In antral follicles, the positive staining was found in the theca and granulosa cells. Interstitial cells present in the stroma were negative for AQP9. Oocytes showed weak labeling for AQP9. Treatment with PMSG resulted in increased immunostaining for AQP9 in the theca cells of antral and pre-ovulatory follicles. Positive staining was also observed in interstitial cells of the stroma. The rats treated with PMSG + hCG showed the same staining pattern induced by treatment with PMSG. On the other side, positive labeling for AQP1 was restricted to the endothelium of ovarian vessels. Increase of AQP1 gene expression was observed in ovaries treated with PMSG compared with controls (0.290 ± 0.115 vs. 0.048 ± 0.004 ; $p < 0.05$). Treatment with PMSG (0.36 ± 0.07) e PMSG/hCG (0.46 ± 0.06) decreased the AQP1 mRNA expression compared to control group (1.01 ± 0.07). Quantification of vessels in preovulatory and antral follicles was performed by morphometry. The PMSG+hCG treatment increased vascularity in the theca layer of antral and preovulatory follicles (0.57 ± 0.05) compared to the control (0.45 ± 0.08) and PMSG (0.46 ± 0.06) groups. In addition, our results showed changes in the immunostaining profile of follicular vessels. The area negative for AQP1 was lower in the PMSG + hCG treated group compared to PMSG and control groups (0.09 ± 0.06 , 0.28 ± 0.11 ; 0.29 ± 0.05 , respectively). The hCG treatment enhanced immunostaining for AQP1, which resulted in the increase of staining vessel area for AQP1 (0.48 ± 0.05) compared to the control group and PMSG (0.16 ± 0.03 , 0.17 ± 0.03). Progesterone seems to be important for the preovulatory process and is enhanced by LH/hCG. To evaluate the role of progesterone in the regulation of AQP1 expression, we administrated the progesterone receptor antagonist, RU 486 (5mg/rat). RU-486 injection did not affect the AQP1 protein expression, indicating that progesterone is not involved in the increase of vascularization and AQP1 expression induced by LH/hCG. Taken together, our results indicate that major changes in the expression of AQP1 and AQP9 occur during follicular development and early ovulatory process, and expand the knowledge about the involvement of AQPs in the reproductive process.

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define infertilidade como sendo a “ausência de gravidez após um ano de relações sexuais regulares e sem uso de contracepção”. É um problema vivido por cerca de 8% a 15% dos casais, segundo dados de 2010 da OMS. No Brasil, estima-se que mais de 278 mil casais tenham dificuldade para gerar um filho em algum momento da sua vida fértil. A probabilidade da ocorrência de uma gravidez em cada ciclo menstrual é de cerca de 20%-25%. As causas de infertilidade são múltiplas e podem, ou não, estar associadas a anomalias do sistema reprodutor masculino ou feminino. Em cerca de 30% dos casos, ambos contribuem para o problema. Estima-se que exista um fator feminino em 60%-70% dos casos. Em mulheres, a patologia ginecológica está presente em 30%-40% das situações (endometriose 5%, doença tubária 15%, entre outras) e a anormalidades no processo ovulatório (atraso, precocidade ou ausência de ovulação no decorrer do ciclo menstrual) em 14%-15% (Whitmane-Elia, et. al. 2001), podendo, segundo outros autores, ultrapassar os 20% (NHS, 2004). Estudos que esclareçam os mecanismos que promovem a ovulação são de grande importância, uma vez que distúrbios nesse processo podem comprometer a fertilidade do indivíduo.

A presença de aquaporinas – AQPs (MCCONNELL et al., 2002) no ovário tem sido mostrada e essas parecem exercer importante papel durante a foliculogênese, pois podem contribuir para a formação da cavidade antral através da mediação do transporte de água para o interior do folículo. Foram

detectadas aquaporinas 7, 8 e 9 nas células da granulosa folicular de ovários de ratas (McConnell et al, 2002) e de aquaporinas 1, 5 e 9 na granulosa folicular de porcas (SKOWRONSKI, KWON e NIELSEN, 2009). A ovulação é o evento final e mais importante do processo de desenvolvimento folicular. Após o pico de hormônio luteinizante (LH), o ambiente do folículo ovariano é alterado, o que resulta na liberação do ovócito. Dentre essas alterações podemos citar o aumento do aporte sanguíneo e das enzimas proteolíticas, o rápido crescimento do folículo ovariano e o aumento na produção de progesterona (P4). Sabe-se que os ovários começam a produzir maior quantidade de P4 algumas horas após a liberação de gonadotrofinas e que camundongos *knockout* para o receptor de progesterona (PR) possuem um fenótipo anovulatório (LYDON et al., 1995). Assim, mostrou-se que a progesterona possui papel essencial no processo ovulatório.

