

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Tese

**Atuação da Oncostatina e da Leptina na regulação  
folicular e luteal em bovinos**

**Kauê Rodriguez Martins**

Pelotas, 2018

**Kauê Rodriguez Martins**

**Papel da Oncostatina e da Leptina na regulação folicular e luteal em bovinos**

Tese apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia da  
Universidade Federal de Pelotas,  
como requisito parcial à obtenção do  
título de Doutor em Ciências

**Orientador:** Thomaz Lucia Jr.

**Co-Orientador(es):** Bernardo Garziera Gasperin

Rafael Gianella Mondadori

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

M379a Martins, Kauê Rodriguez

Atuação da oncostatina e da leptina na regulação folicular e luteal em bovinos / Kauê Rodriguez Martins ; Thomaz Lucia Jr., orientador ; Bernardo Garziera Gasperin, Rafael Gianella Mondadori, coorientadores. — Pelotas, 2018.

81 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Apoptose. 2. Oncostatina. 3. Leptina. 4. Célula da granulosa. I. Jr., Thomaz Lucia, orient. II. Gasperin, Bernardo Garziera, coorient. III. Mondadori, Rafael Gianella, coorient. IV. Título.

CDD : 620.8

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

**BANCA EXAMINADORA:**

Dr. Thomaz Lucia Junior (Orientador, Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária)

Dra. Eliza Rossi Komninou (Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária)

Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico)

Dr. Augusto Schneider (Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Nutrição)

Dra. Carine Dahl Corcini (Suplente, Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária)

### **Agradecimentos**

Agradeço aos orientadores Thomaz, Bernardo e Rafael por guiar este caminho tortuoso e gratificante que é o doutorado.

Agradeço ao professor Bernardo principalmente pelas conversas durante o término de meu mestrado e por me inspirar nestas conversas sobre os possíveis projetos com suas novas descobertas em relação a STAT3. Bem como oportunizar e abrir as portas de sua instituição natal para aprendizado e amadurecimento científico. Além disso se comprometer desde a idéia inicial do projeto até as nevascas canadenses para a montagem do documento final.

Agradeço a Monique pela transmissão de conhecimentos e de experiências da vida de doutorado.

Agradeço à todos os colegas de laboratório pelo convívio, mates e lanchinhos, Principalmente a Cristina e Verônica, que dividiram horas e horas de seu tempo em experimentos e análises.

Agradeço à todos os funcionários, animais e instituições que de alguma forma tornaram este estudo possível.

Agradeço à minha família.

Agradeço Universidade Federal de pelotas e o Programa de Pós –Graduação em Biotecnologia pela oportunidade.

Agradeço as agências de fomento pela bolsa de estudos e financiamento do projeto.

Obrigado!

## RESUMO

MARTINS RODRIGUEZ, Kauê. **Atuação da oncostatina e da leptina na regressão folicular e luteal em bovinos**. 81f. Tese de Doutorado em Biotecnologia - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

A “Janus Kinase 2” (JAK2)/ “*signal transducer and activator of transcription 3*” (STAT3) é uma rota que media sinais extra celulares para o núcleo da célula e por sua vez promove a transcrição de alguns genes. Esta rota está presente em diversos tipos celulares e tecidos, podendo ser ativada por diversas moléculas. No ovário, estudos recentes demonstram que existe a presença elevada de STAT3 fosforilada em folículos subordinados em processo de apoptose. A hipótese deste estudo é que esta rota seja ativada pela OSM ou pela leptina e por sua vez inicie o processo de apoptose mediado pela STAT3. A OSM é uma citocina da família da IL-6, produzida principalmente por macrófagos e está envolvida na hematopoiese, inflamação, desenvolvimento do sistema nervoso central, porém seu papel no ovário ainda é desconhecido. Não foi detectada a transcrição relativa de OSM durante a divergência e ovulação, porém havia transcrição de seu receptor durante a fase luteal, quando ambos são possivelmente transcritos, expressos e regulados após o tratamento com PGF. A incubação de células da granulosa com OSM modulou a transcrição relativa de OSMR e XIAP, bem como a razão entre os genes BAX/BCL2. Por sua vez, a leptina é uma adipocina secretada primariamente por adipócitos, envolvida no balanço energético, sendo responsável pela saciedade. A leptina apresenta ação no sistema nervoso central, inflamação, formação óssea, angiogênese, desenvolvimento fetal e na reprodução. Porém, até o momento, sua função ainda não é bem definida e a literatura tem controvérsias quanto a sua ação nos ovários. A imunohistoquímica revelou maior intensidade da leptina e seu receptor em folículos subordinados, bem como alteração na expressão dos genes LEPR, ADIPOR1, ADIPOR2 em folículos dominantes e subordinados. A injeção intrafolicular de leptina (100 ou 1000ng/ml) *in vivo* não apresentou efeito sobre a ovulação. Não houve mudança na expressão dos genes relacionados à esteroidogênese em células da granulosa cultivadas *in vitro*.

**Palavras-chave:** apoptose, oncostatina, leptina, célula da granulosa.

## ABSTRACT

MARTINS RODRIGUEZ, Kauê. **Performance of the Oncostatin and Leptin in follicular regression and luteolysis in cattle**. 81p. Thesis of PhD in Biotechnology – Postgraduate Program in Biotechnology, Federal University of Pelotas. Pelotas, 2018.

The Janus Kinase 2 (JAK2)/ Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) is an intracellular pathway that mediates extra cellular signals to several cell types and tissues and can be activated by several molecules. In the ovaries, recent studies demonstrated that there is a great presence of phosphorylated STA3 in subordinate follicles in process of apoptosis. The hypothesis of this study is that this route can be activated by OSM or leptin and initiate the process of apoptosis mediated by STAT3. OSM is a cytokine of the IL-6 family, mainly produced by macrophages and is involved in hematopoiesis, inflammation, central nervous system development, but its role in the ovary is still unknown. No OSM relative transcription was detected during divergence and ovulation, but its receptor was present during the luteal phase, when both were expressed and regulated after treatment with PGF. Incubation of granulosa cells with OSM modulated the relative transcription of OSMR and XIAP, as well as the ratio between the BAX/BCL2 genes. Leptin is primarily secreted by adipocytes and involved in energy balance, being responsible for satiety, acting in the central nervous system, inflammation, bone formation, angiogenesis, fetal development and reproduction. However, its function is still not well defined and the literature is somewhat controversial regarding to its function in the ovaries. Immunohistochemistry revealed greater intensity of leptin and its receptor in subordinate follicles, as well as a change in the relative transcription of LEPROT, ADIPOR1, ADIPOR2 genes in dominant and subordinate follicles. Intrafollicular injection of leptin (100 or 1000ng / ml) in vivo had no effect under ovulation. There was no change in the relative transcription of steroidogenesis-related genes in granulosa cells cultured in vitro.

**Key-words:** apoptosis, oncostatin, leptin, follicle, granulosa cell.

## Sumário

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	8
1.1 Oogênese e foliculogênese pré-antral .....	8
1.2 Foliculogênese antral e regressão folicular .....	9
1.3 Formação e regressão do corpo lúteo .....	12
1.4 Transdutor de sinal ativador da transcrição 3 (STAT3) .....	13
1.5 Fatores que promovem a ativação da STAT3 .....	16
1.5.1 Interleucina 6 (IL-6) .....	16
1.5.2 Fator inibidor de leucemia (LIF) e oncostatina (OSM) .....	17
1.5.1 Fator ciliar neurotrófico (CNTF) .....	18
2 HIPÓTESE E OBJETIVOS .....	19
2.1 Hipótese .....	19
2.2 Objetivo geral .....	19
2.3 Objetivos específicos .....	19
3 CAPÍTULOS .....	21
3.1 Artigo 1 - <b>Oncostatin M and its receptors regulation in bovine granulosa and luteal cells</b> .....	21
3.2 Manuscrito 1 - <b>Regulação e função da leptina durante o desenvolvimento folicular em bovinos</b> .....	22
4 DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS .....	23
5 CONCLUSÃO GERAL .....	24
6 REFERÊNCIAS .....	24

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Oogênese e foliculogênese pré-antral

O desenvolvimento folicular dos mamíferos inicia-se na vida fetal, quando as células tronco primordiais proliferam através da mitose (HIRSHFIELD, 1991). Estas células então iniciam a síntese de DNA, estágio em que as oogônias se transformam em oócitos primários. Estes oócitos iniciam a meiose, progredindo até a primeira prófase, permanecendo neste estágio durante todo o restante do desenvolvimento folicular. Ao chegar ao estágio de diplóteno da primeira divisão meiótica, o oócito começa a ser circundado por uma única camada de 4-8 células da granulosa e apresenta uma lâmina basal intacta, formando o folículo primordial quiescente (AERTS & BOLS, 2010). A fêmea bovina possui suas reservas de células germinativas (folículos primordiais) já estabelecidas ao nascimento (GREENFELD et al., 2007; EDSON et al., 2009). Os folículos primordiais permanecem em quiescência até a sua ativação ao longo da vida reprodutiva do animal (FORTUNE, 1994).

A ativação do folículo primordial se caracteriza pela transformação das células da granulosa, que passam da forma achatada original para uma forma cuboide, e, posteriormente, por sua proliferação (LEE et al. 2001), ao cultivarem células da granulosa *in vitro* com a proteína morfogenética óssea 7 (BMP-7), observaram um aumento na proliferação celular e na produção de timidina (metabolizada pela timidina quinase que tem papel na incorporação a novas moléculas durante a síntese DNA, principalmente em novas células) (FUJIWAKI et al., 2002)), sendo que a injeção deste fator na bursa ovariana *in vivo* levou a um aumento no número de folículos primários. O tratamento com o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF9) também se mostrou capaz de ativar folículos primordiais em ratas imaturas, os quais se desenvolveram até o estágio de folículos primários (VITT et al., 2000). Além disso, em roedores, a diminuição na expressão de GDF9 reduz o número de folículos funcionais (CHOUDHURY & KHOLE, 2015). Portanto, fica claro que o desenvolvimento folicular pré-antral também é controlado por fatores locais ovarianos (YING et al., 2001), sendo independente de gonadotrofinas.



A progressão de folículos primários até o estágio de folículos secundários se caracteriza pela formação da segunda camada de células da granulosa e pela deposição inicial da zona pelúcida ao redor do oócito, ao mesmo tempo em que se formam grânulos corticais no oócito (AERTS & BOLS, 2010). Nesta fase, o folículo se torna responsivo às gonadotrofinas e ocorre a expressão de RNAm para o receptor do hormônio folículo estimulante (FSH), nas células das duas primeiras camadas da granulosa. A atividade transcricional continua até o folículo atingir 2-3 mm e o oócito alcançar um diâmetro de 110-120 µm (FAIR et al., 1995; OTOI et al., 1997). O oócito continua a acumular RNA, ribossomos e polipeptídios durante essa fase de seu desenvolvimento. Durante a transição para o estágio de folículo terciário, as camadas da teca interna e externa, a lâmina basal e as células do *cumulus oophorus* continuam a crescer e se diferenciar. O grande marco do estágio terciário é a formação da cavidade antral e a produção do fluido folicular (AERTS & BOLS, 2010).

## 1.2 Foliculogênese antral e regressão folicular

Ao nascimento, a fêmea bovina já possui folículos em fase primária e secundária de desenvolvimento. Cada onda de crescimento folicular é precedida de um aumento na concentração sérica de FSH. Folículos terciários (antrais) sensíveis respondem a este aumento e formam uma coorte de folículos crescentes (ADAMS et al., 1992; GINTHER et al., 1996). Dentre os folículos desta coorte, apenas um se torna dominante, crescendo até a ovulação. A ovulação ocorre apenas em fêmeas púberes, quando os níveis de progesterona estão reduzidos durante o ciclo estral, permitindo maior frequência de pulsos do hormônio luteinizante (LH).

A divergência folicular ocorre a partir do momento no qual o folículo dominante se destaca. Simultaneamente, os demais folículos cessam o seu desenvolvimento, tornando-se subordinados, devido à ação do estradiol e da inibina sintetizados pelo folículo dominante (GINTHER et al., 1996). Em vacas *Bos taurus taurus*, o folículo dominante torna-se diferenciado quando atinge 8,5 mm de diâmetro e passa a expressar receptores de LH (LHCGR) nas células da granulosa, tornando-se dependente deste hormônio (BEG & GINTHER, 2006).

Portanto, o folículo dominante somente irá ovular em um ambiente endócrino com baixos níveis de progesterona (FORTUNE et al., 2001). Caso contrário, o folículo dominante irá entrar em atresia, de forma similar à que ocorre com os folículos subordinados (VALDEZ et al., 2005).

A regressão folicular durante a atresia é desencadeada por apoptose, resultando em morte celular, levando os folículos a desaparecerem da superfície ovariana. A apoptose determina o ciclo de vida de células eucarióticas, respondendo a vários estímulos (JARPE & YUJIRI, 1998), tais como: encolhimento celular; condensação nuclear; fragmentação do DNA; e alterações na membrana (CAROU et al., 2015). Segundo KONDRATSKYI et al. (2015), dependendo do tipo e da origem da sinalização, a apoptose pode ocorrer através de dois mecanismos: intrínseco, através da mitocôndria; ou extrínseco, através de receptores de morte. No entanto, apesar dos distintos mecanismos de inicialização da sinalização e das moléculas envolvidas nestas rotas, existe uma associação fundamental entre estes (TAYLOR et al., 2008).

A maioria das mudanças morfológicas e bioquímicas observadas em células apoptóticas são inicialmente causadas por proteases de origem cisteínica conhecidas como caspases, que existem em células normais na forma de enzimas precursoras com pouca ou nenhuma atividade proteolítica, mas que se tornam ativas durante a apoptose (HENGARTNER, 2000). Grande parte das caspases atuam neste mecanismo de morte programada, sendo divididas em iniciadoras e efetoras: As enzimas iniciadoras ativam as efetoras, as quais realizam grande parte da proteólise e da ativação das DNases observadas no processo de apoptose (HENGARTNER, 2000).

Sinais extracelulares pró-apoptóticos induzem a via extrínseca, ativando membros da família de receptores do fator de necrose tumoral (TNF), os quais são conhecidos como receptores de superfície específicos (de morte). Estes, por sua vez, ativam a rota de apoptose dependente das caspases. Fatores extracelulares pró-apoptóticos ou ligantes e seus respectivos receptores incluem, entre outros: FAS/CD95, que se liga a CD95; TNF $\alpha$ , que se liga ao TNFR1; TNF relacionado a ligante indutor de apoptose (TRAIL), que se liga ao TRAILR1-2 (WAJANT, 2002). A interação com o FasL, ligado a membrana, reorganiza estes complexos e permite a formação de um *death inducing signaling complex* (DISC). O complexo Fas-DISC contém o Fas-associated

*death domain protein* (FADD) e as caspases 8 e 10, iniciam o processo de apoptose (WAJANT, 2002).

Quando ativada, a caspase-8 ativa diretamente a caspase-3, iniciando a apoptose mediada por caspases (PARISH et al., 2013). A caspase-8 também pode mediar a clivagem do membro da família de proteínas Bcl2 denominado domínio agonista de interação de morte BH-3 (*BH-3 interacting death agonist* - BID). Este resulta em um BID truncado (tBID), induzindo a permeabilização da membrana exterior da mitocôndria (MOMP), a liberação do citocromo C da mitocôndria e a ativação da apoptose dependente da caspase-9 (LUO et al., 1998).

No ovário, a apoptose está envolvida em muitos processos fisiológicos, como: recrutamento de células germinativas; atresia folicular, com morte de células da granulosa; ovulação, com morte das células epiteliais do folículo e luteólise, com morte das células luteais (CAROU et al., 2015). Os folículos ovarianos estão predestinados a entrar em atresia e a degenerar, através de processos apoptóticos, a menos que sejam resgatados e induzidos a crescer, ovular e luteinizar, por estímulos hormonais (REBAR & ERIKSON, 2012). Os processos de sinalização envolvidos em tais eventos resultam na transcrição de genes e na tradução em proteínas específicas. Dados obtidos em trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa indicam que uma das proteínas potencialmente envolvidas na regressão folicular é a STAT3 (GASPERIN et al., 2015), uma vez que esta rota de sinalização encontra-se ativa apenas nas células da granulosa de folículos atrésicos. Apesar da maioria dos dados de literatura demonstrar que a principal função da STAT3 está relacionada à proliferação celular, na glândula mamária a sua ativação é necessária para que ocorra a clivagem da caspase 3 e a consequente morte celular por apoptose (CHAPMAN et al., 1999). Além disso, no mesmo tipo celular, a ativação da STAT3 está associada à morte, independente da ativação de caspases, mediada por lisossomos (KREUZALER et al., 2011).

### 1.3 Formação e regressão do corpo lúteo

A ativação dos receptores de LH em células foliculares pela onda de LH pré-ovulatória causam a ovulação e uma rápida mudança morfo e fisiológica do folículo ovulado em corpo lúteo (CL) (STOCCO et al., 2007).

O corpo lúteo é uma glândula transitória formada a partir das células da parede folicular (células da teca e granulosa), composta por células esteroidogênicas (células luteais grandes e pequenas), células não esteroidogênicas (células endoteliais, fibrócitos e células imunes) (NISWENDER et al., 2000). O CL é um local de remodelação, crescimento e morte de células originárias da granulosa, teca, capilares e fibroblastos (STOCCO et al., 2007), sendo a progesterona (P4) o principal hormônio secretado, necessário para o estabelecimento, manutenção da prenhez e como mecanismo de feedback negativo para o hipotálamo para suprimir subsequente desenvolvimento folicular.

Esta remodelação envolve uma constante síntese e quebra da matriz extracelular (DUNCAN, 2000), ação promovida principalmente pelas metaloproteínas (MMP's) (HULBOY et al., 1997), tendo como função a degradação de grande parte dos colágenos estruturais, gelatinas e elastinas (CURRY & OSTEEEN, 2003). A ação das MMP's está intimamente ligada com a atividade das inibidoras de metaloproteínas (TIMP's). A luteólise é associada a uma infiltração de células imunes (Branstromm, 1994), tal como macrófagos, que aumentam em número durante a fase luteal e estão presente no momento da regressão e são capazes de ativar e produzir MMP's (Duncan, 2000).

Na ausência de prenhes, sinais embrionários ou ao fim da fase luteal, o corpo lúteo inicia sua regressão, a produção de progesterona diminui em função do aumento da produção de prostaglandina que tem o papel de iniciadora da luteólise em diversas espécies (KINDAHL et al., 1976; SILVIA et al., 1991).

Tratamentos com PGF diminuem as concentrações luteais de RNAm dos receptores de LH, lipoproteína de densidade baixa (LDL), *steroidogenic acute regulatory protein* (StAR) e *3 $\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase* (3 $\beta$ -HSD) (FIEDLER et al., 1999), porém quando este estímulo é realizado em dois pulsos distintos podem aumentar a transcrição de genes relacionados a esteroidogênese e angiogênese durante o primeiro pulso e genes relacionados à ativação imune em um segundo pulso (ATLI et al., 2012) além de reduzir o

fluxo sanguíneo para o ovário, resultante de um acúmulo de cálcio intracelular (DEVOTO et al., 2009).

#### **1.4 Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3)**

A proteína STAT3 pertence à família STAT, composta pelas proteínas STAT-1, -2, -3, -4, -5a, -5b e -6 (DARNELL, 1997). As proteínas desta família compartilham uma estrutura similar (DARNELL, 1997; MIKLOSSY et al., 2013), apresentando-se inativas como fatores de transcrição, na ausência de estímulo de receptores específicos, localizando-se no citoplasma de células não estimuladas. Estas proteínas são ativadas rapidamente, em resposta ao acoplamento do ligante-receptor e recrutadas para o domínio intracelular, através da ligação específica entre os domínios STAT Src-homology 2 (SH2) e resíduos de receptores de fosfotirosina (DARNELL, 1997).

Ainda que muitos receptores de fatores de crescimento tenham atividade intrínseca da tirosina kinase, a maioria dos receptores ativadores da STAT não tem a mesma atividade. A ativação da tirosina kinase é provida por proteínas associadas a receptores citoplasmáticos da família das janus kinases (JAK). As JAKs se ligam especificamente ao domínio intracelular do receptor de citocina, sinalizando cadeias e a sua própria fosforilação, bem como de resíduos de tirosina intracelular no receptor, criando pontos de ancoragem para STAT. Em resposta a citocinas e a fatores de crescimento, proteínas da família STAT são fosforiladas por receptores associados a quinases (pSTAT), formando homo ou heterodímeros, competentes para se ligarem ao DNA, que se translocam para o núcleo da célula, onde atuam como fatores de transcrição (LEVY & LEE, 2002).

Uma vez ativados, os dímeros da pSTAT reconhecem o promotor alvo e a taxa de transcrição deste é aumentada, porém sua atividade pode ser reprimida por proteínas da família da PIAS. A capacidade de induzir a transcrição do gene alvo é uma propriedade intrínseca dos dímeros da pSTAT, refletindo na habilidade dos domínios de ativação transcricional de recrutarem co-ativadores que mediam modificações na cromatina e a comunicação com promotores do núcleo (AARONSON, 2002). A fosforilação da tirosina da STAT é transitória e depende do tipo de estímulo em células normais, com duração variável, desde 30 min até várias horas (EBONG et al., 2004; TIFFEN et al., 2008). Entretanto,

as STAT com tirosinas desfosforiladas são transportadas do núcleo para o citosol (DARNELL, 1997).

Alterações na atividade constitutiva da STAT3 em tumores pode promover a sobrevivência e a proliferação celular, regulando negativamente respostas imunes antitumorais e também promover a angiogênese tumoral, intensificar a invasão e a metástase tumoral, através da indução da transição epitelial para mesenquimal, alterar a matriz extracelular através da expressão de metaloproteinases, modificar a atividade energética e metabólica celular e a atividade mitocondrial (AVALLE et al., 2017).

A STAT3 pode ser ativada através da fosforilação na tirosina 705 e na serina 727 (LEVY & DARNELL, 2002) e de vários outros sítios de ativação (AVALLE et al., 2017), em resposta à várias citocinas e fatores de crescimento. Entre estes podem ser citados: interferons (SCHINDLER & PLUMLEE, 2008; REBE et al., 2013); fatores de crescimento semelhantes a insulina (IGF) (EBONG et al., 2004); fator de crescimento fibroblástico (FGF) (EBONG et al., 2004); fatores de crescimento epidérmicos (EGF); interleucina 6 (IL6) (MOTTA et al., 2007; YUN et al., 2012); fatores de crescimento de hepatócitos; fator inibidor de leucemia (LIF); BMP-2; IL10; leptina (LI et al., 2007) e oncostatina (OSM) (KREUZALER et al., 2011).

A STAT3 media a expressão de vários genes, em resposta a estímulos celulares, com atuação nos processos de crescimento celular e apoptose (AARONSON, 2002). A desregulação da rota STAT3 é ligada à oncogênese, estimulando a proliferação celular e a angiogênese, mediando evasão imune e conferindo resistência à apoptose induzida por terapias convencionais contra o câncer (DARNELL, 2002; GAO & BROMBERG, 2006). Dados sobre análises da perda condicional em tecidos adultos confirmam que a STAT3 atua em vários processos ligados ao desenvolvimento embrionário e à homeostase na fase adulta (GAO & BROMBERG, 2006) e a eventos pró-apoptóticos (ABELL et al., 2005) e anti-apoptóticos (UCKUN et al., 2007).

A STAT3 pode interagir diretamente com uma tubulina ligante de proteína, afetando a reorganização do citoesqueleto e a motilidade celular. Em camundongos, a remoção da STAT3 resultou em letalidade embrionária precoce (TAKEDA et al., 1997), mesmo em células tronco embrionárias (MATSUDA et al., 1999). Apesar de muitos estudos indicarem ação anti-apoptótica da STAT3,

também há evidências de efeito oposto. Em camundongos fêmea, o *knockout* condicionado para STAT3 impediu a involução da glândula mamária, mantendo estruturas alveolares intactas e poucos lipídeos, enquanto que as glândulas das fêmeas do grupo controle tiveram involução normal, sugerindo que existe associação entre processos apoptóticos e a ativação da rota que ocasiona a involução (CHAPMAN et al., 1999). A participação da STAT3 na regulação da morte induzida por lisossomos em células da glândula mamária de camundongos indica sua atuação direta na involução mediada pelas catepsinas B e L (KREUZALER et al. 2011).

Existem informações escassas sobre a função da STAT3 na fisiologia reprodutiva, embora vários ligantes que usam esta rota de sinalização sejam expressos no ovário. Em camundongos com deleção condicional para STAT3, identificou-se sua atuação nas células do estroma uterino durante a implantação do embrião e no desenvolvimento de uma placenta funcional (ROBKER et al., 2014). Ainda, a ausência da STAT3 no útero causou falhas na gestação e desenvolvimento dismórfico da placenta, resultando em morte e reabsorção embrionárias destes animais. No mesmo trabalho, em ovócitos, a STAT3 não apresentou papel evidente, pois a recombinação removeu eficientemente o gene e a abundância proteica resultante, não havendo efeito sobre o desenvolvimento e a fertilização (ROBKER et al., 2014). Também foi constatada a inabilidade de deletar a STAT3 em células da granulosa, usando o vetor de expressão cre-recombinase pelo promotor *Amhr2*, sugerindo uma ligação regulatória entre a STAT3 e *Amhr2* em camundongos (ROBKER et al., 2014).

Segundo RUSSELL & RICHARDS (1999), a STAT3 é seletivamente ativada nas células da granulosa de pequenos folículos por algum fator, além da prolactina, sendo que a capacidade de ligação ao DNA da STAT3 é reduzida em folículos em desenvolvimento, possivelmente pelo aumento da proteína inibitória da STAT3 (PIAS-3). Também ocorre aumento na ativação da STAT3 (fosforilação) em células da granulosa de ratas hipofisectomizadas, sugerindo uma participação desta proteína na morte celular pois, neste modelo, os folículos regredem devido à ausência de gonadotrofinas, em função da remoção da hipófise (RUSSELL & RICHARDS, 1999). A ativação da STAT3 nas células da granulosa foi revertida após tratamento com estradiol e FSH, o que foi temporariamente associado com aumento marcante na expressão de PIAS3, um

regulador negativo da atividade ligante de DNA da STAT3. De forma similar, o tratamento com FSH para induzir codominância também impede a fosforilação da STAT3 nas células da granulosa, reforçando a hipótese de esta se encontra fosforilada apenas em células de folículos em regressão (ILHA et al., 2015).

A família de proteínas PIAS (PIAS1, PIAS3, PIASx e PIASy) e SOCS (*suppressor of cytokine signaling*) regulam a atividade das STATs (ALEXANDER, 2002; SHUAI & LIU, 2003; DABIR et al., 2009). Por estímulo das citocinas, PIAS-1 e -3 se ligam a STAT-1 e -3 ativadas, respectivamente, e previnem sua habilidade de se ligar ao DNA (SHUAI & LIU, 2003), sendo que a PIAS-3 é dependente da concentração e do tempo (DABIR et al., 2009). Neste sentido, alguns bloqueadores naturais e sintéticos da STAT3 vêm sendo estudados (TURKSON et al., 2001; SIDDIQUEE et al., 2007; DABIR et al., 2009; ZHANG et al., 2010; LIU et al., 2013). O S3I-201 é um bloqueador sintético da atividade da STAT3, que inibe a sua fosforilação e a ligação ao DNA, através do domínio SH2. O S3I-201 induz a apoptose de células epiteliais cancerígenas, inibindo a STAT3 de suas atividades, levando a regressão da resposta antitumoral em um modelo animal para o estudo do câncer de mama (SIDDIQUEE et al., 2007).

## 1.5 Fatores que promovem a ativação da STAT3

A Família da interleucina 6 (IL-6) é um grupo de citocinas estruturalmente similares e requerem a glicoproteína 130 (gp130/ IL6ST) como comum transdutor de sinal para seus receptores (ELKS & STEPHENS, 2015). Esta família inclui a IL-6, IL-11, IL-27, IL-31 fator inibitório da leucemia (LIF), oncostatina (OSM), fator ciliar neurotrópico (CNTF), cardiotropina-1 (CT-1), cardiotropina semelhante a citocina e a neuropoietina (revisado por (FASNACHT & MULLER, 2008).

### 1.5.1 Interleucina 6 (IL-6)

A interleucina-6 (IL6) é uma citocina originalmente identificada como fator de diferenciação de células B, que produz efeitos em vários tipos celulares. A IL6 se liga ao receptor trans-membrana IL6R, que induz uma heterodimerização com o co-receptor gp130. O gp130 é expresso em diversos órgãos e o IL6R é expresso em hepatócitos, leucócitos e células da granulosa.



O gp130 dimerizado dispara a ativação da Janus tirosina kinase (JAK) que, em resposta, fosforila a STAT3. O acoplamento da gp130 também leva a ativação da cascata ERK/MAPK. A ativação da STAT3 parece ser regulada pela sinalização através de receptores de outros fatores. Um mecanismo de padrão bifásico para ativação da STAT3 foi proposto, no qual quando o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) está presente e ativo, a STAT3 é refosforilada 4 h após a exposição à IL6 ou oncostatina (OSM) e permanece ativa por várias horas (WANG et al., 2013).

Sob condições fisiológicas normais, a IL6 é produzida nas células da granulosa. Porém, alguns estudos têm sugerido que IL6 afeta negativamente as funções reprodutivas do ovário, por bloqueio da ação positiva do FSH sobre a síntese de estradiol e da progesterona em células da granulosa de camundongos (GOROSPE et al., 1992; ALPIZAR & SPICER, 1994). Em contrapartida, a IL6 também age como um potente regulador autócrino nas células do *cumulus oophorus*, na expansão do complexo *cumulus*-oócito e na competência oocitária (LIU et al., 2009). Através de microarranjos, foi demonstrado que a expressão do gp130 é maior na granulosa de folículos subordinados do que na dos dominantes (FORDE et al., 2008). Além disso, o tratamento com FSH reduz a expressão de gp130 na granulosa de folículos bovinos (ILHA et al., 2015), fortalecendo a hipótese de que a sinalização da IL6 é mais ativa durante a morte celular. Embora o receptor gp130 seja mais expresso em folículos subordinados (FORDE et al., 2008), a exata regulação e função da IL6 durante a divergência folicular ainda são desconhecidos.

### 1.5.2 Fator inibidor da leucemia (LIF) e oncostatina (OSM)

O fator inibitório da leucemia (LIF) e a oncostatina M (OSM) são membros da família de citocinas da IL6 (revisado por (Heinrich et al., 2003). Todos os fatores desta família utilizam a subunidade do receptor transmembrana gp130, para realizar a sinalização e ativam a rota da Janus Kinase intracelular/ativador de transcrição (JAK/STAT). A ligação de LIF ou OSM induz a heterodimerização das subunidades dos receptores gp130 com uma segunda subunidade receptor específico de LIF (LIFR) ou com o receptor de OSM (OSMR). A OSM tem a capacidade de se ligar ao receptor de LIF, competindo e

regulando as funções de LIF na célula alvo. Assim, o sinal de transdução é mediado pela ativação da tirosina kinase da família JAK e de fatores de transcrição da família STAT, principalmente STAT1 e STAT3. As STATs fosforiladas translocam-se como dímeros para o núcleo e regulam a transcrição de genes alvo. A LIF exerce um papel na diferenciação de células da leukemia, resposta inflamatória, desenvolvimento neuronal, implantação embrionária, auto renovação de células tronco e progressão de cânceres (YUE, WU & HU, 2015). WATANOBÉ & YONEDA (2001) descobriram que a LIF também é capaz de estimular o eixo GNRH-LH em ratos de uma maneira similar à leptina e o CNTF.

Já a OSM possui várias funções: hematopoese; remodelação óssea e de gorduras; desenvolvimento do sistema nervoso central; e regeneração do fígado (revisado por (RICHARDS, 2013)). A OSM também exerce papel pró-inflamatório nas articulações, pele, pulmão e nas doenças vasculares sugerindo que sua ação *in vivo* é específica e dependente do tecido e das citocinas presentes (revisado por (RICHARDS, 2013)). Porém, sua ação em células cancerígenas é variada, dependendo do tipo de câncer e do tipo celular, podendo se portar como anti-proliferativo ou estimular o aumento de tumores de fenótipo invasivo.

As funções da OSM no endométrio humano não são totalmente compreendidas (TANAKA & UMESAKI, 2003). Da mesma forma, em humanos, a OSM é expressa pelas células da granulosa e oócitos de folículos a partir da fase primordial, em ovários de fetos e adultos, porém, sua regulação e função são completamente desconhecidas (ABIR et al., 2005). O fato de que a OSM induz a ativação da STAT3 levando à morte das células da glândula mamária (KREUZALER et al., 2011), e que seu receptor é mais expresso em folículos subordinados (FORDE et al., 2008), sugere uma função potencial na regressão folicular, embora esta hipótese não tenha sido investigada.

### 1.5.3 Fator ciliar neurotrófico (CNTF)

O CNTF é uma citocina neuro regulatória que promove expressão gênica, sobrevivência e diferenciação de uma variedade em células do sistema nervoso de mamíferos (RICHARDSON, 1994). A descoberta que o eixo ativador reprodutivo e potencial anorexogênico são compartilhados pela leptina e o CNTF

sugerem que outros membros da superfamília das citocinas IL6 podem também exibir atividades neuroendócrinas (WATANOBE & YONEDA, 2001). A leptina também é uma ativadora de sinal da rota STAT (BUETTNER et al., 2006).

O CNTF tem um papel significativo na regulação do LH e PRL pré-ovulatória em ratos, porém a CNTF parece ter um papel menor, ligando mecanismos de controle nutricional e reprodutivo quando comparado à leptina (WATANOBE & YONEDA, 2001). Embora o conhecimento sobre a dinâmica folicular após o início do processo de regressão ainda seja limitado, estudos sugerem uma associação entre a STAT3 e as rotas da prolactina e da leptina (RUSSELL & RICHARDS, 1999; GASPERIN et al., 2015; ILHA et al., 2015). Estudos funcionais, avaliando o efeito de ligantes que estimulam a STAT3 ou investigando o efeito do bloqueio desta rota sobre o destino das células da granulosa, são necessários para o melhor entendimento da sua participação na regressão folicular.

## **2 HIPÓTESE E OBJETIVOS**

### **2.1 Hipótese**

Este estudo tem como hipótese que fatores presentes no ovário são necessários para a indução da apoptose mediado pela rota Jak2/STAT3 em células da granulosa bovina

### **2.2 Objetivo geral**

Elucidar a ação da Oncostatina e Leptina na dinâmica da regressão folicular em vacas, em especial nos eventos de apoptose.

### **2.3 Objetivos específicos**

- Caracterizar a transcrição de moléculas e receptores que utilizam a rota da STAT3 na divergência folicular, ovulação e luteólise em fêmeas bovinas, além de investigar sua associação com a morte das células da granulosa;

- Identificar funções *in vivo* e *in vitro* da leptina nas células da granulosa de ovários bovinos.
- Identificar funções *in vivo* e *in vitro* da oncostatina nas células da granulosa de ovários bovinos.

**3 Capítulo 1****3.1 Artigo 1**

Artigo formatado submetido ao Periódico *Theriogenology*.

**Oncostatin M and its receptors regulation in bovine granulosa and luteal cells**

# Oncostatin M and its receptors regulation in bovine granulosa and luteal cells

K.R. Martins<sup>ab</sup>, C.S. Haas<sup>a</sup>, J.G. Ferst<sup>c</sup>, M.T. Rovani<sup>ac</sup>, A.L.F. Goetten<sup>d</sup>,  
R. Duggavathi<sup>e</sup>, V. Bordignon<sup>e</sup>, V.V.M. Portela Jr.<sup>f</sup>, R. Ferreira<sup>f</sup>, B.G. Gasperin<sup>a</sup>, P.B.D.  
Gonçalves<sup>c</sup>, T. Lucia Jr.<sup>ab1</sup>

<sup>a</sup>ReproPel, Faculdade de Veterinária, <sup>b</sup>Centro de Desenvolvimento Tecnológico,  
Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

<sup>c</sup>Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>d</sup>Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos, SC, Brazil.

<sup>e</sup>Department of Animal Science, McGill University, Montreal, Canada.

<sup>f</sup>Universidade do Estado de Santa Catarina, Chapecó, SC, Brazil.

## Abstract

Oncostatin M (OSM) and its receptor (OSMR) are members of the interleukin-6 family cytokines. Although *OSM* and *OSMR* expression was detected in human ovaries, their function and regulation during follicle development, ovulation and luteolysis have not been studied in any species. The aim of the present study was to investigate the levels of *OSM* and *OSMR* mRNA in bovine ovaries and the effect of OSM treatment on cultured granulosa cells. *OSM* mRNA was not detected in granulosa cells obtained from follicles around the time of follicular deviation and from pre-ovulatory follicles, whereas *OSMR* transcript levels were greater in granulosa cells of atretic subordinate follicles ( $P < 0.001$ ). Abundance of *OSMR* mRNA increased in granulosa cells of preovulatory follicles, collected at 12 and 24 h after the ovulatory stimulus with GnRH ( $P < 0.001$ ). In the luteal tissue, *OSM* mRNA abundance steadily increased up to 48 h after PGF-induced luteolysis ( $P < 0.01$ ), whereas *OSMR* mRNA was transiently increased at 2 h after PGF treatment ( $P < 0.05$ ). In cultured granulosa cells, 10 ng/mL OSM in the presence of FSH increased *BAX/BCL2* mRNA ratio ( $P < 0.05$ ) compared to the control. Moreover, 100 ng/mL OSM in the presence of FSH increased *OSM* ( $P < 0.05$ ) and decreased *XIAP* mRNA ( $P < 0.05$ )

levels, compared to the control group. These findings suggest that OSMR is involved in follicle atresia, ovulation and luteolysis, and that OSM may mediate granulosa and luteal cell death.

**Key Words:** folliculogenesis, luteolysis, granulosa cells, apoptosis, oncostatin M.

## 1. Introduction

In mono-ovulatory species, such as humans and cattle, several follicles are recruited to grow in each follicular wave. However, in most cases, only one of them becomes a dominant follicle capable of ovulation [1]. The subordinate follicles within a wave undergo apoptosis and become atretic, due to the action of estradiol and inhibin, which suppress the release of FSH. This process can be both intrinsic, through the mitochondria, and extrinsic, through death receptors, depending on the type and the origin of the signal [2]. In the ovary, apoptosis is involved in follicular atresia, ovulation and luteolysis [3-5]. The signaling of such events results in the expression of genes and synthesis of specific proteins.

Oncostatin M (OSM) is one of the apoptosis inducers. OSM is a member of the IL6 family of cytokines, which includes IL6, IL11, leukemia inhibitory factor (LIF) and cardiotrophin 1 (CTF1) (reviewed by Heinrich et al. [6]). Cytokines of this family use the subunit of the gp130 transmembrane receptor (*IL6ST*) to activate the janus kinase/signal transducer and activator of transcription signaling pathway (JAK/STAT). Binding of either LIF or OSM induces heterodimerization of the subunits of the *IL6ST* receptor with a second subunit of the LIF specific receptor (LIFR) or with the OSM receptor (OSMR), propagating intracellular signaling [6].

Depending on the cell type, OSM-IL6ST-OSMR signal may activate distinct pathways including the signaling transducer and activator of transcription (STAT), the

mitogen-activated protein kinase (ERK1/ERK2) [7], the stress activated protein kinase p38 and the C-Jun-N-Terminal kinase (JNK), the phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/via AKT, and the protein kinase C delta (PKC $\delta$ ) [8]. The signaling through STAT involves activation of STAT1, STAT3 and/or STAT5. The phosphorylated STATs translocate as dimers to the nucleus and regulate transcription of target genes [9].

Although STAT3 is mainly implicated in the regulation of cell proliferation, in the mammary gland its activation is required for the cleavage of caspase-3 leading to apoptosis [10-12]. Additionally, STAT3 signaling can be mediated through lysosomes leading to cellular death in mammary gland, regardless of the activation of caspases [13]. OSM can induce activation of some caspases and regulate apoptosis in rat osteosarcoma cells, and in murine adrenocortical tumor cells [14, 15]. OSM expression was detected in human oocytes and granulosa cells from primordial to subsequent developmental stages [16]. However, its regulation and function are still unknown.

As OSM activates STAT3 and granulosa cells of subordinate follicles have higher expression of *IL6ST* [17] and *STAT3* [3, 18], one can hypothesize that OSM activated STAT3 may be involved in follicular atresia. Furthermore, cytokines are known to regulate corpus luteum regression and it has been demonstrated by Rovani et al. [19] that STAT3 is activated during PGF-induced luteolysis. Thus, the objectives of the present study were to investigate the regulation of the potential activators of STAT3, OSM and *IL6ST/OSMR*, during follicle deviation, ovulation and luteolysis; and to evaluate the effect of OSM on bovine granulosa cells *in vitro*.