As AQPs são proteínas presentes em ovários durante todas as fases do ciclo estral e podem participar do desenvolvimento folicular que resulta no processo ovulatório. Entretanto, a literatura sobre a participação das AQPs no processo ovulatório ainda é escassa. Assim, o objetivo desse estudo é esclarecer possíveis alterações na expressão das aquaporinas 1 e 9 induzidas pelas gonadotrofinas hipofisárias que possam estar envolvidas com o processo ovulatório.

1.1. OVOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE

A formação do ovócito, célula germinativa feminina, tem início na vida intra-uterina e o desenvolvimento dos folículos ovarianos ocorre ciclicamente a partir da puberdade.

No início da gestação, ocorre a migração de células germinativas primordiais através da parede do saco vitelínico até as gônadas em desenvolvimento originando as ovogônias, células $2n$ precursora dos gametas femininos. Essas células passam por uma intensa divisão originando novas ovogônias que resultam nos ovócitos primários, células que iniciam o processo de meiose, mas não o completam, permanecendo no estágio de prófase I. O reinício da meiose nesses ovócitos primários ocorrerá apenas após a puberdade.

Após o nascimento, o ovócito primário está envolto por células foliculares formando a unidade funcional do ovário, o folículo ovariano. Quando há apenas uma camada de células foliculares achatadas, o folículo é classificado como folículo primordial (Fig.1.1-1A). A foliculogênese é um processo coordenado, derivado de sinais de células ovarianas e de estímulos liberados pela adeno-hipófise. O crescimento do folículo é caracterizado por um aumento de tamanho do ovócito e pela proliferação das células da granulosa folicular. Esse crescimento é marcado por mudanças morfológicas do folículo que tem início quando a fêmea atinge a maturidade sexual.

Quando as células foliculares formam várias camadas e tornam-se cuboides, o folículo pode ser classificado como folículo primário multilaminar. A proliferação das células da granulosa continua juntamente com a diferenciação

de outras células que circundam o folículo em células da teca interna e da teca externa. O acúmulo de líquido entre as células foliculares forma a cavidade antral, caracterizando o folículo secundário ou antral (Fig.1.1-1C). Finalmente, esse folículo diferencia-se no folículo pré-ovulatório, folículo maduro ou folículo de Graaf (Fig.1.1-1D) e a ovulação ocorrerá após o pico do hormônio luteinizante.

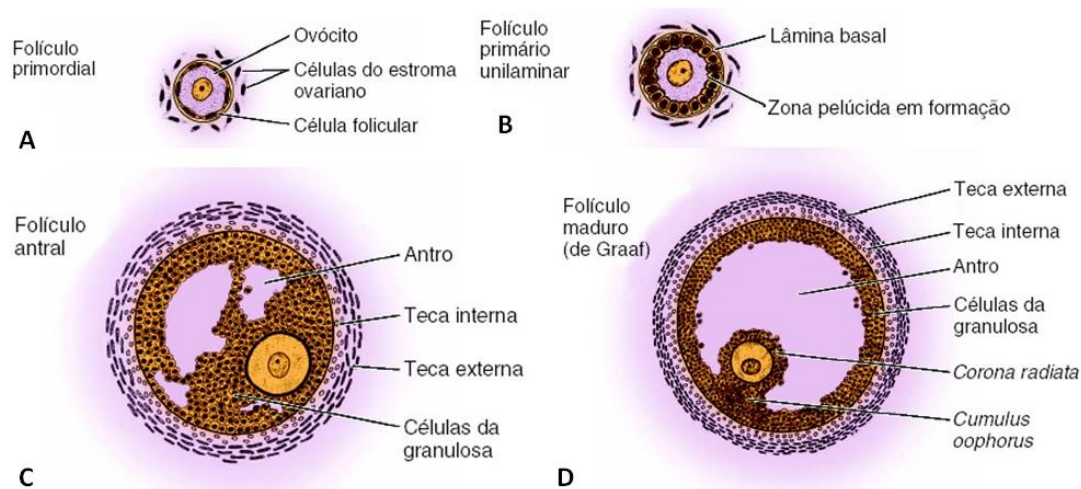


Figura 1.1-1 Classificação de folículos ovarianos A- Folículo primordial, B- Folículo Primário, C- Folículo Antral e D- Folículo maduro (Junqueira & Carneiro 2013).

1.2. ESTEROIDOGÊNESE OVARIANA

Uma função importante dos ovários é a produção de hormônios esteroides, especialmente o estradiol (E_2) e a progesterona (P_4). Os estrogênios são essenciais para o desenvolvimento e manutenção do sistema reprodutor feminino. Além da proliferação cíclica do endométrio, os estrogênios também agem em diversos órgãos e possuem funções como o aumento da densidade de minerais dos ossos (KOUSTENI et al., 2002), deposição de gordura subcutânea após a puberdade (COOKE e NAAZ, 2004), prevenção da perda de força e de massa muscular (FINNI et al., 2011; LOWE, BALTGALVIS e GREISING, 2011). A progesterona por sua vez promove a manutenção do

endométrio (CLARKE e SUTHERLAND, 1990), participa do processo de implantação do embrião, sendo o hormônio predominante na gravidez.