## 2. Material and methods



All procedures involving animals were approved by the Institutional Committee for Ethics in Animal Experiments from the Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

### *2.1 - Abundance of OSM and OSMR mRNA during follicular deviation*

Data about follicular deviation were obtained using samples from a previous study [3]. Briefly, cyclic, adult, non-lactating cows were synchronized with two intramuscular (i.m.) injections of 250 µg of a PGF analogue (sodium cloprostenol), within a 12 h interval. All cows presented a body condition score of at least 3 (in a scale from 1-5). After estrous detection, ovaries were evaluated through transrectal ultrasonography, to monitor the development of the first follicular wave of the estrous cycle. The day of follicular emergence (D0) was characterized as the day in which the follicle with the greatest diameter reached 5 mm. Follicular cells were collected from the two largest follicles at D2 (n = 4 cows), D3 (n = 4 cows) and D4 (n = 3 cows).

### *2.2 - Abundance of OSM and OSMR mRNA during ovulation*

Samples used in this experiment were obtained from the study of Santos et al. [20]. Multiparous non-lactating cows with body scores of 3 and 4 (in a scale from 1 to 5) received two i.m. injections of a PGF analogue (sodium cloprostenol, 250 µg) within a 12-h interval, an intravaginal device (IVD) containing 1 g progesterone (P4) and a 2 mg i.m. injection of estradiol benzoate (EB) on D0. On D9, the IVD was removed and the ovaries were examined by transrectal ultrasonography. Cows presenting preovulatory follicles with diameter equal or greater than 12 mm received an i.m. injection of 100 µg gonadorelin acetate, a GnRH analogue, 12 h after IVD withdrawal. Granulosa cells were obtained 0 (n = 4), 3 (n = 4), 6 (n = 4), 12 (n = 5) and 24 h (n = 5) after the GnRH injection.

### 2.3 - Abundance of OSM and OSMR mRNA during luteolysis

Samples used for this experiment were obtained from the study of Rovani et al. [19]. Non-lactating adult cows had their estrous synchronized using an IVD containing 1 g P4 and a 2 mg i.m. injection of EB. After seven days, the IVD was removed and the cows received an i.m. injection of a PGF analogue (sodium cloprostenol, 500µg) to induce luteolysis. Estrous was observed for five days and transrectal ultrasonography was used to confirm the occurrence of ovulation and the presence of corpora lutea. Within 10-12 days after ovulation, 4 to 5 cows were randomly selected for collection of luteal tissue at 0, 2, 12, 24 and 48 h after treatment with a PGF analogue (dinoprost tromethamine, 25mg). Fragments of luteal tissue were stored for subsequent RNA extraction.

### 2.4 - Effect of OSM treatment on granulosa cells in vitro

Granulosa cells were cultured based on protocols proposed by Gutierrez et al. [21] and Portela et al. [22] with modifications. Except when indicated otherwise, chemicals were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA).

The washing medium consisted of DMEM/F12-L Glutamin medium (Gibco®). For cell culture, the DMEM/F12-L medium was supplemented with 10mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.1% BSA, androstenedione (10<sup>-7</sup> M at the start of the culture and 10<sup>-6</sup> M at each medium change), 100IU/mL penicillin, 100µg/mL streptomycin, 1.1mM essential amino acids, and 10ng/mL insulin.

Cow ovaries were obtained from a local slaughterhouse and transported to the laboratory at 30°C in a saline solution (0.9% NaCl) supplemented with 100 IU/mL penicillin and 50 µg/mL streptomycin. After washing in saline and 70% ethanol, 4-6 mm follicles were dissected and stored in washing medium. Follicles with evident signs of atresia were discarded. In a laminar flow hood, follicles were sectioned inside a petri dish

and filtered using a cell dissociation kit, to retrieve granulosa cells. The liquid containing granulosa cells was placed in 15 mL tubes and centrifuged twice at 220 x g for 10 min. Cells were counted in a Neubauer chamber, using 0.4% Trypan blue. Thereafter,  $1 \times 10^6$  granulosa cells were seeded in each well of 24-well plates (1 mL of medium per well) and were incubated in 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. The experiment was conducted in quadruplicate.

After 48 h of culture, 700 µl of medium were removed from each well and it was added the same volume of fresh culture medium containing FSH (NIH, USA) and insulin to reach a final concentration of 1 and 10 ng/mL, respectively. After another 48-h period, 700 µl of medium from each well was replaced with 600 µl of the base medium plus 100 µl of the medium containing the treatments were added. The treatments were: control (no treatment); 10 ng/mL OSM (SRP3130, Sigma Aldrich); FSH (1 ng/mL); FSH + 1 ng/mL OSM; FSH + 10 ng/mL OSM; and FSH + 100 ng/mL OSM. Cells were incubated with the treatments for 24 h. Recombinant human OSM doses were chosen based on the studies by Pastuschek et al. [23] and Savarese et al. [24].

## 2.5 - Extraction of RNA, reverse transcription and real-time PCR

Granulosa cells RNA was extracted using guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform protocol (*in vitro* samples) or with a DNA, RNA and protein extraction kit (*in vivo* samples; AllPrep; QIAGEN), following the manufacturer's instructions. The optical density of the extracted RNA was determined by spectrophotometry (NanoDrop, Thermo Scientific) and its purity was evaluated through an absorption rate of OD260/OD280 ratio. Only samples with values greater than 1.6 were used. Total RNA (500 µg) was treated with DNase (Promega) at 37°C for 5 min to digest any contaminant genomic DNA. Reverse transcriptase reactions were conducted using the iScript cDNA Synthesis kit (BioRad), as recommended by the manufacturer. Relative mRNA abundance was

determined by real-time PCR (CFX384 real-time PCR; BioRad) using GoTaq qPCR Master Mix (Promega). The variability of the quantified mRNA was assessed in relation with the amplification of the reference genes *PPIB*, *18S rRNA* and *GAPDH*. The sequence of all primers used in this study is shown in Table 1.

## 2.6 - Statistical analysis

Normality of the response of interest was assessed by the Shapiro-Wilk test. Whenever necessary, log transformations were used to normalize the data. The differences of the dependent variables between the dominant and subordinate follicle were assessed by a paired Student's t-test using the cow as the subject. In the other studies, comparisons across groups were conducted using analyses of variance (ANOVA) and to identify significant differences among groups, the Tukey post-hoc test was used for multiple comparisons. The statistical analyses were performed using the JMP Pro 13.2.0 software (SAS Institute Inc.).

## 3. Results

### 3.1 - Abundance of *OSM* and *OSMR* mRNA during follicular deviation

*OSM* transcripts were not detected in granulosa cells of healthy and atretic follicles around the time of follicle deviation (Days 2 to 4 after wave emergence). The mRNA abundance of *OSMR* was greater in granulosa cells collected from subordinate (atretic) follicles than dominant follicles at the time of (D3) or after (D4) follicular deviation ( $P < 0.001$ ; Figure 1). The mRNA abundance of *IL6ST* was not assessed in this model because previous studies, by our group [18] and others [17], have shown that expression of such gene in granulosa cells is greater in subordinate follicles than in dominant follicles.

### 3.2 - Abundance of *OSM* and *OSMR* mRNA during ovulation

*OSM* transcripts were not detected in granulosa cells from preovulatory follicles. The mRNA levels of *IL6ST* increased ( $P < 0.001$ ) from 3 to 24 h compared to 0 h (Figure 2A). *OSMR* mRNA abundance increased at 6 h and was greater ( $P < 0.001$ ) at 12 and 24 h after the GnRH treatment compared to 0 and 3 h (Figure 2B).

### 3.3 - Abundance of *OSM* and *OSMR* mRNA during luteolysis

During PGF-induced luteolysis, there was a gradual increase in the transcript abundance of *OSM* (Figure 3A), with greater abundance after 24 and 48 h than at 0 h relative to the time of PGF administration ( $P = 0.01$ ). *IL6ST* mRNA was not regulated after PGF-induced luteolysis (Figure 3B). The mRNA levels of *OSMR* were increased ( $P = 0.05$ ) at 2 h after treatment than 0 h relative to PGF administration (Figure 3C), but returned to levels comparable to 0 h from 12 to 48 h. Histological analysis showed remarkable infiltration of polymorphonuclear cells at 24 h compared to 0 h relative to PGF administration (Figures 3D and E).

### 3.4 - Effect of *OSM* treatment on granulosa cells in vitro

The levels of *IL6ST* mRNA were not regulated by the treatments (Figure 4A), whereas treatment of cultured granulosa cells with 100 ng/mL *OSM* in the presence of FSH increased *OSMR* mRNA abundance ( $P < 0.05$ ) compared to the control (no treatment; Figure 4B). The abundance of *STAT3*, *SOCS3* and *PIAS3* mRNA was not affected ( $P > 0.05$ ) by any treatment (Figures 5A, B and C, respectively).

The abundance of *STAR* mRNA was not regulated by the treatments (Figure 6A). FSH treatment increased mRNA levels of both *CYP11A1* (Figure 6B) and *HSD3B1*

(Figure 6C) in cultured granulosa cells, but there was no effect of OSM treatment ( $P > 0.05$ ).

The abundance of *BAX* and *BCL2* mRNA was not affected ( $P > 0.05$ ) by any treatment (Figures 7A and B). However, treatment with 10 ng/mL OSM (in the presence of FSH) was associated with greater *BAX/BCL2* ratio ( $P < 0.05$ ; Figure 7C) compared to the control. Furthermore, treatment with 100 ng/mL OSM in the presence of FSH decreased *XIAP* ( $P < 0.05$ ) mRNA abundance compared to the control (Figure 7D).

#### 4. Discussion

The present study investigated the regulation and function of OSM and OSMR in cattle ovaries. The main findings from this study are: *OSMR* but not *OSM* mRNA is expressed in granulosa cells during follicle deviation and ovulation; both *OSM* and *OSMR* mRNAs are expressed in luteal cells and are upregulated after PGF treatment; supplementation of OSM during granulosa cell culture modulates the mRNA abundance of *OSMR* and *XIAP*, as well as the mRNA ratio of *BAX/BL2* genes.

Changes in the expression of OSM and OSMR have been associated with the occurrence of diseases and with the development of distinct cancers in many cellular types and in several species [24, 25]. Pro-inflammatory properties of OSM have been reported in tissues such as skin, adipose tissue, heart, lungs and kidney (reviewed by Richards [25]), but its role in the ovaries remains unknown. The release of OSM from its primary sources (monocytes, macrophages, T-cells and dendritic cells) occurs through stimulation of various kinds of ligands, as reviewed by Hermanns [8], and OSM signaling involves IL6ST and OSMR [6].

In human ovaries, the presence of OSM and OSMR has been shown in the stroma, in oocytes, in granulosa cells of pre-antral follicles [16] and in ovarian epithelial cells

[24]. Additionally, both *OSM* and *OSMR* were expressed in human ovarian fragments [16]. On the other hand, *OSM* was not detected in ovaries of mice and rats [26]. Discrepancies in the expression of *OSM* and *OSMR* across different studies may reflect differences among the tested models and species. For instance, *OSM* and *OSMR* expression in ovaries of women was investigated in one single antral follicle [16], whereas in ovaries of rodents, expression of *OSMR* was not evaluated [26].

Since in the present study only *OSMR* was expressed in bovine granulosa cells, mostly in atretic follicles or prior to ovulation, our data suggest that *OSM*, as well as other factors secreted by inflammatory cells, may access the follicular antrum after crossing the basement membrane [27]. Even though inflammatory cells are the main source of *OSM* [8, 25], potential synthesis of *OSM* by theca cells and oocytes cannot be ruled out.

The hypothesis that granulosa cells are able to respond to *OSM* treatment was previously confirmed *in vitro* using the COV434 human granulosa cell line. In that model, treatment with either LIF or *OSM* stimulated the expression of STAT3, with the greater expression of the *IL6ST* receptor induced by treatment with 100 ng/mL *OSM* for 15 min or 1 h [23]. In cattle, *IL6ST* has greater expression in granulosa cells of subordinate follicles than in dominant follicles [17, 18]. Besides, Gasperin et al. [3] observed increased activation (phosphorylation) of STAT3 in granulosa cells from subordinate follicles on D3 and D4, which coincides with the greater expression of *OSMR* observed in the present study. Concomitant increase in the expression of *OSMR* and in the activity of STAT3 was also reported in apoptotic cells during mammary gland involution [7].

At the time of ovulation, there was greater mRNA abundance of both *IL6ST* and *OSMR* after GnRH injection, which suggests a role in inflammation-like process that occurs during ovulation. In human ovaries, there is an increased migration of macrophages towards the theca layer of healthy pre-ovulatory follicles prior to ovulation

[28], which may increase the local secretion of OSM and, consequently, induce an increase in *OSMR* mRNA abundance [29].

In samples of luteal tissue obtained through different time-points of induced luteolysis, treatment with PGF induced greater abundance of *OSM* mRNA after 24 and 48 h, even though such expression was already observed prior to the treatment (at 0 h). Although, the expression of *OSM* in corpus luteum has not been previously investigated, it is possible that the regulation observed in the present study is due to the migration and accumulation of polymorphonuclear neutrophils (PMN). Indeed, using a similar model, this was shown to occur 5 min after intramuscular injection of PGF (Shirasuna et al. [30]. The fact that both *IL6ST* and *OSMR* are expressed in the corpus luteum and that the levels of *OSMR* mRNA increased 2 h after treatment with PGF further suggests a potential involvement in functional luteolysis, since a decrease in progesterone synthesis occurs simultaneously [19]. The processes of luteolysis and luteal regression are a result of many combined events including increased synthesis of PGF, reduced synthesis of progesterone, and apoptosis of luteal cells. All such events are influenced by both macrophages [31] and neutrophils [32].

In agreement with the pattern of *OSMR* expression *in vivo*, treatment of granulosa cells with 100 ng/mL OSM *in vitro* resulted in an increase in *OSMR* mRNA levels in cultured granulosa cells. A stimulatory effect of OSM (100 ng/mL) on *OSMR* mRNA levels was previously demonstrated in human umbilical vein, aortic and heart endothelial cells [29]. In the present study, treatment with OSM did not alter the expression of *STAT3* and *PIAS3* (which encodes for the protein inhibitor of activated STAT3) in cultured bovine granulosa cells, as also reported by Pastuszek et al. [23]. However, the same authors observed an increase in *SOCS3* (suppressor of cytokine signaling 3), whereas in the present study no significant regulation was observed.



When granulosa cells were treated with 10 ng/mL OSM, an increase in the *BAX/BCL2* ratio was observed. This may be associated with mitochondrial membrane permeabilization, which can induce apoptosis [33]. In accordance with our data, the addition of 100 ng/mL OSM to ovarian epithelial carcinoma cells *in vitro* induced a four-fold increase in cell death after 48 h of culture [24]. Furthermore, OSM was shown to enhance Fas-mediated cell death in human endometrial epithelial cells through STAT3 activation [34]. In accordance with the hypothesis that OSM induces apoptosis, treatment with 100 ng/mL OSM induced a decrease in the *XIAP* mRNA abundance in FSH-treated granulosa cells. As *XIAP* is known to inhibit granulosa cell apoptosis [35], OSM appears to induce granulosa cell apoptosis through inhibition of *XIAP* expression.

In conclusion, the results of the present study suggest that *OSMR* plays a role in the regression of subordinate follicles and on the inflammation-like process that culminates in the ovulation, even though *OSM* is not expressed in granulosa cells. During luteolysis, both *OSM* and *OSMR* are positively regulated indicating a role on cellular death, which was also suggested after treatment with OSM *in vitro*.

## 5. Acknowledgements

The authors thank CNPq and FAPERGS for providing financial support for this research project and CAPES for the scholarship to K.R. Martins.

## 6. References

- [1] Fortune JE. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod.* 1994;50:225-32.
- [2] Kondratskyi A, Kondratska K, Skryma R, Prevarskaya N. Ion channels in the regulation of apoptosis. *Biochimica et biophysica acta.* 2015;1848:2532-46.

- 302 [3] Gasperin BG, Rovani MT, Ferreira R, Ilha GF, Bordignon V, Goncalves PB, et al.  
303 Functional status of STAT3 and MAPK3/1 signaling pathways in granulosa cells during  
304 bovine follicular deviation. *Theriogenology*. 2015;83:353-9.
- 305 [4] Sugino N, Okuda K. Species-related differences in the mechanism of apoptosis  
306 during structural luteolysis. *The Journal of reproduction and development*. 2007;53:977-  
307 86.
- 308 [5] Murdoch WJ. Programmed cell death in preovulatory ovine follicles. *Biol Reprod*.  
309 1995;53:8-12.
- 310 [6] Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F.  
311 Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The*  
312 *Biochemical journal*. 2003;374:1-20.
- 313 [7] Tiffen PG, Omidvar N, Marquez-Almuina N, Croston D, Watson CJ, Clarkson RW.  
314 A dual role for oncostatin M signaling in the differentiation and death of mammary  
315 epithelial cells in vivo. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2008;22:2677-88.
- 316 [8] Hermanns HM. Oncostatin M and interleukin-31: Cytokines, receptors, signal  
317 transduction and physiology. *Cytokine & growth factor reviews*. 2015;26:545-58.
- 318 [9] Levy DE, Lee C-k. What does Stat3 do? *Journal of clinical investigation*.  
319 2002;109:1143-8.
- 320 [10] Chapman RS, Lourenco P, Tonner E, Flint D, Selbert S, Takeda K, et al. The role  
321 of Stat3 in apoptosis and mammary gland involution. *Conditional deletion of Stat3*.  
322 *Advances in experimental medicine and biology*. 2000;480:129-38.
- 323 [11] Chapman RS, Lourenco PC, Tonner E, Flint DJ, Selbert S, Takeda K, et al.  
324 Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with  
325 a conditional knockout of Stat3. *Genes & development*. 1999;13:2604-16.

- 326 [12] Humphreys RC, Bieri B, Zhao L, Raz R, Levy D, Hennighausen L. Deletion of  
 327 Stat3 blocks mammary gland involution and extends functional competence of the  
 328 secretory epithelium in the absence of lactogenic stimuli. *Endocrinology*.  
 329 2002;143:3641-50.
- 330 [13] Kreuzaler PA, Staniszewska AD, Li W, Omidvar N, Kedjouar B, Turkson J, et al.  
 331 Stat3 controls lysosomal-mediated cell death in vivo. *Nature cell biology*. 2011;13:303-  
 332 9.
- 333 [14] Auernhammer CJ, Dorn F, Vlotides G, Hengge S, Kopp FB, Spoettl G, et al. The  
 334 oncostatin M receptor/gp130 ligand murine oncostatin M induces apoptosis in  
 335 adrenocortical Y-1 tumor cells. *The Journal of endocrinology*. 2004;180:479-86.
- 336 [15] Chipoy C, Brounais B, Trichet V, Battaglia S, Berreur M, Oliver L, et al.  
 337 Sensitization of osteosarcoma cells to apoptosis by oncostatin M depends on STAT5  
 338 and p53. *Oncogene*. 2007;26:6653-64.
- 339 [16] Abir R, Ao A, Jin S, Barnett M, Van den Hurk R, Freimann S, et al.  
 340 Immunocytochemical detection and reverse transcription polymerase chain reaction  
 341 expression of oncostatin M (OSM) and its receptor (OSM-Rbeta) in human fetal and  
 342 adult ovaries. *Fertility and sterility*. 2005;83 Suppl 1:1188-96.
- 343 [17] Forde N, Mihm M, Canty MJ, Zielak AE, Baker PJ, Park S, et al. Differential  
 344 expression of signal transduction factors in ovarian follicle development: a functional  
 345 role for betaglycan and FIBP in granulosa cells in cattle. *Physiological Genomics*.  
 346 2008;33:193-204.
- 347 [18] Ilha GF, Rovani MT, Gasperin BG, Antoniazzi AQ, Goncalves PB, Bordignon V,  
 348 et al. Lack of FSH support enhances LIF-STAT3 signaling in granulosa cells of atretic  
 349 follicles in cattle. *Reproduction (Cambridge, England)*. 2015;150:395-403.

- 350 [19] Rovani MT, Ilha GF, Gasperin BG, Nobrega JE, Jr., Siddappa D, Glanzner WG, et  
 351 al. Prostaglandin F<sub>2</sub>α-induced luteolysis involves activation of Signal transducer  
 352 and activator of transcription 3 and inhibition of AKT signaling in cattle. *Molecular*  
 353 *reproduction and development*. 2017;84:486-94.
- 354 [20] Santos JT, Ferreira R, Gasperin BG, Siqueira LC, de Oliveira JF, Santos RA, et al.  
 355 Molecular characterization and regulation of the angiotensin-converting enzyme type  
 356 2/angiotensin-(1-7)/MAS receptor axis during the ovulation process in cattle. *Journal of*  
 357 *the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS*. 2012;13:91-8.
- 358 [21] Gutierrez CG, Campbell BK, Webb R. Development of a long-term bovine  
 359 granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production,  
 360 response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biology of*  
 361 *reproduction*. 1997;56:608-16.
- 362 [22] Portela VM, Zamberlam G, Gonçalves PBD, de Oliveira JFC, Price CA. Role of  
 363 angiotensin II in the periovulatory epidermal growth factor-like cascade in bovine  
 364 granulosa cells in vitro. *Biology of reproduction*. 2011;85:1167-74.
- 365 [23] Pastuszek J, Poetzsch J, Morales-Prieto DM, Schleussner E, Markert UR,  
 366 Georgiev G. Stimulation of the JAK/STAT pathway by LIF and OSM in the human  
 367 granulosa cell line COV434. *Journal of reproductive immunology*. 2015;108:48-55.
- 368 [24] Savarese TM, Campbell CL, McQuain C, Mitchell K, Guardiani R, Quesenberry  
 369 PJ, et al. Coexpression of oncostatin M and its receptors and evidence for STAT3  
 370 activation in human ovarian carcinomas. *Cytokine*. 2002;17:324-34.
- 371 [25] Richards CD. The enigmatic cytokine oncostatin m and roles in disease. *ISRN*  
 372 *inflammation*. 2013;2013:512103.

- 373 [26] Znoyko I, Sohara N, Spicer SS, Trojanowska M, Reuben A. Comparative studies  
374 of oncostatin M expression in the tissues of adult rodents. *The anatomical record Part A,*  
375 *Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology.* 2005;283:182-6.
- 376 [27] Fair T. The contribution of the maternal immune system to the establishment of  
377 pregnancy in cattle. *Frontiers in Immunology.* 2015;6.
- 378 [28] Brannstrom M, Pascoe V, Norman RJ, McClure N. Localization of leukocyte  
379 subsets in the follicle wall and in the corpus luteum throughout the human menstrual  
380 cycle. *Fertility and sterility.* 1994;61:488-95.
- 381 [29] Rychli K, Kaun C, Hohensinner PJ, Rega G, Pfaffenberger S, Vyskocil E, et al.  
382 The inflammatory mediator oncostatin M induces angiopoietin 2 expression in  
383 endothelial cells in vitro and in vivo. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH.*  
384 2010;8:596-604.
- 385 [30] Shirasuna K, Jientaweeboon S, Raddatz S, Nitta A, Schuberth H-J, Bollwein H, et  
386 al. Rapid accumulation of polymorphonuclear neutrophils in the corpus luteum during  
387 prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ -induced luteolysis in the cow. *PLOS ONE.* 2012;7:e29054.
- 388 [31] Wu R, Van der Hoek KH, Ryan NK, Norman RJ, Robker RL. Macrophage  
389 contributions to ovarian function. *Human reproduction update.* 2004;10:119-33.
- 390 [32] Grenier A, Dehoux M, Boutten A, Arce-Vicioso M, Durand G, Gougerot-Pocidalo  
391 MA, et al. Oncostatin M production and regulation by human polymorphonuclear  
392 neutrophils. *Blood.* 1999;93:1413-21.
- 393 [33] Yadav VK, Lakshmi G, Medhamurthy R. Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ -mediated activation of  
394 apoptotic signaling cascades in the corpus luteum during apoptosis: involvement of  
395 caspase-activated DNase. *Journal of biological chemistry.* 2005;280:10357-67.

- 396 [34] Tanaka T, Bai T, Utsunomiya H, Fukumoto T, Yukawa K. STAT3 enhances  
397 intracellular Fas-mediated apoptotic signals in HHUA human endometrial epithelial  
398 cells. *Molecular medicine reports*. 2011;4:307-12.
- 399 [35] Xiao CW, Ash K, Tsang BK. Nuclear factor-kappaB-mediated X-linked inhibitor  
400 of apoptosis protein expression prevents rat granulosa cells from tumor necrosis factor  
401 alpha-induced apoptosis. *Endocrinology*. 2001;142:557-63.
- 402

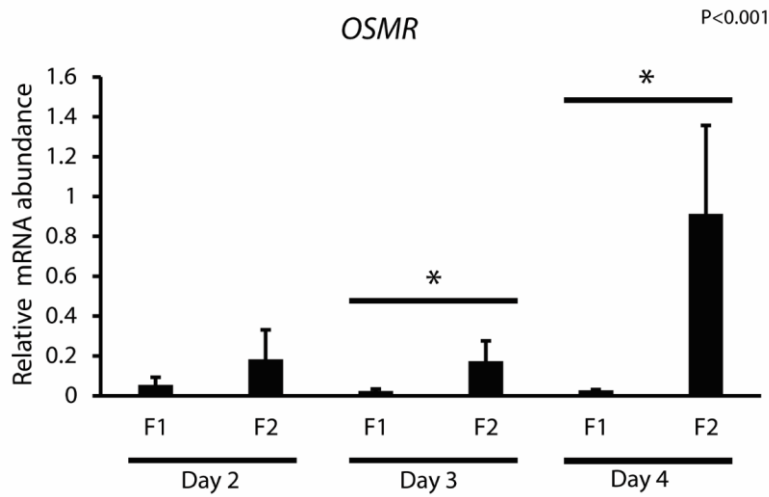
1 Table 1: Primers sequences used for real time PCR.

Gene	Forward	Reverse
<i>GAPDH</i>	GATTGTCAGCAATGCCTCCT	GGTCATAAGTCCCTCCACGA
<i>18S rRNA</i>	CCTTCCGCGAGGATCCATTG	CGCTCCCAAGATCCAACACTAC
<i>PPIB</i>	GGTCATCGGTCTCTTTGGAA	TCCTTGATCACACGATGGAA
<i>BAX</i>	TTCTGACGGCAACTTCAACT	CGAAGGAAGTCCAATGTCCA
<i>BCL2</i>	CATCGTGGCCTTCTTTGAGT	CATGCTAGGGCCATACAGC
<i>OSM</i>	GCACAGCGTATGCAGAGAAC	GCAGTACGGGACTGTGTAGG
<i>OSMR</i>	GCTCTCTTTGCAGTCTTGCAG	TGGAAACGTTTCAGTGATTCAGGA
<i>STAT3</i>	CTGCAGCAGAAGGTTAGCTACAAA	TTCTAAACAGCTCCACGATTCTCTC
<i>IL6ST</i>	AGAGTGGGACCACCTTCCTA	TCTGTGTAGGCTGCCATTCTG
<i>HSD3B1</i>	TCTCTGCAGTACTGGCTTGC	GTCAGTGGTGGCGGTTGAA
<i>CYP11A1</i>	CTTGCACCTTTCTGGCTAGG	AAGGGGAAGAGGTAGGGTGA
<i>PIAS3</i>	GAAGCGCACTTCACCTTTGC	CCTGTATGGTATAATCGCATTTGG
<i>SOCS3</i>	GCCTATTACATCTACTCGGGG	AAGCGGGGCATCGTACTGGT
<i>STAR</i>	CCCAGCAGAAGGGTGTGATC	TGCGAGAGGACCTGGTTGAT
<i>XIAP</i>	GAAGCACGGATCATTACATTTGG	CCTTCACCTAAAGCATAAAATCCAG

2

3

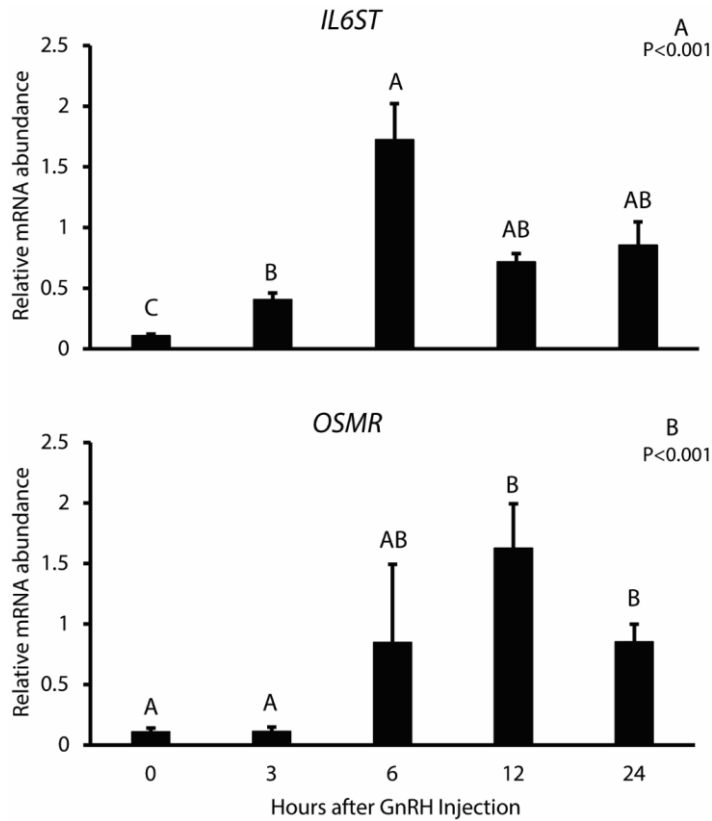
# Figure legends



**Figure 1:** Relative mRNA abundance of the OSMR in granulosa cells from dominant (F1) and subordinate (F2) follicles around deviation in cattle. The day of follicular emergence (D0) was established as the day in which the follicle with the greatest diameter reached 5 mm. Granulosa cells were collected from the two largest follicles at D2 (n = 4 cows), D3 (n = 4 cows) and D4 (n = 3 cows).

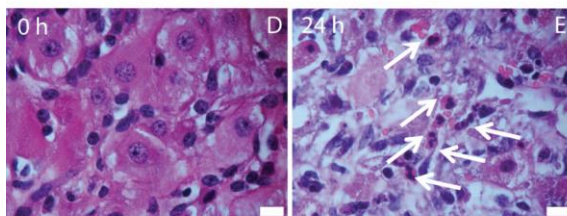
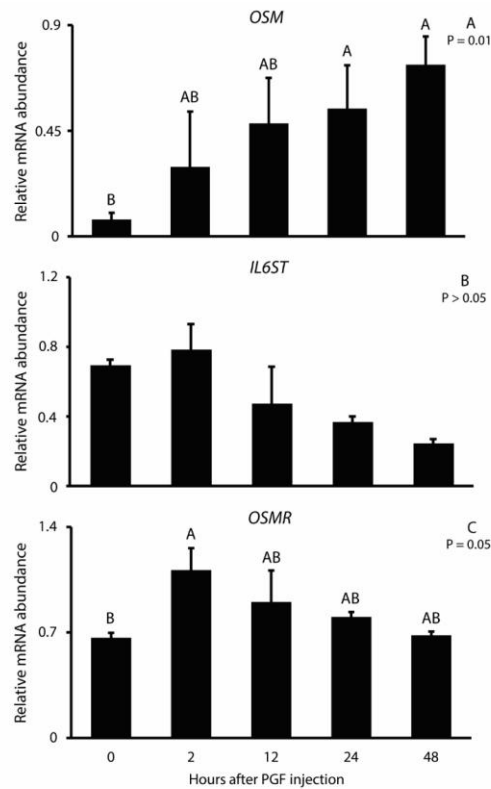
\*Difference between largest and second largest follicle (P < 0.05)





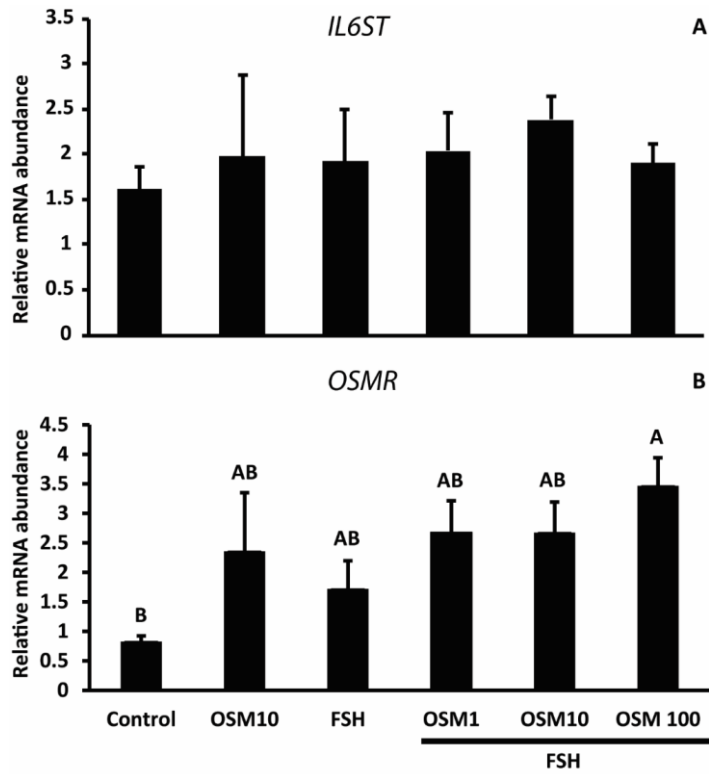
9

10 **Figure 2:** Relative mRNA abundance of *IL6ST* (A) and *OSMR* (B) in granulosa cells  
 11 during GnRH-induced ovulation. Cows were submitted to a hormonal estrus  
 12 synchronization protocol and those presenting a preovulatory follicle with diameter equal  
 13 or greater than 12 mm received an i.m. injection of 100 µg gonadorelin acetate, a GnRH  
 14 analogue, 12 h after IVD withdrawal. Granulosa cells were obtained 0 (n = 4), 3 (n = 4),  
 15 6 (n = 4), 12 (n = 5) and 24 h (n = 5) after the GnRH injection.

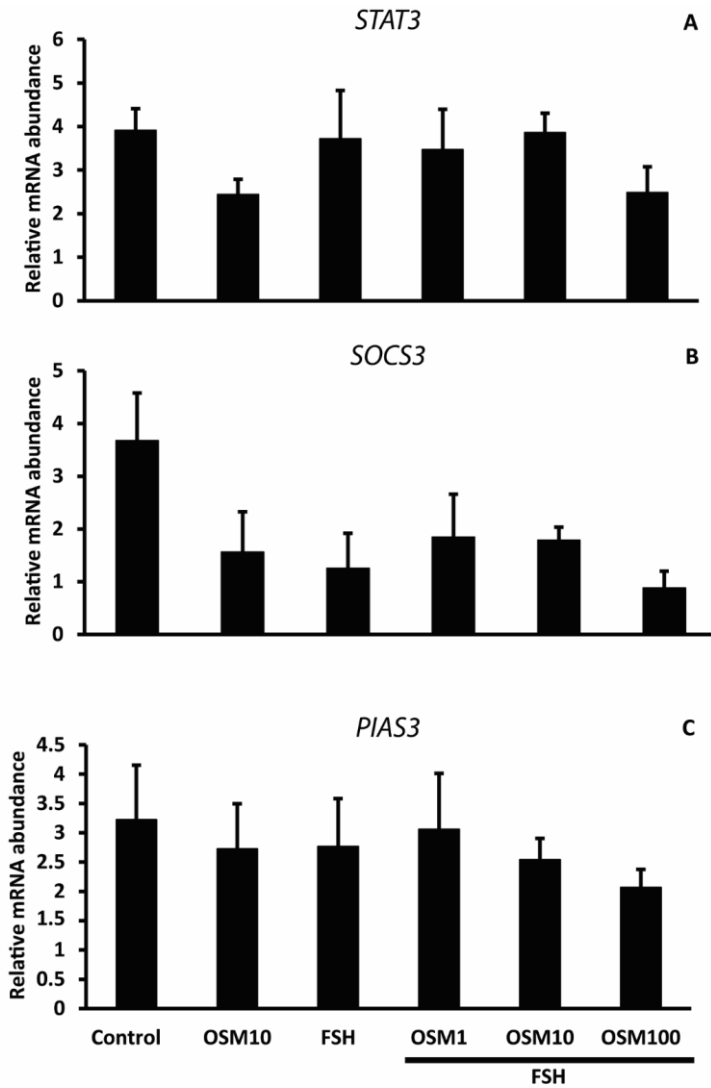


16

17 **Figure 3:** Relative mRNA abundance of *OSM* (A), *IL6ST* (B) and *OSMR* (C) in luteal  
 18 tissues after PGF-induced luteolysis in cattle. Within 10-12 days after ovulation, 4 to 5  
 19 cows were randomly selected for collection of luteal tissue at 0, 2, 12, 24 and 48 h after  
 20 treatment with a PGF analogue. Histological sections (hematoxylin and eosin staining) in  
 21 panels D and E represent the luteal tissue before (0 h) and 24 h after PGF treatment.  
 22 Arrows indicate polymorphonuclear cells (panel E), and bars correspond to 10  $\mu$ m (panels  
 23 D and E).

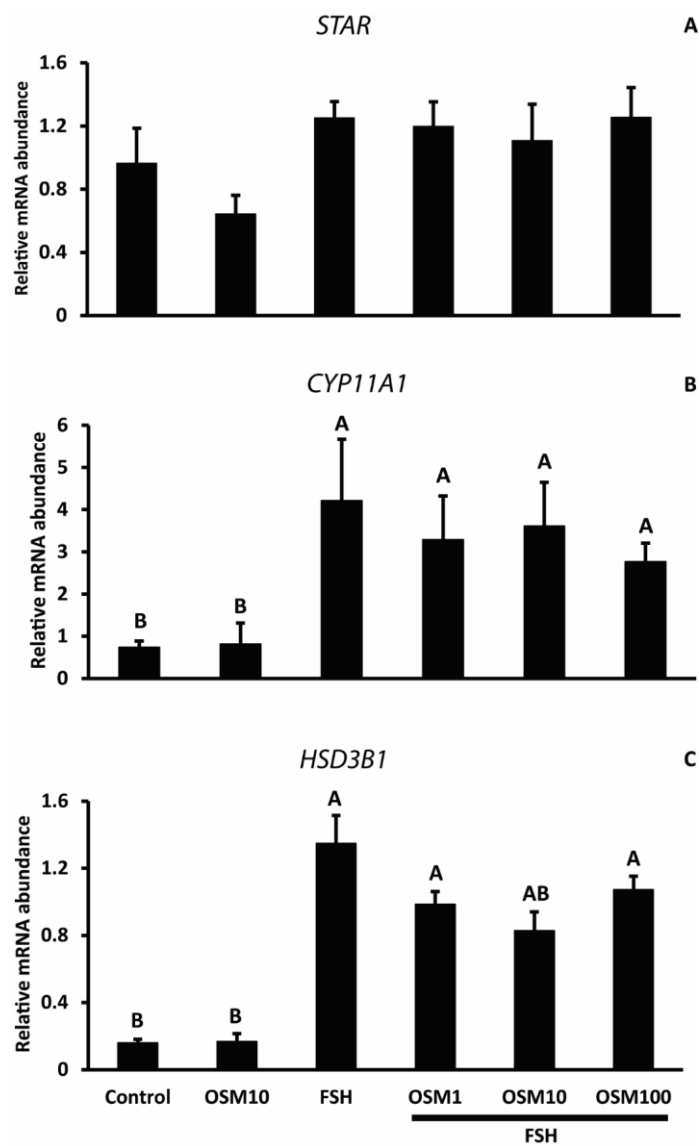


**Figure 4:** Relative mRNA abundance of *IL6ST* (A) and *OSMR* (B) in bovine granulosa cells cultured without treatment (control), treated with 10 ng/mL OSM or treated with 1 ng/mL FSH and different concentrations (0, 1, 10 or 100 ng/mL) of OSM for 24 h (D5). <sup>A,B</sup>P < 0.05.



29

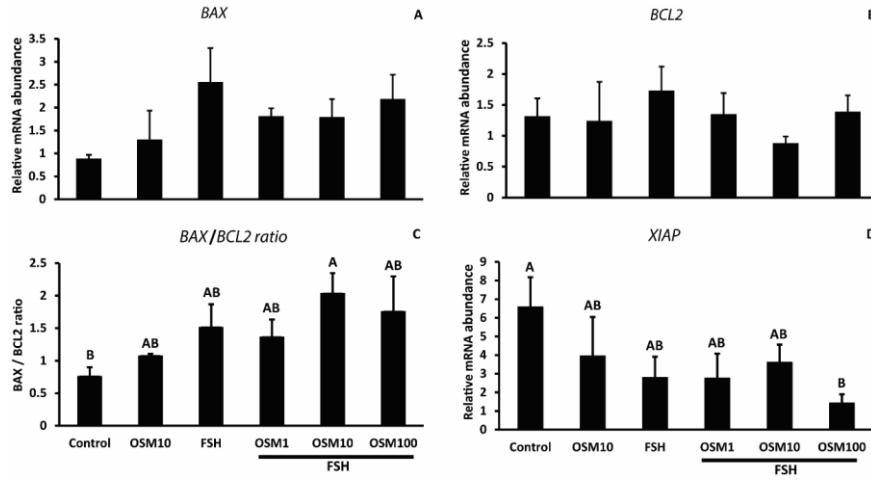
30 **Figure 5:** Relative mRNA abundance of *STAT3* (A), *SOCS3* (B) and *PIAS3* (C) in bovine  
 31 granulosa cells cultured without treatment (control), treated with 10 ng/mL OSM or  
 32 treated with 1 ng/mL FSH and different concentrations (0, 1, 10 or 100 ng/mL) of OSM  
 33 for 24 h (D5).