A maior parte de E_2 e P_4 na circulação é derivada dos ovários, sendo que uma pequena fração de E_2 é formada a partir da testosterona no tecido adiposo e na pele (SIMPSON et al., 1997), no endotélio vascular (BAYARD et al., 1995) e em áreas cerebrais como hipocampo e amígdala (NAFTOLIN et al., 1975).

A via biossintética dos hormônios esteroides é resultado de ações coordenadas das camadas da teca interna e da granulosa do folículo ovariano, sob influência das gonadotrofinas hipofisárias, e começa com a translocação do colesterol para a mitocôndria. Na mitocôndria, a StAR (*Steroidogenic acute regulatory protein*) transporta o colesterol da membrana externa para a membrana interna, onde ocorre a clivagem da cadeia lateral do colesterol pela enzima 20,22-desmolase, convertendo-o em pregnenolona. A partir da pregnenolona são possíveis duas vias que darão origem a androgênios, precursores obrigatórios dos estrogênios. A androstenediona é o principal androgênio aromatizável na maioria das espécies, mas também pode ser convertido em testosterona pela enzima 17 β -Hidroxiesteroide-desidrogenase (17 β -HSD). O complexo enzimático da aromatase é um citocromo P450 responsável pela conversão de androgênios em estrogênios.

A produção de estrogênio nos ovários segue o modelo “duas células e duas gonadotrofinas” (FALCK, 1959). Nesse modelo, o LH atua na teca interna estimulando a produção de androstenediona (A) e testosterona (T), que são convertidos em estrona e estradiol nas células da granulosa pela ação da

citocromo P450aromatase (P450arom), estimulada pelo hormônio folículo estimulante (FSH) (Fig.1.2-1).

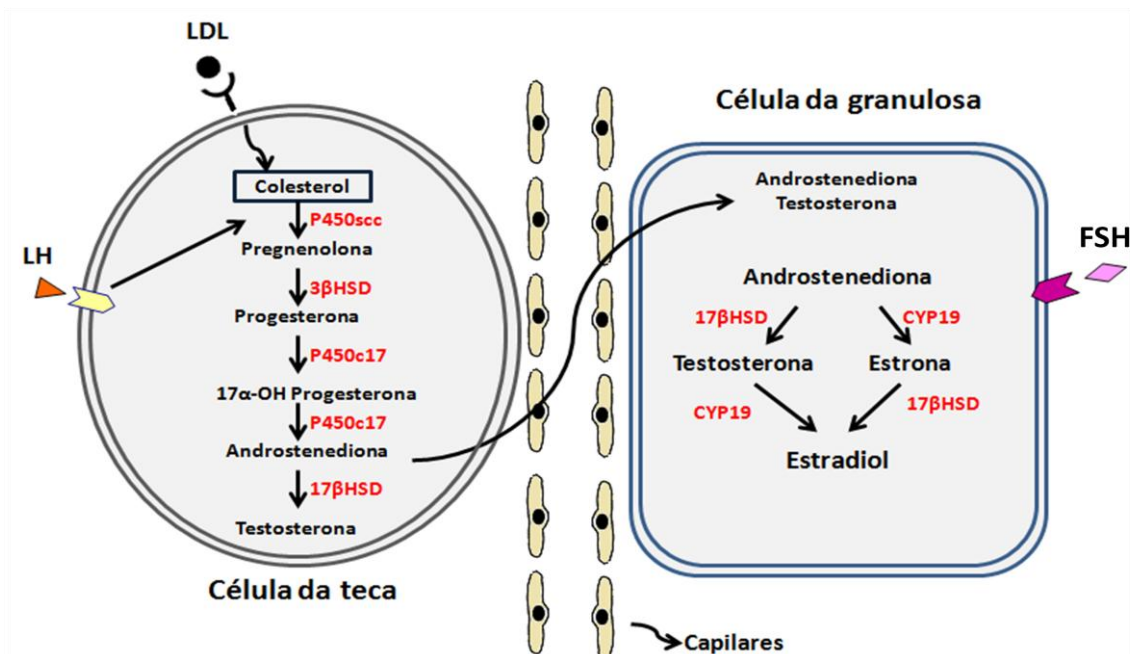


Figura 1.2-1 Via de biossíntese dos hormônios sexuais femininos de acordo com o modelo das duas células gonadotrofinas (FALCK, 1959). Nas células da teca os androgênios [androstenediona (A) e a testosterona (T)] são produzidos em resposta ao LH. Nas células da granulosa, a P450 aromatase converte os androgênios em estrogênios (3β-HSD: 3β-hydroxysteroid dehydrogenase; 17β-HSD: 17β-hydroxysteroid Dehydrogenase).

As concentrações de esteroides sexuais variam de maneira cíclica durante o período reprodutivo das fêmeas. Em ratas, o ciclo estral possui duração de quatro dias, dividido em quatro fases: proestro, estro, metaestro e diestro (FREEMAN, 1988a). Os níveis de estradiol são baixos na fase estro, começam a aumentar na fase metaestro e seu pico ocorre na tarde de proestro, caindo bruscamente no início da manhã de estro (FREEMAN, 1988b). A ovulação pode ocorrer a partir da tarde de proestro até o final da fase estro.

A progesterona, por sua vez, tem sua concentração elevada na fase metaestro e diestro, devido a sua produção pelo corpo lúteo. Há também um aumento na produção de progesterona no folículo pré-ovulatório entre as fases

proestro e estro. Tal dado indica que a P4 pode estar envolvida no processo ovulatório.

1.3.OVULAÇÃO

A ovulação é o processo que resulta na ruptura da parede folicular e consequente liberação do ovócito dos folículos para a tuba uterina. Em mamíferos, esse processo tem início com a estimulação dos folículos pré-ovulatórios por hormônios gonadotróficos. Esses folículos possuem como características morfológicas a presença da *corona radiata* circundando o ovócito, além de um antro folicular bem desenvolvido, delimitado pela camada de células foliculares (Fig.1D).

Por ser um fenômeno complexo e cíclico, a ovulação requer uma ação coordenada do sistema nervoso central e do ovário. O pico de LH é o evento central responsável pela ovulação e seu controle depende do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) cuja secreção é direcionada através de um *feedback* positivo provocado pelo rápido aumento de estradiol no plasma. Tanto em ratas como em mulheres, o estradiol e a progesterona estão envolvidos com a liberação de LH. A concentração de E₂ aumenta na fase proestro, causando a liberação de GnRH que resulta no pico de LH. A ação do E₂ na liberação de GnRH não ocorre diretamente, mas através de células intermediárias contendo o neuropeptídeo kisspeptina (MILLAR et al., 2010). Após a liberação de LH ocorre uma mudança no ambiente folicular, com o estímulo da esteroidogênese, aumento da síntese de P4 e de prostaglandinas,

ativação de enzimas proteolíticas e aumento da permeabilidade vascular (ESPEY, 1994; TAKAHASHI e OHNISHI, 1995), dentre outros fatores que resultam na ruptura e da extrusão do ovócito maduro.

Até a década de 60, acreditava-se que a ruptura de folículos em mamíferos era consequência de um aumento da pressão hidrostática intrafolicular em conjunto com a contração da musculatura lisa do estroma ovariano. Porém, a hipótese atualmente aceita é de que a ovulação é semelhante a processo inflamatório agudo.

Trabalhos mostraram que drogas anti-inflamatórias não-esteroidais eram capazes de bloquear a ovulação, desde que administradas durante 80% do tempo do processo ovulatório (ESPEY, 1994). Rubor e edema, características da inflamação aguda, são também percebidas na superfície ovariana. A ativação de uma complexa rede de proteínas resulta em atividade de proteólise nas camadas de células da teca interna e granulosa resultando na degradação da matriz extracelular e levando a liberação do complexo *cumulus-ovócito* (COC) (ESPEY, 1994; RICHARDS, 2006). Sabe-se, ainda, que durante a fase periovulatória ocorre hiperemia e aumento do fluxo sanguíneo para o ovário.

A regulação de fatores angiogênicos é fator imprescindível para que ocorra a ovulação. Um suprimento adequado de sangue é necessário em tecidos para fornecer oxigênio e outros nutrientes, para eliminar CO₂ e outros metabólitos derivados do metabolismo, e para transferir hormônios de glândulas endócrinas para células-alvo. Em adultos, o desenvolvimento de novos vasos é derivado da vasculatura preexistente. Desse modo, diversos aspectos da reprodução, como as alterações cíclicas no ovário e do trato

genital para implantação e as funções placentárias, são dependentes de angiogênese fisiológica.

A vascularização não é distribuída igualmente entre a população de folículos do ovário em animais adultos. Os folículos primordiais e folículos pré-antrais de crescimento lento não apresentam um suprimento vascular próprio, mas contam com a vascularização do estroma adjacente. No entanto, quando o antra desenvolve-se no folículo, a camada da teca adquire uma bainha vascular que consiste em duas redes capilares localizados na teca interna e externa, respectivamente. Como todos os capilares permanecem fora da membrana basal do folículo, a camada granulosa permanece avascular até após a ovulação. Há evidências sugerindo que folículos antrais variam em seu grau de vascularização.