**Figure 6:** Relative mRNA abundance of *STAR* (A), *CYP11A1* (B) and *HSD3B1* (C) in bovine granulosa cells cultured without treatment (control), treated with 10 ng/mL OSM or treated with 1 ng/mL FSH and different concentrations (0, 1, 10 or 100 ng/mL) of OSM for 24 h (D5).

<sup>A,B</sup>  $P < 0.05$ .

**Comentado [TLJ1]:** Alterei tamanho da figura para caber na página junto com a legenda



**Figure 7:** Relative mRNA abundance of *BAX* (A), *BCL2* (B), *BAX/BCL2* (C) ratio and *XIAP* (D) in bovine granulosa cells cultured without treatment (control), treated with 10 ng/mL OSM or treated with 1 ng/mL FSH and different concentrations (0, 1, 10 or 100 ng/mL) of OSM for 24 h (D5).

<sup>A,B</sup>  $P < 0.05$ .

1

## 2

3

4

5

## Regulação e função da leptina durante o desenvolvimento folicular em bovinos

Kauê R. Martins<sup>ab</sup>, Cristina S. Haas<sup>b</sup>, Juliana G. Ferst<sup>c</sup>, Monique T. Rovani<sup>b</sup>, Fabiana Moreira<sup>d</sup>, André L. F. Goetten<sup>e</sup>, Raj Duggavathi<sup>c</sup>, Vilceu Bordignon<sup>c</sup>, Valério V. M. Portela Jr<sup>e</sup>, Paulo B. D. Gonçalves<sup>f</sup>, Thomaz Lucia Jr.<sup>b</sup>, Bernardo G. Gasperin<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Centro de Desenvolvimento Tecnológico.

<sup>b</sup>ReproPel, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil.

<sup>c</sup>Department of Animal Science, McGill University, Montreal, Canadá.

<sup>d</sup>Instituto Federal Catarinense, Araquari, SC, Brasil.

<sup>e</sup>Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos, SC, Brasil.

<sup>f</sup>Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

### Abstract

Leptin is an adipokine primarily produced by adipocytes, being one of the main regulators in central signaling of the nutritional status in animals and humans. Previous studies demonstrated regulation of leptin and its receptor (ObRb) in ovarian cells, associations between leptin levels, different reproductive parameters and leptin treatment *in vitro*. However, the actual local function of leptin in the follicle is still unknown. The objectives of the present study were: to identify the presence of leptin and ObRb in cells of dominant and atretic follicles; to investigate the action of leptin *in vivo* on follicular growth and *in vitro* on the expression of genes related to steroidogenesis in bovine granulosa cells. Intense labeling of leptin and its receptor were observed in the immunohistochemistry of subordinate follicles. Differences in relative mRNA expression were detected for the *LEPOT*, *ADIPOR1* and *ADIPOR2* genes. Intrafollicular injection of leptin (100 or 1000 ng/ml) did not affect follicular growth or ovulation *in vivo* ( $P > 0.05$ ). No changes were observed in the relative expression of the genes analyzed *in vitro* ( $P > 0.05$ ). These findings demonstrate the presence of leptin in subordinate follicles, but it was not possible to relate it to the cellular apoptosis mediated by the STAT3 route.

**Palavras-chave:** leptina, apoptose, granulosa bovina.

### 1 INTRODUÇÃO



A leptina é uma adipocina primariamente produzida por adipócitos, sendo um dos principais reguladores da sinalização central do estado nutricional de animais e humanos, regulando diversas funções associadas ao metabolismo energético e à função reprodutiva (MARGETIC et al., 2002; ZIEBA et al., 2005). Além do tecido adiposo, a leptina se encontra no hipotálamo, na hipófise e em órgãos reprodutivos (BLUHER & MANTZOROS, 2007), sendo que a quantidade expressa por adipócitos é correlacionada com o conteúdo lipídico destas células (revisado por (BUDAK et al., 2006). Assim, a secreção de leptina é proporcional ao acúmulo de gordura do organismo, agindo conjuntamente com a insulina no sistema nervoso central para inibir o consumo de alimentos, em nível hipotalâmico (GALE et al., 2004). De forma similar à insulina, a leptina circulante passa pela barreira hematoencefálica e carrega a mensagem sobre o tecido adiposo e as reservas de gordura, sendo que elevadas concentrações de leptina no plasma podem ser relacionadas à obesidade, enquanto baixas concentrações seriam associadas à fome ou anorexia (GALE et al., 2004).

Sabe-se que o sistema nervoso central recebe estímulos hormonais que influenciam a homeostase e a reprodução (revisado por (NESTOR et al., 2014)), sendo a leptina capaz de ativar o eixo hipotalâmico–pituitário–gonadal, regulando a expressão de seu receptor LEPR (DI YORIO et al., 2008). Esta capacidade pode resultar na produção de esteroides sexuais e uma subsequente ativação do eixo GH-IGF (CHEHAB et al., 1997; MANTZOROS et al., 1997), regular as concentrações de AMH, GnRH, FSH, LH e cortisol (BARASH et al., 1996; CHEHAB et al., 1997) e agir no desenvolvimento do corpo lúteo (WILES et al., 2014).

O estado nutricional e os níveis de leptina no organismo são importantes reguladores do momento do início da puberdade em fêmeas (revisado por (ZIEBA et al., 2005). Além disso, os níveis séricos de leptina flutuam durante o ciclo menstrual de mulheres, com a concentração mais alta coincidindo com a ovulação (NESTOR et al., 2014). A expressão da leptina nos folículos bovinos indica que também existe produção local. No entanto, a regulação deste hormônio e seus efeitos diretos sobre as células foliculares são desconhecidos. Uma correlação negativa entre a leptina e os níveis intrafoliculares de estradiol foi descrita, enquanto que uma associação positiva foi observada com os níveis

de progesterona (SARKAR et al., 2010). Estudos também sugerem um envolvimento da leptina na maturação do oócito (BOELHAUVE et al., 2005).

Existem seis variantes conhecidas do receptor da leptina (LEPRa, b, c, d e f), com o mesmo domínio extracelular, mas com domínios intracelulares diferentes (COTTRELL et al., 2012). LEPRb é um receptor transmembrana encontrado em diversos tecidos, incluindo: hipotálamo, pulmões, rins, células da teca, granulosa e oócitos (TARTAGLIA et al., 1995). A isoforma LEPRb é a única variante capaz de transmitir sinal via STAT3 (BJORBAEK et al., 1997), rota de sinalização que é mais ativa (fosforilada) nas células da granulosa de folículos em regressão (GASPERIN et al., 2015).

Nas células da granulosa bovina cultivadas *in vitro*, a leptina antagoniza diretamente o efeito estimulatório da insulina na esteroidogênese. Na ausência de insulina, a leptina tem pouco ou nenhum efeito na esteroidogênese (SPICER et al., 2000). Ainda, nas células da teca, foram observados efeitos negativos da leptina sobre a esteroidogênese (SPICER & FRANCISCO, 1998). Coletivamente, os dados sugerem que níveis elevados de leptina são prejudiciais ao desenvolvimento folicular.

Estudos anteriores já demonstraram a regulação da leptina e de seu receptor nas células ovarianas (KARLSSON et al., 1997; RUIZ-CORTEZ et al., 2002; RUAN et al., 2002), associações entre os níveis de leptina e diferentes parâmetros reprodutivos e o efeito do tratamento com leptina *in vitro*. Entretanto, a função local da leptina no folículo ainda é desconhecida. Portanto, os objetivos do presente estudo foram identificar a presença da proteína da leptina nas células de folículos dominantes e atrésicos; investigar a ação da leptina *in vivo* sobre o crescimento folicular e, *in vitro*, sobre a expressão de genes relacionados a esteroidogênese em células da granulosa bovina.

## **2.1 Material e métodos**

### **2.1.2 Detecção de RNAm nas células ovarianas**

Os procedimentos realizados neste experimento foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel (processo nº 23110.007043/2015-69).

Para identificação e/ou quantificação da abundância de RNAm dos genes *LEP*, *LEPRb*, *PIAS3*, *SOCS3*, *LEPROT*, *ADIPOR1* e *ADIPOR2* em células ovarianas, foram utilizadas amostras obtidas em abatedouro ou obtidas *in vivo*, durante a divergência folicular, provenientes de estudos anteriores, conforme descrito por GASPERIN et al. (2015). No referido modelo, o dia da emergência folicular (dia 0) foi definido retrospectivamente, como o último dia em que o folículo dominante possuía diâmetro inferior a 5 mm (EVANS & FORTUNE (1997). As amostras analisadas são provenientes dos dois maiores folículos bovinos coletados antes (dia 2), durante a divergência (dia 3) e após a seleção do folículo dominante (dia 4). Os níveis de estrógeno e progesterona no fluido folicular foram dosados para embasar a classificação dos folículos. Além disso, a expressão de diversos marcadores de viabilidade (*CYP19A1*, *LHCGR*, *CCND2*) ou de morte celular (*CASP3* clivada) foram avaliados nos folículos dominantes e subordinados, respectivamente, para validar o modelo (GASPERIN et al., 2015).

Para a quantificação da expressão gênica, foi realizada extração de RNA utilizando kit específico (Qiagen) ou através de protocolo de isotiocianato de guanidina e fenol-clorofórmio. Para quantificar o RNA extraído, a densidade ótica foi determinada através de espectrofotômetro (NanoDrop) e a pureza foi avaliada através da taxa de absorção da relação OD260/OD280, sendo utilizadas amostras com relação superior a 1,6. 500 ng de RNA total foi tratado com DNase (Promega, Madison, WI) a 37°C por 15 min, para digerir DNA genômico contaminante. A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando o *kit iScript* (BioRad), seguindo as instruções do fabricante. A expressão relativa dos genes foi realizada por PCR em tempo real (CFX384, BioRad) com *SsoFast EvaGreen supermix* (CFX384, BioRad), sendo a variabilidade na quantidade de RNAm acessada em relação à amplificação dos genes constitutivos *PPIB*, *H2A*, *HISTONE*, *GAPDH*, *RPL19* ou *18S rRNA*. A sequência dos iniciadores dos genes constitutivos e dos genes de interesse foram extraídos da literatura ou foram previamente utilizados por nosso grupo (validados por eficiência de amplificação, análise da curva de *melting* e da sequência de amplificação) estão descritos na Tabela 1.

Baseado na descrição de GASPERIN et al (2015) a análise de qPCR padrão em dois passos foi realizada com desnaturação inicial a 95°C por 5 min,

seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s e anelamento/extensão a 58°C por 30 s.

Para otimizar o qPCR, diluições seriadas do modelo de cDNA foram usadas para gerar uma curva padrão, através de um log traçado da quantidade inicial do fator de diluição versus o valor do ciclo limiar, obtidos durante a amplificação de cada diluição. As reações com coeficientes de determinação ( $R^2$ ) superiores a 0.98 e de eficiência entre 95% e 105% foram consideradas otimizadas. O método da curva padrão relativa foi usado para avaliar a quantidade de um transcrito particular nas amostras (CIKOS et al., 2007).

Para cada gene os cDNA's padrões foram amplificados juntamente com cDNA's de amostra na mesma corrida de PCR. A quantidade de mRNA alvo em cada amostra foi determinada a partir de uma curva padrão e expressa em unidades arbitrárias correspondendo aos fatores de diluição do preparo de RNA padrão. As amostras foram corridas em duplicata e representadas em transcrição relativa aos genes padrões.

### **2.1.3 Imunodetecção de leptina e do receptor LEPR nas células foliculares após a divergência folicular**

Para realização da técnica de imunohistoquímica (IHQ), foram utilizados cortes de 3 µm de folículos dominantes (saudáveis) e subordinados (atrésicos) obtidos no dia 4 da onda folicular, conforme descrito no item 2.1. Os cortes foram obtidos em micrótomo automático e distendidos em lâminas impregnadas com organossilano a 3% (Sigma®, St. Louis, MO, USA). Foram utilizados os seguintes anticorpos primários policlonais (A-20, Santa Cruz Biotechnology, C.A. USA): anticorpo anti-leptina (A-20, sc-842 - rabbit) na diluição de 1:1000 e o anticorpo anti-receptor da leptina LEPRb (pAb M-18 - goat), em diluição de 1:100. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizada com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% em metanol e a recuperação antigênica em solução de citrato pH 6,0, em calor úmido sob pressão. O bloqueio da marcação inespecífica foi realizado com albumina sérica bovina (BSA) 3% nas secções instiladas com anti-leptina e com BSA 10% nas secções que receberam o anti-LEPRb (para análise do receptor da leptina). Após a adição dos anticorpos secundários, as lâminas foram incubadas overnight em câmara úmida a 4°C. As lâminas para análise da leptina foram instiladas com o

sistema streptavidina-biotina-peroxidase (kit LSAB - Dako K0690 Corporation, CA, USA) e as lâminas para análise do receptor de leptina com *kit Histofine®* (Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan) e submetidas à incubação em temperatura ambiente em câmara úmida. A reação foi revelada por meio da adição de solução de diaminobenzidina-peroxidase (DAB-peroxidase, Corporation CA, USA), acrescentada em tempo padrão para cada um dos cortes. Os cortes foram contrainformados com Hematoxilina de Mayer (Merck®, Darmstadt, Germany); após as lâminas foram fixadas com resina sintética (Sigma Chemical Company®, St. Louis, MO, USA). As lâminas foram analisadas em microscópio de campo claro (Olympus DP72) e a imunomarcagem de leptina, nos tecidos classificadas conforme a seguinte escala: ausente (-), discreta (+), moderada (++) ou intensa (+++). Imagens representativas dos resultados (Figuras 2 e 3) foram digitalizadas por meio de câmera digital (Olympus BX 51, Tokyo, Japan) acoplada ao microscópio óptico, em aumento de 40 X. Para comprovar a especificidade da imunomarcagem, foi realizada a incubação do anticorpo anti-leptina (sc-842) com o peptídeo fornecido pelo fabricante (sc-842p).

#### 2.1.4 Injeção intrafolicular de leptina

Os procedimentos realizados neste experimento foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel (processo nº 23110.007043/2015-69). Foram utilizadas 16 fêmeas bovinas cíclicas, não gestantes e não lactantes, com idade entre 3 e 6 anos e condição corporal igual ou superior a 3 (em uma escala de 1-5), mantidas em pastagem nativa e com acesso *ad libitum* a água. As vacas foram submetidas a um protocolo de sincronização de estro e ovulação, que consistiu na aplicação i.m. de 2 mg de benzoato de estradiol, simultaneamente à colocação de um dispositivo intravaginal (DIV) de liberação lenta contendo 1 g de progesterona (P4). No dia 6 os animais receberam uma administração de 500 µg de prostaglandina F2α (2 ml; i.m.). O DIV contendo P4 foi removido no dia 7 e o crescimento folicular foi acompanhado até que os folículos atingissem diâmetro entre 9 e 12 mm. Neste momento, após limpeza perineal e anestesia epidural (3 ml de lidocaína a 2%), foi realizado o tratamento IIF para obtenção de concentração intrafolicular final de 100 ou 1000 ng/ml de leptina recombinante humana (10221HNAE, Life

Technologies) diluída em solução salina contendo 0,1% de albumina sérica bovina (BSA). Nas fêmeas do grupo controle foi realizada injeção intrafolicular (IIF) com solução salina e 0,1% BSA.

O volume total administrado na IIF foi adequado com base no volume de fluido folicular total, o qual foi estimado por uma equação de regressão, previamente descrita (FERREIRA et al. 2007). Detalhes sobre o procedimento de IIF podem ser obtidos em estudos anteriores do nosso grupo (FERREIRA et al. 2007; GASPERIN et al., 2015). A IIF foi confirmada através da visualização de um turbilhão no interior do folículo e os folículos injetados foram acompanhados até o momento da ovulação.

#### **2.1.5 Cultivo de células da granulosa bovina**

O cultivo primário de células da granulosa foi executado com um protocolo adaptado a partir dos modelos proposto por GUTIERREZ et al. (1997) e PORTELA et al. (2011). Exceto onde especificado, todos os produtos utilizados foram obtidos de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). O meio para cultivo celular foi preparado com base no meio DMEM/F12-L Glutamina (Gibco®) suplementado com bicarbonato (10 mM), BSA (0,1%), androstenediona ( $10^{-7}$  M), penicilina (100 UI/ml), estreptomicina (100 µg/ml), aminoácidos essenciais (1,1 mM), insulina (10 ng/ml) e FSH (1 ng/ml).

A coleta das células da granulosa foi realizada a partir de ovários provenientes de abatedouro, os quais foram transportados até o laboratório em recipientes térmicos com solução salina (NaCl 0,9%) contendo penicilina (100 UI/ml) e estreptomicina (50 µg/ml) a 30°C. Após lavagem com solução salina e álcool 70%, folículos de 4-6 mm foram dissecados e armazenados em meio de lavagem (DMEM/F12-L), sendo que folículos com sinais evidentes de atresia foram descartados. Em fluxo laminar previamente esterilizado, os folículos foram seccionados utilizando tesoura e pinça estéril em placa de Petri. O conteúdo obtido foi tratado com solução de dissociação celular para a obtenção das células da granulosa. O líquido contendo as células foi então transferido para tubos cônicos de 15 ml, que foram agitados gentilmente para desprender as células da parede e, posteriormente, centrifugados duas vezes a 220 xg por 10 min. A

contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer utilizando Trypan Blue a 0,4%.

As células foram semeadas ( $1 \times 10^6$  células por poço) em placas de 24 poços, contendo 1ml de meio por poço, e incubadas a 37°C a 5% de CO<sub>2</sub>. Decorridas 48 h de cultivo, foi retirado 700 µl de meio de cada poço e adicionado meio de cultivo contendo FSH (1 ng/mL) (NIH, EUA) e insulina (1 ng/mL). Decorridas mais 48 h de cultivo, 700 µl de meio foram substituídos por 700 µl de meio contendo os seguintes tratamentos: controle (sem leptina), 5, 50 ou 500 ng/mL de leptina recombinante humana (10221HNAE). As células foram incubadas por mais 24 h e, após remoção do meio de cultivo, foram recuperadas adicionando-se aos poços uma solução de isotiocianato de guanidina e fenol. As amostras foram congeladas para posterior extração de RNA, que foi realizada utilizando protocolo de isotiocianato de guanidina e fenol-clorofórmio. As etapas de transcrição reversa e PCR em tempo real foram realizadas conforme descrito no item 2.1.2. O experimento foi realizado em quatro replicações.

### 3 RESULTADOS

Através de análises de PCR em diferentes tipos celulares provenientes de ovários de abatedouro, foi possível detectar expressão do gene *LEP* em oócitos, células do *cumulus oophorus*, granulosa e teca. Já a expressão do receptor da leptina (*LEPR*) foi observada em oócitos, células da teca e da granulosa (dados não demonstrados).

A expressão relativa de RNAm dos genes *SOCS3*, *PIAS3*, *LEPROT*, *ADIPOR1* e *ADIPOR2* foi avaliada em células da granulosa de folículos dominantes (F1) ou subordinados (F2) de fêmeas bovinas no dia 2, 3 ou 4 da onda de crescimento folicular. Observou-se que os genes *LEPROT* e *ADIPOR1* foram menos expressos nas células da granulosa dos F2 no dia 4 ( $P < 0,05$ ). Já o gene *ADIPOR2* foi menos expresso nas células da granulosa dos F2 nos dias 3 e 4 (Figura 1).