A primeira molécula a ser caracterizada com base na sua capacidade para promover proliferação de células endoteliais, bem como para aumentar permeabilidade vascular, foi denominada de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) ou o fator de permeabilidade vascular (VPF). Como outros membros da família VEGF (VEGF BF) foram identificados com base na homologia da sequência, o VEGF original tornou-se conhecido como VEGF-A.

O hormônio luteinizante é o maior regulador da angiogênese ovariana. O pico de LH promove “upregulation” de vários genes, como por exemplo, da ciclooxigenase 2 (COX-2) e do receptor de progesterona (PR), que promovem a indução de uma cascata de eventos que culmina na ovulação.

O LH pode ter efeito na angiogênese através do aumento de VEGF-A em células da granulosa de primatas (DRIESCHE, VAN DEN et al., 2008; MARTINEZ-CHEQUER et al., 2003) e vacas (SCHAMS et al., 2001) e em

células da teca em porcas (MARTELLI et al., 2006). O LH também pode induzir atividade proteolítica, hipóxia e produção de outros fatores como o FGF2. A figura 1.3-1 ilustra a cascata de possíveis eventos desencadeada pelo LH que resultariam na formação de novos vasos.

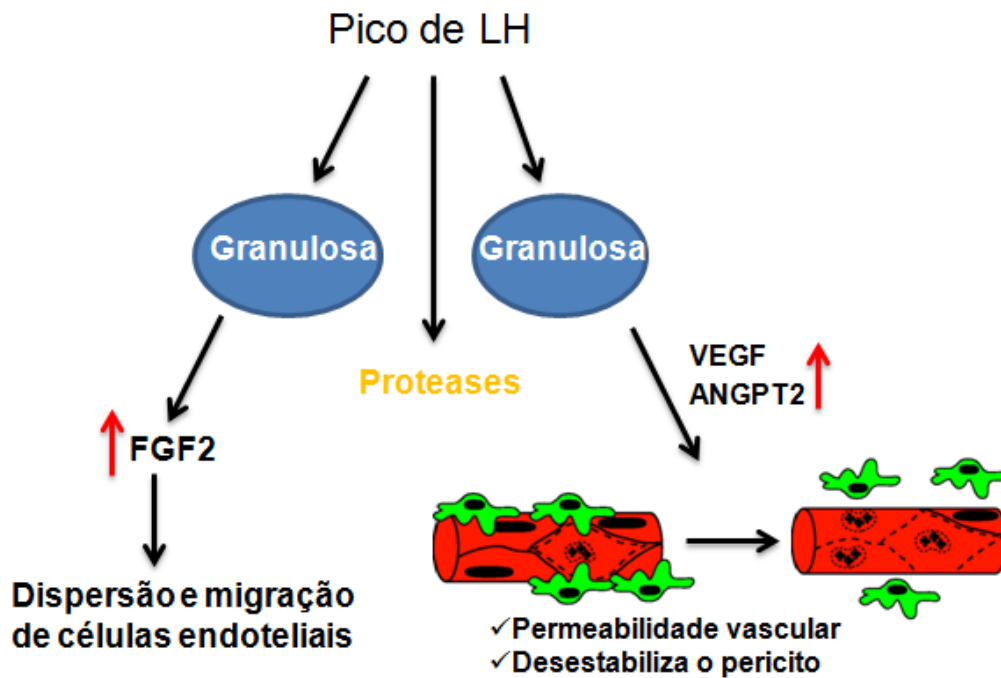


Figura 1.3-1 Indução da vascularização na camada tecal induzida por LH. Nos folículos pré-ovulatórios, o pico de LH induz a atividade de proteases, a hipóxia e a produção do fator de crescimento de fibroblato tipo 2 (FGF2). FGF2 estimula a dispersão e migração de células endoteliais da vasculatura da teca. O aumento repentino de LH, ao mesmo tempo, estimula a produção de angiopoietina 2 (ANGPT2), o que provoca a desestabilização das interações pericito-endotélio e, portanto, o descolamento pericito. Durante todo este período a produção de VEGFA é contínua e ativa as células endoteliais e a degradação da matriz extracelular entre as células endoteliais e o pericito (Ilustração baseada em (ROBINSON et al., 2009)).

Desse modo, o estabelecimento de uma vascularização adequada proporcionaria o acesso a nutrientes e hormônios que são essenciais para a liberação do ovócito para a tuba uterina. Em contraste, um suprimento vascular insuficiente poderia limitar ainda mais o crescimento e conduzir à degeneração ou atresia folicular.

Após a ovulação, ocorre a luteinização das células da granulosa e da teca, originando o corpo lúteo. O corpo lúteo é responsável pela síntese de progesterona e estrogênios durante os estágios iniciais da gravidez e é mantido pela secreção de gonadotrofina coriônica secretada pelo sinciciotrofoblasto.

1.4. PROGESTERONA E OVULAÇÃO

A progesterona é componente chave da regulação da função reprodutiva em fêmeas e exerce papel importante desde a liberação do ovócito até a manutenção da gravidez. A P4 age através de seus receptores nucleares, PR-A e PR-B, (SPELSBERG et al., 1972), cuja transcrição e tradução são estimuladas pelo estradiol.

Antes da ovulação, as células da granulosa folicular sintetizam estradiol, mas após a ovulação essas células se modificam e formam o corpo lúteo, responsável pela produção de progesterona. Caso ocorra a fertilização, a placenta produz gonadotrofina coriônica que mantém o corpo lúteo. Esse mantém a produção de P4 até que a placenta passe a produzi-la em quantidades adequadas. Caso não ocorra fertilização, o corpo lúteo regride e tem início um novo ciclo ovariano.

Ainda na década de 30, foi descoberto que a ovulação poderia ser bloqueada pela administração de altas doses de P4 (revisado por Zalanyi 2001). Surgiu, então, a ideia do uso de anticoncepcionais à base de progesterona. Sabe-se, hoje, que a concentração elevada de P4 e E2 pode exercer *feedback* negativo nas células gonadotróficas da adeno-hipófise,

resultando em inibição da liberação de LH e FSH e, bloqueando, assim o desenvolvimento de novos folículos e uma nova ovulação.

Na década de 50, uma nova corrente de estudos começa a demonstrar propriedades pró-ovulatórias da progesterona. Constatou-se que folículos pré-ovulatórios possuíam uma concentração de P4 duas vezes maior que o plasma de mulheres grávidas durante o segundo ou terceiro mês de gestação (ZANDER, 1954). Sabe-se que os ovários começam a produzir maior quantidade de P4 algumas horas após a liberação de gonadotrofinas (RICHARDS, 2006) e que camundongos “knockout” para o receptor de progesterona (PR) possuem um fenótipo anovulatório (LYDON et al., 1995). O uso de antagonistas de progesterona como o RU-486 também são capazes de inibir a liberação do ovócito em ratos (MORI et al., 2011; SCHOOT, VAN DER, BAKKER e KLIJN, 1987; UILENBROEK, 1991). Desse modo, mostrou-se que a progesterona, inicialmente associada com o corpo lúteo, possui importante papel no processo ovulatório. Trabalhos mostraram a associação entre o aumento das concentrações de P4 e de PR com uma maior expressão de metaloproteinases (ADAMTS-1), enzimas importantes para a ovulação. Pouco antes da ovulação, a região do estigma possui elementos vasculares e exibe uma intensa localização de ADAMTS-1 e ADAMTS-4, indicando que ADAMTS está envolvido com a regulação da atividade angiogênica.

Percebe-se, então, que o efeito biológico da progesterona depende da fase do ciclo estral: no início do ciclo apresenta propriedades antiovulatórias, exercendo *feedback* negativo sobre a secreção de gonadotrofinas hipofisárias. Entretanto, após certo grau de desenvolvimento dos folículos, a P4 pode apresentar características pró-ovulatórias, por ação central ou ovariana.

1.5. MODELO EXPERIMENTAL DE OVULAÇÃO.

A ovulação induzida é uma técnica utilizada amplamente na clínica médica para tratar mulher com ciclos anovulatórios e possui vários métodos, tais como o uso de antiestrógenos, de GnRH pulsátil, a perda de peso acompanhada de exercício físico e o uso de gonadotrofinas (MESSINIS, 2005).

O principal modelo experimental para estudo do processo ovulatório em ratas utiliza hormônios gonadotróficos semelhantes aos hipofisários para induzir o desenvolvimento folicular e a ovulação (HONORATO-SAMPAIO et al., 2012; MORI et al., 2011; PEREIRA et al., 2009). Nesse modelo são utilizadas ratas pré-púberes que recebem uma dose única de gonadotrofina coriônica de égua prenhe (PMSG), com ação análoga ao FSH, para estimulação do crescimento de múltiplos folículos ovarianos. Quando esses folículos chegam ao estágio pré-ovulatório, cerca de 48h após a administração de PMSG, é aplicada uma injeção subcutânea (sc) de gonadotrofina coriônica humana (hCG), com ação análoga ao LH, cuja função é iniciar o processo de luteinização das células da granulosa e induzir a ovulação. A ocorrência da ovulação é confirmada pela contagem de ovócitos nas tubas uterinas entre 12h e 24h após a injeção de hCG.

1.6. AQUAPORINAS E O SISTEMA GENITAL FEMININO

As aquaporinas (AQPs) constituem uma família de proteínas integrais de membrana, com peso molecular de aproximadamente 30kDa/monômero, hidrofóbicas, que permitem o movimento de água através da bicamada lipídica seguindo o gradiente osmótico. Nos mamíferos são conhecidas 13 AQPs (AQP0-AQP12) divididas em dois grandes grupos: as AQPs clássicas e as aquagliceroporinas. As AQPs clássicas, tais como AQP1, AQP-2, AQP-4, AQP-5 e AQP-8, são proteínas primariamente seletivas para o transporte de água. As aquagliceroporinas AQP-3, AQP-7, AQP9 e AQP10, além de água também transportam glicerol e possivelmente outros pequenos solutos.