Após confirmar a expressão dos genes *LEP* e *LEPR* através de PCR, a intensidade de imunomarcagem em fragmentos da parede folicular foi quantificada através de imuno-histoquímica (IHQ). Foi possível observar imunomarcagem para leptina nas células da granulosa dos folículos, principalmente dos subordinados. As células da camada da granulosa dos

folículos dominantes (F1) apresentaram discreta (Figure 2A e 2E) ou nenhuma imunomarcacão (Figura 2C) para a leptina, enquanto que os mesmos tipos celulares dos folículos subordinados (F2) apresentaram intensa imunomarcacão (Figuras 2B, 2D e 2F) em todos os folículos das fêmeas em estudo. A ausência de imunomarcacão após a incubacão do anticorpo anti-leptina com o peptídeo utilizado para gerar o anticorpo confirmam a especificidade da imunomarcacão (dados não demonstrados). Imunomarcacão do receptor LEPR foi identificada nas células da granulosa e teca de folículos dominantes e subordinados (Figura 3), embora não tenha sido observada marcação diferencial entre as classes foliculares.

A injeção intrafolicular de leptina nas concentrações finais (calculadas a partir do tamanho do folículo) de 100 ou 1000 ng/mL não afetou o crescimento folicular e a ovulacão ( $P > 0,05$ , Figura 4). Quando as células da granulosa foram tratadas *in vitro* com 10, 100 ou 500ng/mL de leptina, não se observou efeito sobre a transcriçao relativa de RNAm das enzimas esteroidogênicas *HSD3B1* e *CYP11A1*, da *STAT3* e do inibidor do gene que codifica a proteína inibidora de apoptose *XIAP* (Figura 5).

#### 4 DISCUSSÃO

O presente estudo teve por objetivo avançar no entendimento da regulacão e funçao da leptina durante o desenvolvimento folicular em bovinos. Os principais achados foram que o gene da leptina é expresso em células da teca, granulosa, cumulus e oócito; uma intensa imunomarcacão da leptina é observada na granulosa de folículos subordinados, enquanto que a imunomarcacão do LEPR foi identificada nas células de folículos saudáveis e atresicos. A IIF de leptina não afeta o desenvolvimento folicular e a ovulacão em bovinos. Além disso, o tratamento com leptina não afetou a transcriçao relativa das enzimas esteroidogênicas *HSD3B1* e *CYP11A* nas células da granulosa bovina cultivadas *in vitro*.

A expressao de leptina e seus receptores já foi avaliada no ovário de humanos (CIOFFI et al., 1997; KARLSSON et al., 1997), ratos (RYAN et al., 2002; RYAN et al., 2003), suínos (RUIZ-CORTES et al., 2000) e bovinos (SARKAR et al., 2010). Ensaio de afinidade proteica indicaram a presença de



receptores de leptina nas células da teca (SPICER & FRANCISCO, 1998) e granulosa de folículos grandes ( $\geq 8\text{mm}$ ) e pequenos (1-5 mm) em ovários bovinos (SPICER & FRANCISCO, 1997). Os receptores de leptina na granulosa são funcionais, uma vez que a adição da leptina em cultivo *in vitro* foi capaz de inibir a esteroidogênese nos dois tipos celulares (revisado por (SPICER, 2001). SARKAR et al. (2010), além de detectar o RNAm da leptina e seu receptor em células da granulosa bovina, também sugeriram o envolvimento da leptina de uma maneira parácrina/autócrina no desenvolvimento do corpo lúteo e no desenvolvimento de pequenos folículos.

A expressão do receptor de leptina já foi detectada na teca e granulosa de folículos primordiais, secundários e antrais em suínos (SMOLINSKA et al., 2012). Nesta espécie, também se observa imunomarcagem de leptina em diversas estruturas ovarianas incluindo folículos primordiais, primários, pré-antrais e antrais (PHOOPHITPHONG et al., 2017). A intensa imunomarcagem de folículos subordinados observada neste estudo, ou seja, naqueles que encontravam em atresia, sugere que a leptina pode estar associada com a inibição do crescimento ou diferenciação folicular.

Os efeitos da deficiência de leptina em camundongos *knockdown ob/ob* já foram estudados em folículos (ALMOG et al., 2001; HAMM et al., 2004), sendo associados com problemas na foliculogênese, e aumento da atresia folicular (HAMM et al., 2004). DING et al. (2017) também realizaram *knockdown* de leptina em células de granulosa humana, observando menor produção de E2, TGF- $\beta$ , AMH e IGF-1, porém aumento na produção de progesterona. A redução da expressão da leptina através de siRNA reduziu a fosforilação de JAK2/STAT3, envolvidas na sinalização intracelular de leptina, sendo observado aumento da taxa de apoptose das células transfectadas.

Uma vez que a leptina induz sua sinalização através da rota STAT3, a qual também é mais expressa nas células da granulosa de folículos subordinados (GASPERIN et al., 2015), avaliou-se a abundância de RNAm dos genes *PIAS3* e *SOCS3*, que codificam proteínas inibidoras da STAT3, bloqueando suas funções (SHUAI & LIU, 2003). Era esperado que ocorresse menor transcrição relativa de *PIAS3* e *SOCS3* e maior transcrição relativa de *STAT3* nas células da granulosa de folículos dominantes, uma vez que a *PIAS3* parece inibir a ativação da *STAT3* nas células da granulosa saudáveis de

folículos em crescimento, sob estímulo de gonadotrofinas (RUSSELL & RICHARDS, 1999), e maior expressão de SOCS3 foi observada durante a luteólise induzida por PGF, supostamente inibindo as ações da leptina/STAT3 (CURLEWIS et al., 2002).

Existem evidências de que a proteína LEPROT, isolada em humanos, também conhecida como OB-RGRP (BAILLEUL et al., 1997; COUTURIER et al., 2007), regula negativamente a expressão de receptores de leptina na superfície celular *in vitro*. Observou-se uma menor expressão do gene *LEPROT* nas células da granulosa de folículos subordinados no dia 4. Entretanto, não se observou efeito das diferentes classes foliculares na marcação do LEPR no presente estudo.

A adiponectina, uma adipocina que aparentemente apresenta efeitos antagonistas aos da leptina em células endoteliais (ZHANG et al., 2014), também pode estar envolvida na regulação da leptina/STAT3. A adiponectina diminui a produção de androstenediona, a expressão do receptor de LH e de enzimas relacionadas à produção de andrógenos em células da teca cultivadas *in vitro* (COMIM et al., 2013).

Além dos mecanismos de regulação da leptina/STAT3, a adiponectina parece inibir funções da leptina, em parte, através da inibição do receptor ObR através da ligação deste ao inibidor SOCS3 (HANDY et al., 2011; MALESZKA et al., 2014). Portanto, investigamos a expressão dos receptores AdipoR1 e R2 nas células da granulosa. A maior expressão de ambos receptores na granulosa de folículos dominantes sugere uma participação da adiponectina no crescimento folicular, ou seja, uma regulação oposta à observada para a leptina, o que sugere ações antagônicas.

Agindo localmente, a leptina pode estar regulando a esteroidogênese, inibindo o crescimento folicular, uma vez que os folículos que apresentaram intensa marcação no presente estudo, eram folículos com células da granulosa apoptóticas. Em suporte a esta hipótese, SARKAR et al. (2010) observaram a expressão local da leptina no folículo e também uma diminuição na expressão de leptina em folículos saudáveis, com altos níveis de estradiol intrafolicular. Níveis elevados de leptina no fluido de folículos pequenos (< 8mm), considerados atrésicos, durante a fase luteal em bovinos foram demonstrados por (DAYI et al., 2005).

Recentemente, dados obtidos por trabalhos de nosso grupo de pesquisa indicaram que a STAT3, que também é ativada pela leptina (ZABEAU et al., 2003) só se encontra ativa (fosforilada) em folículos em avançada atresia (GASPERIN et al., 2015), ou seja, na mesma fase em que se encontravam os folículos subordinados avaliados por imuno-histoquímica no presente estudo. É possível que a leptina, ativando a via STAT3, esteja envolvida no mecanismo de morte celular, uma vez que a ativação da STAT3 é essencial durante a involução da glândula mamária, a qual envolve morte celular por apoptose (CHAPMAN et al., 1999).

Esta hipótese foi testada no estudo *in vivo*, no qual administrou-se leptina recombinante no interior de folículos saudáveis em crescimento. Até o momento, este foi o primeiro estudo *in vivo* a investigar o efeito da leptina no ambiente folicular. Apesar disto, os folículos cresceram normalmente e ovularam, fato que se pode atribuir ao tamanho em que o folículo foi injetado, onde talvez existisse um número menor de receptores para Leptina (SPICER & FRANCISCO, 1998). No estudo realizado por SARKAR et al. (2010), observa-se que há uma maior expressão de receptores e de leptina em células da granulosa e da teca de folículos menores em relação a folículos maiores que 5mm e demais tamanhos apresentados no estudo.

Altas doses de leptina circulante podem inibir a ovulação em ratos (DUGGAL et al., 2000). RICCI et al. (2006), em um estudo semelhante, atribuíram este efeito ao fato da leptina diminuir a produção de óxido nítrico (NO), fator que estimula a produção de prostaglandinas e intensifica o processo inflamatório, facilitando a ruptura do folículo (FALETTI et al., 1999). Apesar disto, ao utilizar um estímulo agudo de leptina no tecido ovariano, DI YORIO et al. (2013) relatam a inibição do processo ovulatório, diminuindo significativamente a expressão de STAT3 e ERK1/2, e aumentando a expressão da proteína SOCS3. Por outro lado, um estímulo contínuo de doses baixas induziu o processo ovulatório, aumentando a expressão de STAT3, ERK1/2 e diminuindo a expressão da proteína SOCS3.

No estudo *in vitro*, acreditava-se que a leptina poderia regular (positiva ou negativamente) a transcrição de genes esteroideogênicos, conforme apresentado na literatura. Porém, não houve mudança na transcrição relativa dos genes analisados. Diversos estudos investigaram o papel da leptina *in vitro*

em várias espécies, como humanos (AGARWAL et al., 1999a), suínos (RUIZ-CORTES et al., 2003; DINEVA et al., 2007), bovinos (SPICER & FRANCISCO, 1997; 1998; NICKLIN et al., 2007) com doses que variam de 1 a 1000 ng/ml e apresentam resultados positivos e negativos em relação à regulação da esteroidogênese, dependendo da espécie e modelo utilizado. NICKLIN et al. (2007) não observaram aumento ou diminuição significativa na produção de progesterona quando células luteais de bovinos foram tratadas com leptina recombinante humana, porém, observaram a expressão de LEPRb em todos os estádios de desenvolvimento do CL.

Uma imunização contra o LEPR em galinhas foi capaz de promover a expressão de genes apoptóticos tais como caspase3 na teca e em FAZ na camada da granulosa e uma diminuição severa na expressão de IGF-I em ambas camadas destes tipos celulares (LEI et al., 2014).

Em humanos, a leptina é capaz de induzir a fosforilação da *extracellular signal-regulated kinase* (ERK1/2), p38 e *C-Jun N-terminal kinase* (JNK) (LIN et al., 2009). Somente o bloqueio da ERK e da p38 foram capazes de reverter a inibição da leptina sobre a expressão da enzima STAR e produção de progesterona em células da granulosa, sugerindo que estas duas cascatas da *mitogen activated protein kinase* (MAPK) estão envolvidas na inibição da esteroidogênese mediada pela leptina (LIN et al., 2009). Concentrações maiores que 50 ng/ml levaram a uma inibição da síntese de estradiol pelas células da granulosa humana e inibiram o efeito positivo do IGF1 na síntese da androstenediona pelas células da teca (AGARWAL et al., 1999b). BRANNIAN et al. (1999), utilizando níveis fisiológicos (1-10 ng/ml) de leptina recombinante humana em células da granulosa luteinizada *in vitro*, observaram uma supressão dos níveis de progesterona estimulada por gonadotrofinas, aparentemente através da ação antagonista sobre a insulina e/ou IGF1.

A secreção de estradiol e progesterona é estimulada após tratamento com leptina em baixas doses (1 e 10 ng/μl), enquanto que altas doses (100 ng/μl) suprimem a produção (KARAMOUTI et al., 2009) em células da granulosa humana tratadas *in vitro*. Já KARAMOUTI et al. (2003) não detectaram a expressão nem secreção de leptina em células luteinizadas da granulosa de mulheres submetidas à fecundação *in vitro* (FIV). RUIZ-CORTES et al. (2003) observaram um efeito bifásico da leptina suína recombinante em um cultivo de

células da granulosa suína por 48h. A dose de 10 ng/ml aumentou o acúmulo de progesterona em três vezes, enquanto que a dose de 1000 ng/ml reduziu este acúmulo, porém ambas doses estimularam a fosforilação da rota da STAT3.

Em células da granulosa relações dose dependente entre 1-100 ng/ml de leptina são capazes de aumentar o acúmulo de peptídeos associados a apoptose (BAX) em humanos (SIROTKIN et al., 2008) e em suínos (BAX, p53), juntamente com um aumento na produção de progesterona (SIROTKIN & MESZAROSOVA, 2010). Há também um acúmulo de peptídeos relacionados à proliferação em humanos (PCNA, ciclina B1) (SIROTKIN et al., 2008) e suínos (PCNA, ciclina B1, MAPK) (SIROTKIN & MESZAROSOVA, 2010).

Apesar da literatura ser controversa quanto à influência da leptina na esteroidogênese das células da granulosa, fica claro que sua função depende da espécie, do tipo de tecido e tipo celular estudado, bem como das doses utilizadas. Os resultados apresentados neste estudo demonstram uma maior intensidade da presença de leptina em folículos subordinados e uma alteração na expressão de *ADIPOR1*, *ADIPOR2* e *LEPROT* em folículos subordinados; porém não foi possível observar um efeito sobre crescimento folicular e ovulação *in vivo*, bem como sobre a expressão de genes relacionados à esteroidogênese *in vitro*.

### Agradecimentos

Os autores agradecem a Dra. Lígia Margareth Cantarelli Pegoraro e a EMBRAPA clima temperado por permitir o uso dos animais, bem como o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

### Referências

- AGARWAL, S. K.; VOGEL, K.; WEITSMAN, S. R.; MAGOFFIN, D. A. Leptin antagonizes the insulin-like growth factor-I augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 84, n. 3, p. 1072-1076, 1999
- ALMOG, B.; GOLD, R.; TAJIMA, K.; DANTES, A.; SALIM, K.; RUBINSTEIN, M.; BARKAN, D.; HOMBURG, R.; LESSING, J. B.; NEVO, N.; GERTLER, A.; AMSTERDAM, A. Leptin attenuates follicular apoptosis and accelerates the

onset of puberty in immature rats. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 183, n. 1-2, p. 179-191, 2001.

BAILLEUL, B.; AKERBLOM, I.; STROSBURG, A. D. The leptin receptor promoter controls expression of a second distinct protein. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 14, p. 2752-2768, 1997.

BARASH, I. A.; CHEUNG, C. C.; WEIGLE, D. S.; REN, H.; KABIGTING, E. B.; KUIJPER, J. L.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. **Endocrinology**, v. 137, n. 7, p. 3144-3147, 1996.

BJORBAEK, C.; UOTANI, S.; DA SILVA, B.; FLIER, J. S. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. **The journal of biological chemistry**, v. 272, n. 51, p. 32686-32695, 1997.

BLUHER, S.; MANTZOROS, C. S. Leptin in reproduction. **Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity**, v. 14, n. 6, p. 458-464, 2007.

BOELHAUVE, M.; SINOWATZ, F.; WOLF, E.; PAULA-LOPES, F. F. Maturation of bovine oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of in vitro-produced blastocysts. **Biology of reproduction**, v. 73, n. 4, p. 737-744, 2005.

BRANNIAN, J. D.; ZHAO, Y.; MCELROY, M. Leptin inhibits gonadotrophin-stimulated granulosa cell progesterone production by antagonizing insulin action. **Human reproduction**, v. 14, n. 6, p. 1445-1448, 1999.

BUDAK, E.; FERNANDEZ SANCHEZ, M.; BELLVER, J.; CERVERO, A.; SIMON, C.; PELLICER, A. Interactions of the hormones leptin, ghrelin, adiponectin, resistin, and PYY3-36 with the reproductive system. **Fertility and sterility**, v. 85, n. 6, p. 1563-1581, 2006.

CHAPMAN, R. S.; LOURENCO, P. C.; TONNER, E.; FLINT, D. J.; SELBERT, S.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; CLARKE, A. R.; WATSON, C. J. Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of STAT3. **Genes & development**, v. 13, n. 19, p. 2604-2616, 1999.

CHEHAB, F. F.; MOUNZIH, K.; LU, R.; LIM, M. E. Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. **Science**, v. 275, n. 5296, p. 88-90, 1997.

CIKOS, S.; BUKOVSKA, A.; KOPPEL, J. Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. **BMC molecular biology** v. 8, p.1-14, 2007.

CIOFFI, J. A.; VAN BLERKOM, J.; ANTCZAK, M.; SHAFER, A.; WITTMER, S.; SNODGRASS, H. R. The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles. **Molecular human reproduction**, v. 3, n. 6, p. 467-472, 1997.

COMIM, F. V.; HARDY, K.; FRANKS, S. Adiponectin and its receptors in the ovary: further evidence for a link between obesity and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1-9, 2013.

COTTRELL, E. C.; MERCER, J. G.; COTTRELL, E. C.; MERCER, J. G. Leptin receptors. **Handbook of experimental pharmacology**, n. 209, p. 3-21, 2012.

COUTURIER, C.; SARKIS, C.; SERON, K.; BELOUZARD, S.; CHEN, P.; LENAIN, A.; CORSET, L.; DAM, J.; VAUTHIER, V.; DUBART, A.; MALLET, J.; FROGUEL, P.; ROUILLE, Y.; JOCKERS, R. Silencing of OB-RGRP in mouse hypothalamic arcuate nucleus increases leptin receptor signaling and prevents diet-induced obesity. **Proceedings of national academic of science of the United States of America**, v. 104, n. 49, p. 19476-19481, 2007.

CURLEWIS, J. D.; TAM, S. P.; LAU, P.; KUSTERS, D. H. L.; BARCLAY, J. L.; ANDERSON, S. T.; WATERS, M. J. A Prostaglandin F2 $\alpha$  analog induces suppressors of cytokine signaling-3 expression in the corpus luteum of the pregnant rat: a potential new mechanism in luteolysis. **Endocrinology**, v. 143, n. 10, p. 3984-3993, 2002.

DAYI, A.; BEDIZ, C. S.; MUSAL, B.; YILMAZ, O.; COMLEKCI, A.; CELILOGLU, M.; CIMRIN, D. Comparison of leptin levels in serum and follicular fluid during the oestrous cycle in cows. **Acta veterinaria Hungarica**, v. 53, n. 4, p. 457-467, 2005.

DI YORIO, M. P.; BILBAO, M. G.; BIAGINI-MAJOREL, A. M.; FALETTI, A. G. Ovarian signalling pathways regulated by leptin during the ovulatory process. **Reproduction**, v. 146, n. 6, p. 647-658, 2013.

DI YORIO, M. P.; BILBAO, M. G.; PUSTOVRH, M. C.; PRESTIFILIPPO, J. P.; FALETTI, A. G. Leptin modulates the expression of its receptors in the hypothalamic-pituitary-ovarian axis in a differential way. **The Journal of endocrinology**, v. 198, n. 2, p. 355-366, 2008.

DINEVA, J.; WOJTOWICZ, A. K.; AUGUSTOWSKA, K.; VANGELOV, I.; GREGORASZCZUK, E. L.; IVANOVA, M. D. Expression of atrial natriuretic peptide, progesterone, apoptosis-related proteins and caspase-3 in in vitro luteinized and leptin-treated porcine granulosa cells. **Endocrine regulations**, v. 41, n. 1, p. 11-18, 2007.

DING, X.; KOU, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, X.; CHENG, G.; JIA, T. Leptin siRNA promotes ovarian granulosa cell apoptosis and affects steroidogenesis by increasing NPY2 receptor expression. **Gene**, v. 633, p. 28-34, 2017.

DUGGAL, P. S.; VAN DER HOEK, K. H.; MILNER, C. R.; RYAN, N. K.; ARMSTRONG, D. T.; MAGOFFIN, D. A.; NORMAN, R. J. The in vivo and in vitro effects of exogenous leptin on ovulation in the rat. **Endocrinology**, v. 141, n. 6, p. 1971-1976, 2000.

EVANS, A. C.; FORTUNE, J. E. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. **Endocrinology**, v. 138, n. 7, p. 2963-2971, 1997.

FALETTI, A.; PÉREZ MARTÍNEZ, S.; PEROTTI, C.; DE GIMENO, M. A. F. Activity of ovarian nitric oxide synthase (NOs) during ovulatory process in the rat: relationship with prostaglandins (PGs) production. **Nitric oxide**, v. 3, n. 4, p. 340-347, 1999.

GALE, S. M.; CASTRACANE, V. D.; MANTZOROS, C. S. Energy homeostasis, obesity and eating disorders: recent advances in endocrinology. **The Journal of nutrition**, v. 134, n. 2, p. 295-298, 2004.