A AQP1, primeiro canal de água descoberto, foi identificada pelo grupo de Peter Agre, em ovócitos de *Xenopus laevis* e em eritrócitos humanos (BENGA, 2012; BENGA et al., 1986; PRESTON et al., 1992). Sua estrutura cristalográfica foi determinada e consiste em um monômero formado por seis domínios α -hélices transmembrana, unidos por cinco alças citoplasmáticas (Fig.1.6-1). Quatro desses monômeros se unem, dando origem a um tetrâmero, porém cada monômero atua como um poro único, permitindo que apenas uma molécula de água se acomode ao longo do eixo do poro, fazendo com que as moléculas de água sejam rapidamente transportadas em fila única (FU et al., 2000; GROOT, DE, ENGEL e GRUBMÜLLER, 2001; HARRIES et al., 2004; JUNG SUP et al., 1994; SUI et al., [S.d.]; TAJKHORSHID et al., 2002).

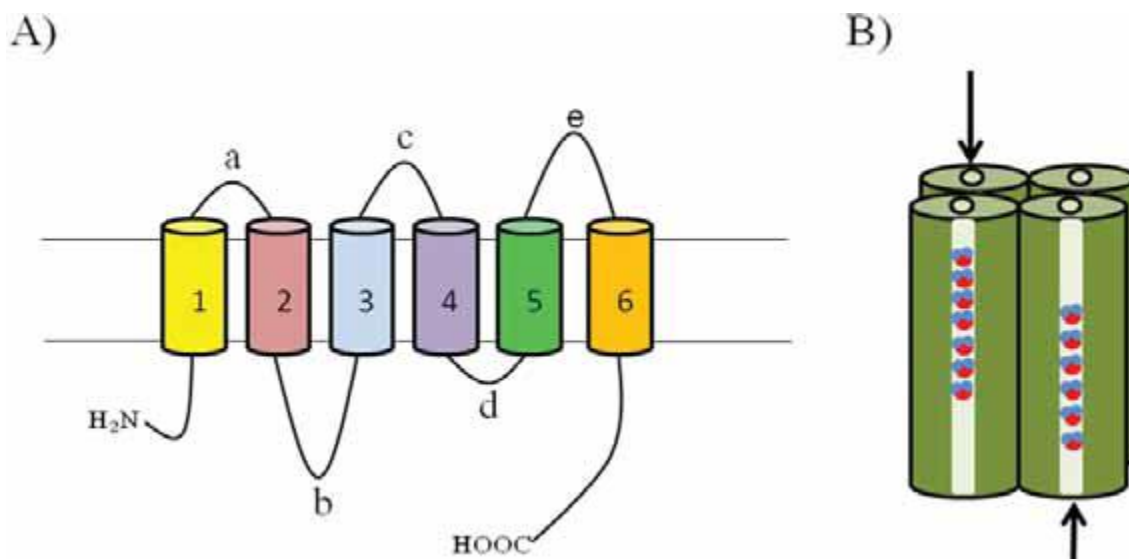


Figura 1.6-1 Representação esquemática das aquaporinas quanto à estrutura molecular (A) e a formação de homotetrâmeros que atuam como poros individuais para o transporte de água bidirecional (setas em B). 1 - 6 = domínios transmembrânicos; a - e = alças de conexão. Adaptado de Agre et al, 1995 e Verkman, 2005- Oliveira R. et al, 2013.

As aquaporinas estão localizadas em vários órgãos, tais como os rins, testículos, pulmões, pâncreas, cérebro, pele, (ouvido?) intern(o), tecido adiposo, útero, ovário, músculo esquelético entre outros (BADAUT et al., 2002; BEITZ et al., 1999; FRIGERI et al., 1998; ISHIBASHI, KUWAHARA, et al., 1997; ISHIBASHI, SASAKI, et al., 1997; LI, YU e KOIDE, 1994; PAGE et al., 1998; SHANAHAN et al., 1999). Essa ampla distribuição evidencia o papel dessas proteínas em diversos processos fisiológicos. Trabalhos mostram a participação de AQPs na migração celular e na angiogênese (SAADOUN et al., 2005), no acúmulo de gordura no adipócito (HARA-CHIKUMA e VERKMAN, 2006), na reabsorção de água nos ductos eferentes (FISHER et al., 1998) e na transdução neural de sinal (VERKMAN, 2005).