GASPERIN, B. G.; ROVANI, M. T.; FERREIRA, R.; ILHA, G. F.; BORDIGNON, V.; GONCALVES, P. B.; DUGGAVATHI, R. Functional status of STAT3 and MAPK3/1 signaling pathways in granulosa cells during bovine follicular deviation. **Theriogenology**, v. 83, n. 3, p. 353-359, 2015.

GUTIERREZ, C. G.; CAMPBELL, B. K.; WEBB, R. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. **Biology of reproduction**, v. 56, n. 3, p. 608-616, 1997.

HAMM, M. L.; BHAT, G. K.; THOMPSON, W. E.; MANN, D. R. Folliculogenesis is impaired and granulosa cell apoptosis is increased in leptin-deficient mice. **Biology of reproduction**, v. 71, n. 1, p. 66-72, 2004.

HANDY, J. A.; FU, P. P.; KUMAR, P.; MELLS, J. E.; SHARMA, S.; SAXENA, N. K.; ANANIA, F. A. Adiponectin inhibits leptin signaling via multiple mechanisms to exert protective effects against hepatic fibrosis. **The Biochemical journal**, v. 440, n. 3, p. 385-395, 2011.

KARAMOUTI, M.; KOLLIA, P.; KALLITSARIS, A.; VAMVAKOPOULOS, N.; KOLLIOS, G.; MESSINIS, I. E. Modulating effect of leptin on basal and follicle stimulating hormone stimulated steroidogenesis in cultured human lutein granulosa cells. **Journal of endocrinological investigation**, v. 32, n. 5, p. 415-419, 2009.

KARAMOUTI, M.; KOLLIA, P.; KARLIGIOTOU, E.; KALLITSARIS, A.; PRAPAS, N.; KOLLIOS, G.; SEFERIADIS, K.; VAMVAKOPOULOS, N.; MESSINIS, I. E. Absence of leptin expression and secretion by human luteinized granulosa cells. **Journal of molecular endocrinology**, v. 31, n. 1, p. 233-239, 2003.

KARLSSON, C.; LINDELL, K.; SVENSSON, E.; BERGH, C.; LIND, P.; BILLIG, H.; CARLSSON, L. M.; CARLSSON, B. Expression of functional leptin receptors in the human ovary. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 82, n. 12, p. 4144-4148, 1997.



LEI, M. M., WU, S. Q., LI, X. W., WANG, C. L., CHEN, Z., & SHI, Z. D. Leptin receptor signaling inhibits ovarian follicle development and egg laying in chicken hens. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 12, n. 25, p. 1-12, 2014.

LIN, Q.; POON, S. L.; CHEN, J.; CHENG, L.; HOYUEN, B.; LEUNG, P. C. Leptin interferes with 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling to inhibit steroidogenesis in human granulosa cells. **Reproductive biology and endocrinology: RB&E**, v. 7, p. 115-123, 2009.

MALESZKA, A.; SMOLINSKA, N.; NITKIEWICZ, A.; KIEZUN, M.; CHOJNOWSKA, K.; DOBRZYN, K.; SZWACZEK, H.; KAMINSKI, T. Adiponectin expression in the porcine ovary during the oestrous cycle and its effect on ovarian steroidogenesis. **International journal of endocrinology**, v. 2014, p. 1-9, 2014.

MANTZOROS, C. S.; FLIER, J. S.; ROGOL, A. D. A longitudinal assessment of hormonal and physical alterations during normal puberty in boys. V. Rising leptin levels may signal the onset of puberty. **The Journal clinical endocrinology and metabolism**, v. 82, n. 4, p. 1066-1070, 1997.

MARGETIC, S.; GAZZOLA, C.; PEGG, G. G.; HILL, R. A. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. **International journal of obesity**, v. 26, p. 1407-1433, 2002.

NESTOR, C. C.; KELLY, M. J.; RØNNEKLEIV, O. K. Cross-talk between reproduction and energy homeostasis: central impact of estrogens, leptin and kisspeptin signaling. **Hormone molecular biology and clinical investigation**, v. 17, n. 3, p. 109-128, 2014.

NICKLIN, L. T.; ROBINSON, R. S.; MARSTERS, P.; CAMPBELL, B. K.; MANN, G. E.; HUNTER, M. G. Leptin in the bovine corpus luteum: receptor expression and effects on progesterone production. **Molecular reproduction and development**, v. 74, n. 6, p. 724-729, 2007.

PHOOPHITPHONG, D.; SRISUWATANASAGUL, S.; TUMMARUK, P. Leptin immunohistochemical staining in the porcine ovary. **Anatomia, histologia, embryologia**, v. 46, n. 4, p. 334-341, 2017.

PORTELA, V. M.; ZAMBERLAM, G.; GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, J. F. C.; PRICE, C. A. Role of Angiotensin II in the periovulatory epidermal growth factor-like cascade in bovine granulosa cells in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 85, n. 6, p. 1167-1174, 2011.

RICCI, A. G.; DI YORIO, M. P.; FALETTI, A. G. Inhibitory effect of leptin on the rat ovary during the ovulatory process. **Reproduction**, v. 132, n. 5, p. 771-780, 2006.

RUIZ-CORTES, Z. T.; MARTEL-KENNES, Y.; GEVRY, N. Y.; DOWNEY, B. R.; PALIN, M. F.; MURPHY, B. D. Biphasic effects of leptin in porcine granulosa cells. **Biology of reproduction**, v. 68, n. 3, p. 789-796, 2003.

RUIZ-CORTES, Z. T.; MEN, T.; PALIN, M. F.; DOWNEY, B. R.; LACROIX, D. A.; MURPHY, B. D. Porcine leptin receptor: molecular structure and expression in the ovary. **Molecular reproduction and development**, v. 56, n. 4, p. 465-474, 2000.

RUSSELL, D. L.; RICHARDS, J. S. Differentiation-dependent prolactin responsiveness and STAT (signal transducers and activators of transcription) signaling in rat ovarian cells. **Molecular endocrinology**, v. 13, n. 12, p. 2049-2064, 1999.

RYAN, N. K.; VAN DER HOEK, K. H.; ROBERTSON, S. A.; NORMAN, R. J. Leptin and leptin receptor expression in the rat ovary. **Endocrinology**, v. 144, n. 11, p. 5006-5013, 2003.

RYAN, N. K.; WOODHOUSE, C. M.; VAN DER HOEK, K. H.; GILCHRIST, R. B.; ARMSTRONG, D. T.; NORMAN, R. J. Expression of leptin and its receptor in the murine ovary: possible role in the regulation of oocyte maturation. **Biology of reproduction**, v. 66, n. 5, p. 1548-1554, 2002.

SARKAR, M.; SCHILFFARTH, S.; SCHAMS, D.; MEYER, H. H.; BERISHA, B. The expression of leptin and its receptor during different physiological stages in the bovine ovary. **Molecular reproduction and development**, v. 77, n. 2, p. 174-181, 2010.

SHUAI, K.; LIU, B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. **Nature reviews. Immunology**, v. 3, n. 11, p. 900-911, 2003.

SIROTKIN, A.; MLYNCEK, M.; MAKAREVICH, A.; FLORKOVICOVA, I.; HETÉNYI, L. Leptin affects proliferation-, apoptosis-and protein kinase A-related peptides in human ovarian granulosa cells. **Physiological research**, v. 57, n. 3, p. 437-442, 2008.

SIROTKIN, A. V.; MESZAROSOVA, M. Comparison of effects of leptin and ghrelin on porcine ovarian granulosa cells. **Domestic animal endocrinology**, v. 39, n. 1, p. 1-9, 2010.

SMOLINSKA, N.; KAMINSKI, T.; SIAWRYS, G.; PRZALA, J. Expression of leptin and its receptor genes in the ovarian follicles of cycling and early pregnant pigs. **Animal: an international journal of animal bioscience**, v. 7, n. 1, p. 109-117, 2012.

SPICER, L. J. Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. **Domestic animal endocrinology**, v. 21, n. 4, p. 251-270, 2001.

SPICER, L. J.; CHAMBERLAIN, C. S.; FRANCISCO, C. C. Ovarian action of leptin: effects on insulin-like growth factor-I-stimulated function of granulosa and thecal cells. **Endocrine**, v. 12, n. 1, p. 53-59, 2000.

SPICER, L. J.; FRANCISCO, C. C. The adipose obese gene product, leptin: evidence of a direct inhibitory role in ovarian function. **Endocrinology**, v. 138, n. 8, p. 3374-3379, 1997.

SPICER, L. J.; FRANCISCO, C. C. Adipose obese gene product, leptin, inhibits bovine ovarian thecal cell steroidogenesis. **Biology of reproduction**, v. 58, n. 1, p. 207-212, 1998.

TARTAGLIA, L. A.; DEMBSKI, M.; WENG, X.; DENG, N.; CULPEPPER, J.; DEVOS, R.; RICHARDS, G. J.; CAMPFIELD, L. A.; CLARK, F. T.; DEEDS, J. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. **Cell**, v. 83, n. 7, p. 1263-1271, 1995.

WILES, J. R.; KATCHKO, R. A.; BENAVIDES, E. A.; O'GORMAN, C. W.; ESCUDERO, J. M.; KEISLER, D. H.; STANKO, R. L.; GARCIA, M. R. The effect of leptin on luteal angiogenic factors during the luteal phase of the estrous cycle in goats. **Animal reproduction science**, v. 148, n. 0, p. 121-129, 2014.

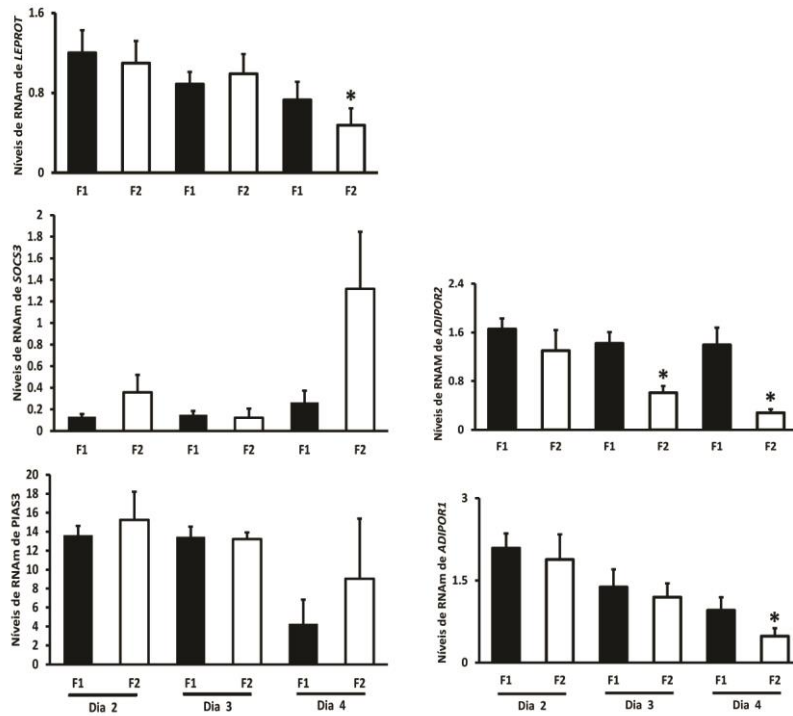
ZABEAU, L.; LAVENS, D.; PEELMAN, F.; EYCKERMAN, S.; VANDEKERCKHOVE, J.; TAVERNIER, J. The ins and outs of leptin receptor activation. **FEBS letters**, v. 546, n. 1, p. 45-50, 2003.

ZHANG, Z.; WANG, F.; WANG, B.-J.; CHU, G.; CAO, Q.; SUN, B.-G.; DAI, Q.-Y. Inhibition of leptin-induced vascular extracellular matrix remodelling by adiponectin. **Journal of molecular endocrinology**, v. 53, n. 2, p. 145-154, 2014.

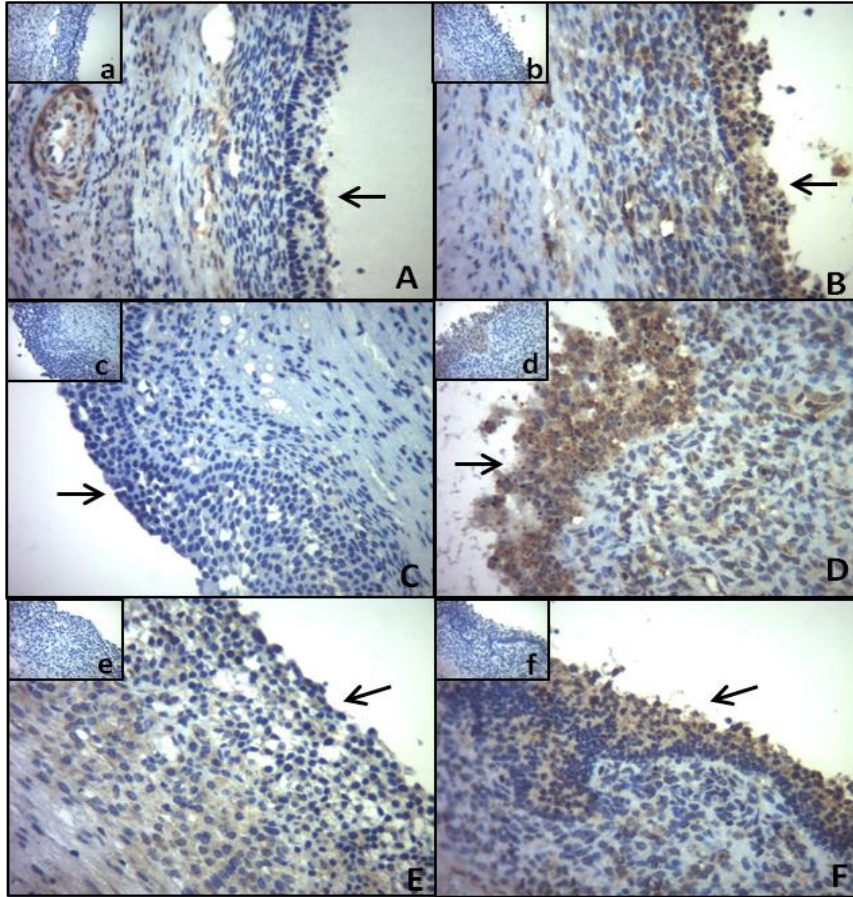
ZIEBA, D. A.; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, G. L. Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: a comparative review. **Domestic animal endocrinology**, v. 29, n. 1, p. 166-85, 2005.

Tabela 1: Sequências de iniciadores utilizados no estudo.

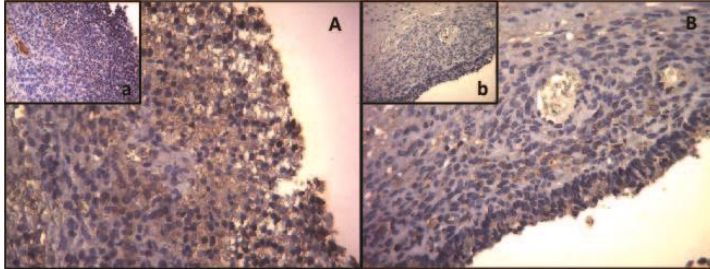
Gene	Iniciador sense	Iniciador anti-sense
<i>LEP</i>	TCTACCAACAGATCCTCACCAGTCT	GGTCCCGGAGGTTCTCCA
<i>LEPR</i>	ACGGAAGGAGTAGGGAAACC	TGAGGAGGAAATTATTATTGGCACA
<i>LEPROT</i>	CTGGCGTTAAAGCTCTTGTGG	CGCTACTTGTTGCATCGGAG
<i>ADIPOR1</i>	CTCGGCTCATCTACCTCTCC	GTGAAGTGCATGGTAGGCA
<i>ADIPOR2</i>	TAGAGGCGTCTGTCCTTTCT	TGAACCCCTCATCTTCCTGA
<i>GAPDH</i>	GATTGTCAGCAATGCCTCCT	GGTCATAAGTCCCTCCACGA
<i>H2A HISTONE</i>	GAGGAGCTGAACAAGCTGTTG	TTGTGGTGGCTCTCAGTCTTC
<i>PPIB</i>	GGTCATCGGTCTCTTTGGAA	TCCTTGATCACACGATGGAA
<i>18S RRNA</i>	CCTTCCGCGAGGATCCATTG	CGCTCCCAAGATCCAACACTAC
<i>RPL19</i>	GCCAACTCCCGTCAGCAGA	TGGCTGTACCCTTCCGCTT
<i>STAT3</i>	CTGCAGCAGAAGGTTAGCTACAAA	TTCTAAACAGCTCCACGATTCTCTC
<i>HSD3B1</i>	TCTCTGCAGTACTGGCTTGC	GTCACTAGGTGGCGGTTGAA
<i>CYP11A1</i>	CTTGACCTTTCTGGCTAGG	AAGGGGAAGAGGTAGGGTGA
<i>XIAP</i>	GAAGCACGGATCATTACATTTGG	CCTTCACCTAAAGCATAAAATCCAG



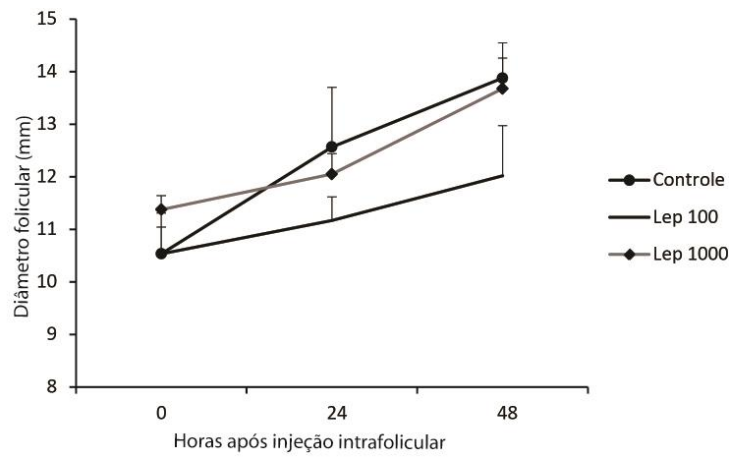
**Figura 1 – Níveis de RNAm de genes relacionados à regulação da leptina:** Expressão relativa de RNAm dos genes *PIAS3*, *LEPROT*, *ADIPOR1* e *ADIPOR2* nas células da granulosa dos folículos ovarianos de fêmeas bovinas obtidos no dia 2, 3 ou 4 da onda de crescimento folicular. \*Diferença entre F1 e F2 dentro do dia ( $P < 0,05$ )



**Figura 2 – Imunomarcção de leptina nas células foliculares bovinas:** Imunomarcção para leptina nas células da granulosa bovina de folículos ovarianos dominantes (A, C e E) ou subordinados (B, D e F). Letras maiúsculas: cortes histológicos incubados com anticorpo. Letras minúsculas: cortes histológicos dos controles negativos não expostos ao anticorpo primário. Cortes histológicos foram expostos ao anticorpo anti-leptina (sc-842) previamente bloqueado com o peptídeo fornecido pelo fabricante (sc-842p) para comprovar a especificidade da imunomarcção. As setas indicam as células da granulosa.

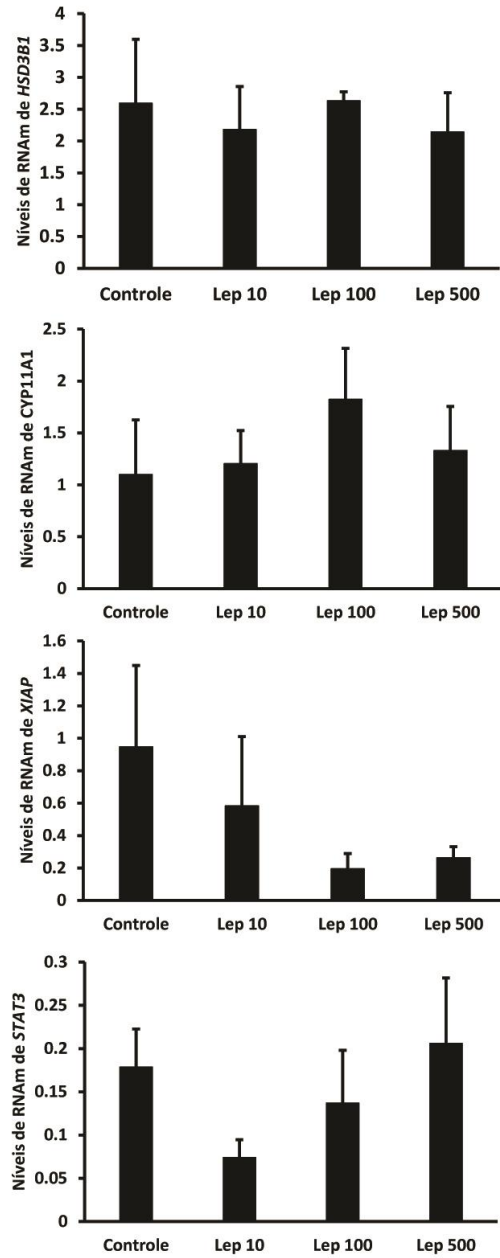


**Figura 3 – Imunomarcacão de receptor de leptina (LEPR) nas células foliculares bovinas:** Imunomarcacão para LEPR nas células da granulosa e teca bovina de folículo ovariano dominante (A) ou subordinados (B). Letras maiúsculas: cortes histológicos incubados com anticorpo. Letras minúsculas: cortes histológicos dos controles negativos.