A AQP9 é mais expressa na membrana plasmática de hepatócitos. Estudos recentes indicam que a AQP9 não está envolvida apenas no movimento de água e na homeostase, mas também na difusão de metabólitos

e talvez exerça um papel no metabolismo energético de glicose e resistência a insulina (Kuriyama et al. 2002). A AQP1 é expressa em tecidos com alta taxa de transporte de gás, como o endotélio microvascular, o epitélio alveolar e em quimiorreceptores para O₂/CO₂ no corpo carotídeo (MUÑOZ-CABELLO et al., 2010).

As AQPs também são detectadas em vários órgãos do sistema genital feminino (Fig.1.6-2), como tubas uterinas, útero, vagina, colo uterino, placenta, âmnio (ANDERSON et al., 2006; BRAÑES et al., 2005; JABLONSKI et al., 2003; LI, YU e KOIDE, 1994; MANN et al., 2005; MCCONNELL et al., 2002).

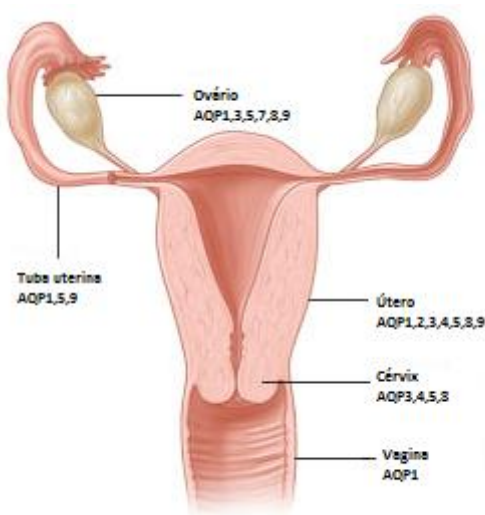


Figura 1.6-2 Representação esquemática da distribuição das aquaporinas no sistema genital feminino.

As aquaporinas exercem um importante papel durante a foliculogênese, contribuindo para a formação da cavidade antral através da mediação do transporte de água para o interior do folículo. McConnell e colaboradores em 2002 foram os primeiros a demonstrar que o influxo de água durante a formação antral não se dava exclusivamente por transporte intercelular, mas

era majoritariamente transcelular e se devia à ação de aquaporinas. Foram detectadas nas células da granulosa dos ovários de ratas as aquaporinas 7, 8, e 9 (MCCONNELL et al., 2002) e as aquaporinas 1, 5, e 9 na granulosa de porcas (SKOWRONSKI, KWON e NIELSEN, 2009).

A ovulação é o evento final dos ciclos ovarianos e depende do processo de desenvolvimento folicular. Após o pico de LH, o ambiente do folículo ovariano é alterado de forma a favorecer a liberação do ovócito. Dentre essas alterações podemos citar o aumento do aporte sanguíneo e das enzimas proteolíticas e rápido crescimento folicular. As AQPs são proteínas presentes em ovários durante todas as fases do ciclo estral e podem participar do desenvolvimento folicular que resulta no processo ovulatório, mas a literatura sobre a participação das AQPs no processo ovulatório ainda é escassa.

A ovulação é um evento regulado por hormônios adenohipofisários e esteróides e apresenta características de processo inflamatório e intensa angiogênese. Dentre as 13 proteínas do grupo das aquaporinas conhecidas, a AQP1 é a que tem sido associada com angiogênese vascular (SAADOUN et al., 2005) e com um rápido transporte de água necessário para a migração e a proliferação de novos vasos (SAADOUN et al., 2005; VERKMAN, 2005). Sua expressão pode também estar relacionada com processos inflamatórios e neoplasias (VACCA et al., 2001). A AQP9 é uma aquagliceroporina que pode ser regulada em alguns tecidos por androgênios (PASTOR-SOLER et al., 2002; QU et al., 2010; WANG et al., 2008) e em outros por estrogênios e progesterona (BRÑES et al., 2005; LEBECK et al., 2012; NURIA M PASTOR-SOLER, JANE S FISHER, RICHARD SHARPE, ERIC HILL, ALFRED VAN

HOEK, 2010). Devido às características já descritas pela literatura, as aquaporinas 1 e 9 foram, então, escolhidas como foco no presente estudo.

O modelo de crescimento folicular e ovulação induzidos por gonadotrofinas exógenas foi utilizado nesse trabalho para se determinar alterações na expressão das aquaporinas 1 e 9 envolvidas na ovulação.

Objetivos

1.1.OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão das aquaporinas 1 e 9 durante o desenvolvimento folicular e o processo ovulatório induzidos por gonadotrofinas em ovários de ratas.

1.2.OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Avaliar o efeito das gonadotrofinas na expressão do mRNA para as AQP1 e AQP9 em ovários através da técnica de Real-Time PCR;
- Determinar a imunolocalização das AQP1 e AQP9 durante o crescimento folicular e ovulação;
- Avaliar a participação da progesterona na expressão da AQP1, por bloqueio do antagonista RU-486;