**Figura 4: Diâmetro folicular após IIF com diferentes doses de leptina.** Folículos dominantes saudáveis (9 a 12 mm) de vacas previamente sincronizadas foram injetados com solução salina (controle) ou leptina recombinante humana (10221HNAE, Life Technologies) em concentrações finais de 100 ou 1000 ng/ml.





**Figura 5 – Níveis de RNAm de células da granulosa tratadas com diferentes doses de leptina *in vitro*:** Abundância de RNAm em células da granulosa bovina cultivadas por 6 dias, tratadas com 10ng/ml, 100ng/ml ou 500ng/ml de leptina recombinante no dia 5 do cultivo

## 5 DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS FUTURAS

A vaca é um excelente modelo de estudo para funções ovarianas, por possuir um ciclo bem definido e protocolos que podem englobar cada momento de seu ciclo. A partir das informações geradas por este estudo, pode-se sugerir que a oncostatina está envolvida na regulação da transcrição de alguns genes relacionados a esteroidogênese e na progressão das células da granulosa para a fase luteal, envolvendo-se com o recrutamento células polimorfonucleares e a provável transformação das células da teca e granulosa para o tecido luteal através das alterações dos padrões de expressão de metaloproteínas que estão envolvidas na remodelação destas células.

A leptina tem importante função na transição de fêmeas para o início de sua fase reprodutiva adulta, exercendo papel importante na regulação energética para o início de suas atividades reprodutivas conforme o balanço energético apresentado por estes animais, através de mudanças hormonais, na ovulação e na manutenção do corpo lúteo. Além disto vem sendo atribuída a distúrbios fisiológicos que acarretam em obesidade e consequente infertilidade. Porém neste estudo não pode-se atribuir função inibitória à leptina, pois todos os folículos testados *in vivo* se desenvolveram e ovulados, levando a crer que estes folículos, uma vez que atingem a dominância, estão destinados a ovular, se mantidos em condições favoráveis. Talvez ao utilizar folículos que ainda estão participando da janela de seleção do dominante fosse possível distinguir uma resposta relacionada à leptina. Além disto, quando testada *in vitro* a leptina não foi capaz de mudar os padrões de expressão dos genes analisados.

Tais perguntas talvez pudessem ser respondidas inicialmente através de estudos envolvendo outras análises como por exemplo: 1) a realização de citometria de fluxo para as amostras *in vitro*; 2) *Western blot* para ambos os tipos de amostra (*in vivo* e *in vitro*), confirmando assim a ausência da oncostatina na divergência e ovulação e presença na luteólise; 3) modelo *in vivo* utilizando a OSM e também um bloqueador da rota da STAT3; 4) análises do cultivo *in vitro* com menores intervalos para analisar as possíveis mudanças de transcrição influenciadas pela OSM e leptina 5) analisar genes relacionados ao metabolismo lipídico para leptina e genes relacionados ao remodelamento da matriz

extracelular para OSM; e 6) dosagens hormonais no sangue coletado das vacas do experimento *in vivo* e do meio de cultivo coletado dos experimentos *in vitro*.

Como próximo passo, cultivos basais de células da granulosa e da teca bovina luteinizada ou em linhagens de células da granulosa humana COV434 (pois o mercado apresenta uma gama maior de reagentes para células humanas) poderiam ser utilizados.

E como sugestão final, utilizar modelos animais de diferentes escores corporais (2-5) para o estudo com leptina, analisando seu efeito durante o momento de divergência, momento em que, segundo a literatura, parece exercer maior efeito sobre as células da teca e da granulosa.

## 5 CONCLUSÃO GERAL

A OSM aparentemente atua durante a luteólise, no remodelamento e na regressão do corpo lúteo, sendo provavelmente secretada por células de defesa.

A Leptina parece ter uma função menos relevante, porém os estudos realizados não identificaram seus efeitos de forma clara.

## 6 REFERÊNCIAS

- ABELL, K.; BILANCIO, A.; CLARKSON, R. W.; TIFFEN, P. G.; ALTAPARMAKOV, A. I.; BURDON, T. G.; ASANO, T.; VANHAESEBROECK, B.; WATSON, C. J. Stat3-induced apoptosis requires a molecular switch in PI(3)K subunit composition. **Nature cell biology**, v. 7, n. 4, p. 392-398, 2005.
- AERTS, J. M. J.; BOLS, P. E. J. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. **Reproduction in domestic animals**, v. 45, p. 171-179, 2010.
- ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; KASTELIC, J. P.; KO, J. C.; GINTHER, O. J. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of reproduction and fertility**, v. 94, n. 1, p. 177-188, 1992.
- ALEXANDER, W. S. Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. **Nature reviews. Immunology**, v. 2, n. 6, p. 410-416, 2002.
- ATLI, M. O.; BENDER, R. W.; MEHTA, V.; BASTOS, M. R.; LUO, W.; VEZINA, C. M., & WILTBANK, M. C. (2012). Patterns of gene expression in the bovine corpus luteum following repeated intrauterine infusions of low doses of prostaglandin F2alpha. **Biology of reproduction**, v.86, n.4, p.1-13, 2012.

AVALLE, L.; CAMPOREALE, A.; CAMPERI, A.; POLI, V. STAT3 in cancer: a double edged sword. **Cytokine**, v. 98, p. 42-50, 2017.

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

BUETTNER, C.; POCAI, A.; MUSE, E. D.; ETGEN, A. M.; MYERS, M. G., JR.; ROSSETTI, L. Critical role of STAT3 in leptin's metabolic actions. **Cell metabolism**, v. 4, n. 1, p. 49-60, 2006.

CAROU, M. C.; CRUZANS, P. R.; MARURI, A.; STOCKERT, J. C.; LOMBARDO, D. M. Apoptosis in ovarian granulosa cells of cattle: Morphological features and clearance by homologous phagocytosis. **Acta histochemica**, v. 117, n. 1, p. 92-103, 2015.

CHAPMAN, R. S.; LOURENCO, P. C.; TONNER, E.; FLINT, D. J.; SELBERT, S.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; CLARKE, A. R.; WATSON, C. J. Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. **Genes & development**, v. 13, n. 19, p. 2604-2616, 1999.

CHOUDHURY, A.; KHOLE, V. V. Immune-mediated destruction of ovarian follicles associated with the presence of HSP90 antibodies. **Molecular reproduction and development**, v. 82, n. 2, p. 81-89, 2015.

CURRY, T. E. JR & OSTEEN, K. G. The matrix metalloproteinase system: Changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. **Endocrine reviews**, v.24, p. 428–465, 2003.

DABIR, S.; KLUGE, A.; DOWLATI, A. The association and nuclear translocation of the PIAS3-STAT3 complex is ligand and time dependent. **Molecular cancer research**, v. 7, n. 11, p. 1854-60, 2009.

DARNELL, J. E. STATs and gene regulation. **Science**, v. 277, n. 5332, p. 1630-1635, 1997.

DARNELL, J. E. Transcription factors as targets for cancer therapy. **Nature reviews in cancer**, v. 2, n. 10, p. 740-749, 2002.

DAVID S. AARONSON, C. M. H. A road map for those who don't know JAK-STAT. **Science**, v. 296, p. 1653-1656, 2002.

DEVOTO, L.; KOHEN, P.; MUNOZ, A.; STRAUSS, J. F. 3RD. Human corpus luteum physiology and the luteal-phase dysfunction associated with ovarian stimulation. **Reproduction biomedicine online**, v.18, n.2, p.19–24, 2009.

DUNCAN, C. D. The human corpus luteum: remodeling during luteolysis and maternal recognition of pregnancy **Reviews of reproduction**, v. 5, p. 12-17, 2000.

EBONG, S.; YU, C.-R.; CARPER, D. A.; CHEPELINSKY, A. B.; EGWUAGU, C. E. Activation of STAT Signaling pathways and induction of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in mammalian lens by growth factors. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 45, n. 3, p. 872-878, 2004.

EDSON, M. A.; NAGARAJA, A. K.; MATZUK, M. M. The mammalian ovary from genesis to revelation. **Endocrine reviews**, v. 30, n. 6, p. 624-712, 2009.

ELKS, C. M.; STEPHENS, J. M. Oncostatin M modulation of lipid storage. **Biology**, v. 4, n. 1, p. 151-160, 2015.

FAIR, T.; HYTTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte size in relationship to follicular diameter, maturational competence and RNA synthesis. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 437-442, 1995.

FASNACHT, N.; MULLER, W. Conditional gp130 deficient mouse mutants. **Seminars in cell & development biology**, v. 19, n. 4, p. 379-384, 2008.

FIEDLER, E. P.; PLOUFFE, L. JR.; HALES, D. B.; HALES, K. H.; KHAN, I. Prostaglandin F(2alpha) induces a rapid decline in progesterone production and steroidogenic acute regulatory protein expression in isolated rat corpus luteum without altering messenger ribonucleic acid expression. **Biology of reproduction**, v. 6, n. 3, p. 643-650, 1999.

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

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; EVANS, A. C. O.; TURZILLO, A. M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of reproduction**, v. 65, n. 3, p. 648-654, 2001.

FUJIWAKI, R.; HATA, K.; NAKAYAMA, K.; MORIYAMA, M.; IWANARI, O.; KATABUCHI, H.; OKAMURA, H.; SAKAI, E.; MIYAZAKI, K. Thymidine kinase in epithelial ovarian cancer: relationship with the other pyrimidine pathway enzymes. **International journal of cancer**, v. 99, p. 328-335, 2002.

GAO, S. P.; BROMBERG, J. F. Touched and moved by STAT3. **Sci STKE**, v. 2006, n. 343, p1-4, 2006.

GASPERIN, B. G.; ROVANI, M. T.; FERREIRA, R.; ILHA, G. F.; BORDIGNON, V.; GONÇALVES, P. B. D.; DUGGAVATHI, R. Functional status of STAT3 and MAPK3/1 signaling pathways in granulosa cells during bovine follicular deviation. **Theriogenology**, v. 83, n. 3, p. 353-359, 2015.

GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of reproduction**, v. 55, n. 6, p. 1187-1194, 1996.

GREENFELD, C. R.; PEPLING, M. E.; BABUS, J. K.; FURTH, P. A.; FLAWS, J. A. BAX regulates follicular endowment in mice. **Reproduction**, v. 133, n. 5, p. 865-876, 2007.

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

HULBOY, D.L.; RUDOLPH, L. A.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. **Molecular human reproduction**, v. 3, p. 27-45, 1997.

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

ILHA, G. F.; ROVANI, M. T.; GASPERIN, B. G.; ANTONIAZZI, A. Q.; GONÇALVES, P. B. D.; BORDIGNON, V.; DUGGAVATHI, R. Lack of FSH support enhances LIF-STAT3 signaling in granulosa cells of atretic follicles in cattle. **Reproduction**, v. 150, n. 4, p. 395-403, 2015.

KONDRATSKYI, A.; KONDRATSKA, K.; SKRYMA, R.; PREVARSKAYA, N. Ion channels in the regulation of apoptosis. **Biochimica et biophysica acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1848, n. 10, Part B, p. 2532-2546, 2015.

KREUZALER, P. A.; STANISZEWSKA, A. D.; LI, W.; OMIDVAR, N.; KEDJOUAR, B.; TURKSON, J.; POLI, V.; FLAVELL, R. A.; CLARKSON, R. W. E.; WATSON, C. J. STAT3 controls lysosomal-mediated cell death in vivo. **Nature cell biology**, v. 13, n. 3, p. 303-309, 2011.

LEE, W.-S.; OTSUKA, F.; MOORE, R. K.; SHIMASAKI, S. Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 4, p. 994-999, 2001.

LEVY, D.; DARNELL, J. E. STATs: transcriptional control and biologic impact. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 3, p. 651-662, 2002.

LEVY, D. E.; LEE, C.-K. What does STAT3 do? **Journal of clinical investigation**, v. 109, n. 9, p. 1143-1148, 2002.

LI, M. G.; DING, G. L.; CHEN, X. J.; LU, X. P.; DONG, L. J.; DONG, M. Y.; YANG, X. F.; LU, X. E.; HUANG, H. F. Association of serum and follicular fluid leptin concentrations with granulosa cell phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3 expression in fertile patients with polycystic ovarian syndrome. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 92, n. 12, p. 4771-4776, 2007.

LIU, S.; FAN, Z.; GENG, Z.; ZHANG, H.; YE, Q.; JIAO, S.; XU, X. PIAS3 promotes homology-directed repair and distal non-homologous end joining. **Oncology letters**, v. 6, n. 4, p. 1045-1048, 2013.

LUO, X.; BUDIHARDJO, I.; ZOU, H.; SLAUGHTER, C.; WANG, X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. **Cell**, v. 94, n. 4, p. 481-490, 1998.

MATSUDA, T.; NAKAMURA, T.; NAKAO, K.; ARAI, T.; KATSUKI, M.; HEIKE, T.; YOKOTA, T. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. **The EMBO journal**, v 15, n 15, p. 4261-4269, 1999.

JARPE, M. B.; WINDMANN, C.; KNALL, C.; SCHLESINGER, T. K.; GIBSON, S.; YUJIRI, T.; FANGER, R. G.; GELFAND, E. W.; JOHNSON, G. L. Anti-apoptotic versus pro-apoptotic signal transduction: Checkpoints and stop signs along the road to death. **Oncogene**, v. 17, p. 1475-1482, 1998.

MIKLOSSY, G.; HILLIARD, T. S.; TURKSON, J. Therapeutic modulators of STAT signalling for human diseases. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 12, n. 8, p. 611-629, 2013.

MOTTA, M.; ACCORNERO, P.; TAULLI, R.; BERNABEI, P.; DESRIVIERES, S.; BARATTA, M. Leptin enhances STAT-3 phosphorylation in HC11 cell line: effect on cell differentiation and cell viability. **Molecular cell endocrinology**, v. 263, n. 1-2, p. 149-155, 2007.

NISWENDER, G. D.; JUENGEL, J. L.; SILVA, P. J.; ROLLYSON, M. K.; MCINTUSH, E. W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1-29, 2000.

OTOI, T.; YAMAMOTO, K.; KOYAMA, N.; TACHIKAWA, S.; SUZUKI, T. Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. **Theriogenology**, v. 48, n. 5, p. 769-774, 1997.

PARRISH, A. B.; FREEL, C. D.; KORNBLUTH, S. Cellular mechanism controlling caspase activation and function. **Coldspring harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 6, p. 1-25, 2013.

REBAR, R. W.; ERICKSON, G. F. 244 - Reproductive endocrinology and infertility A2 - Goldman, Lee. In: SCHAFER, A. I. (Ed.). *Goldman's Cecil Medicine* (Twenty-Fourth Edition). Philadelphia: W.B. Saunders, 2012. p.109-122.

RICHARDSON, P. M. Ciliary neurotrophic factor: a review. **Pharmacology & therapeutics**, v. 63:p. 187-198, 1994.

ROBKER, R. L.; WATSON, L. N.; ROBERTSON, S. A.; DUNNING, K. R.; MCLAUGHLIN, E. A.; RUSSELL, D. L. Identification of sites of STAT3 action in the female reproductive tract through conditional gene deletion. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. 1-9, 2014.

RUSSELL, D. L.; RICHARDS, J. S. Differentiation-dependent prolactin responsiveness and STAT (signal transducers and activators of transcription) signaling in rat ovarian cells. **Molecular endocrinology**, v. 13, n. 12, p. 2049-2064, 1999.

SCHINDLER, C.; PLUMLEE, C. Interferons pen the JAK-STAT pathway. **Seminar in cell & developmental biology**, v. 19, n. 4, p. 311-318, 2008.

SILVIA, W. J.; LEWIS, G. S.; MCCracken, J. A.; THATCHER, W. W.; WILSON, L. Jr. Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F<sub>2</sub> alpha during luteolysis in ruminants. **Biology of reproduction**, v. 45, p. 655-663, 1991.

SHUAI, K.; LIU, B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. **Nature reviews. Immunology**, v. 3, n. 11, p. 900-911, 2003.

SIDDIQUEE, K.; ZHANG, S.; GUIDA, W. C.; BLASKOVICH, M. A.; GREEDY, B.; LAWRENCE, H. R.; YIP, M. L.; JOVE, R.; MCLAUGHLIN, M. M.; LAWRENCE, N. J.; SEBTI, S. M.; TURKSON, J. Selective chemical probe inhibitor of STAT3, identified through structure-based virtual screening, induces antitumor activity. **Proceedings of the national academy of sciences U S A**, v. 104, n. 18, p. 7391-7396, 2007.

STOCCO, C.; TELLERIA, C.; GIBORI, G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. **Endocrine reviews**, v. 28; n. 1, p. 117-149, 2007.

TAKEDA, K.; NOGUCHI, K.; SHI, W.; TANAKA, T.; MATSUMOTO, M.; YOSHIDA, N.; KISHIMOTO, T.; AKIRA, S. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 94, n. 8, p. 3801-3804, 1997.

TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 9, n. 3, p. 231-241, 2008.

TIFFEN, P. G.; OMIDVAR, N.; MARQUEZ-ALMUINA, N.; CROSTON, D.; WATSON, C. J.; CLARKSON, R. W. A dual role for oncostatin M signaling in the differentiation and death of mammary epithelial cells in vivo. **Molecular endocrinology**, v. 22, n. 12, p. 2677-88, 2008.

TURKSON, J.; RYAN, D.; KIM, J. S.; ZHANG, Y.; CHEN, Z.; HAURA, E.; LAUDANO, A.; SEBTI, S.; HAMILTON, A. D.; JOVE, R. Phosphotyrosyl peptides block STAT3-mediated DNA binding activity, gene regulation, and cell transformation. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 48, p. 45443-55, 2001.

UCKUN, F.; OZER, Z.; VASSILEV, A. Bruton's tyrosine kinase prevents activation of the anti-apoptotic transcription factor STAT3 and promotes



apoptosis in neoplastic B-cells and B-cell precursors exposed to oxidative stress. **British Journal of haematology**, v. 136, n. 4, p. 574-589, 2007.

VALDEZ, K. E.; CUNEO, S. P.; TURZILLO, A. M. Regulation of apoptosis in the atresia of dominant bovine follicles of the first follicular wave following ovulation. **Reproduction**, v. 130, n. 1, p. 71-81, 2005.

VITT, U. A.; HAYASHI, M.; KLEIN, C.; HSUEH, A. J. Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. **Biology of reproduction**, v. 62, n. 2, p. 370-377, 2000.

WATANOBE, H.; YONEDA, M. A significant participation of leukemia inhibitory factor in regulating the reproductive function in rats: a novel action of the pleiotropic cytokine. **Biochemical and biophysiological research communications**, v. 282, n. 2, p. 643-646, 2001.

WAJANT, H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. **Science**, v. 296, n. 5573, p. 1635-1636, 2002.

YING, Y.; QI, X.; ZHAO, G.Q. Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP-4 and BMP-8b signaling pathways. **Proceedings of the national academy of sciences USA**, v. 98, p. 7858-62, 2001.

YUE, X., WU, L., & HU, W. (2015). The regulation of leukemia inhibitory factor. **Cancer cell & microenvironment**, v.2, n. 3, p. 872-877, 2015.

YUN, U. J.; PARK, S. E.; JO, Y. S.; KIM, J.; SHIN, D. Y. DNA damage induces the IL-6/STAT3 signaling pathway, which has anti-senescence and growth-promoting functions in human tumors. **Cancer letters**, v. 323, n. 2, p. 155-60, 2012.

ZHANG, X.; YUE, P.; FLETCHER, S.; ZHAO, W.; GUNNING, P. T.; TURKSON, J. A novel small-molecule disrupts Stat3 SH2 domain-phosphotyrosine interactions and STAT3-dependent tumor processes. **Biochemical pharmacology**, v. 79, n. 10, p. 1398-409, 2010.