



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – CAMPUS
CURITIBANOS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Avaliação do envolvimento do Sulfeto de Hidrogênio (H_2S) durante a ovulação
em camundongos

Esdras Corrêa dos Santos

Curitibanos, dezembro de 2017

ESDRAS CORRÊA DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO SULFETO DE HIDROGÊNIO (H₂S)
DURANTE A OVULAÇÃO EM CAMUNDONGOS

Monografia submetida ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de bacharel em medicina veterinária.

Orientador: Valério Valdetar Marques Portela Jr

Supervisor: Christopher Alan Price

CURITIBANOS
DEZEMBRO DE 2017

ESDRAS CORRÊA DOS SANTOS

Esta monografia, foi julgada adequada para obtenção do título de
Médica Veterinária e aprovado em sua forma final

Curitibanos, 4 de dezembro de 2017

Prof. Alexandre de Oliveira Tavela
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Valério Valdetar Marques Portela Jr
Orientador

Prof. Adriano Tony Ramos
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Marcos Henrique Barreta
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me abençoado até aqui. Aos meus amados, meu pai Eli e minha mãe Zenilda por sempre estarem comigo independente de minhas decisões e por ajudarem durante todo esse tempo possibilitando a conclusão desta etapa tão importante da minha vida. Assim como meus irmãos Ana Merabe, Elnathã e Francine pelo apoio e incentivo.

A Universidade Federal de Santa Catarina por ter oferecido a oportunidade de estudar gratuitamente em um curso de graduação de qualidade.

Aos meus orientadores Professor Valério obrigado por ter depositado em mim sua confiança. Ao professor Adriano meu primeiro orientador, canal de conhecimento, amigo e que me proporcionou diversas oportunidades. A vocês sempre terei imenso respeito e admiração.

As equipes do laboratório LAFRA em nome do Professor Marcos e do laboratório LABOPAVE em nome da professora Francielli, pelo aprendizado, oportunidade de poder ter vivenciado a rotina e trabalhar estagiando durante grande parte da graduação.

Ao governo do Canadá por proporcionar a imensa oportunidade de realizar estágio no exterior através do Programa ELAP.

Ao Professor Christopher Alan Price grande carisma e simpatia por ter aceito ser meu supervisor de estágio e da bolsa de estudo. À equipe de seu laboratório, Anthony, Lauriane, El Harbi e Morad pela boa convivência, aprendizado e trabalho em equipe.

Em nome do André Goetten o qual muito me ensinou, estendo meus agradecimentos a todos os técnicos que ajudaram de certa forma com o progresso, aprendizado e também pela boa convivência e amizade.

Aos amigos da família UFSC, Yago, Camile, Guilherme, Janyni, Carla e Samara pela amizade construída e pelo ombro amigo nas horas difíceis também.

Aos amigos que fiz durante o estágio, Rodrigo, Lauro, Selmane, Marina, Mariana, Olívia, Nicolas e Ítalo, sem vocês talvez não seria tão bom como foi.

Ao Professor Gustavo por todo o suporte durante o estágio e a confiança em mim depositada.

Aos demais amigos, colegas e familiares que contribuirão na minha formação os quais o tenho muita consideração.

RESUMO

O sulfeto de hidrogênio (H_2S) é uma molécula gasosa simples que participa como transmissor na regulação da reatividade vascular. O H_2S tem sido demonstrado não somente em muitos processos fisiológicos como promotor de vasodilatação e angiogênese, mas também em processos patológicos, em particular, as respostas inflamatórias e reparação de danos celulares. Porém poucos são estudos o relacionando com a fisiologia reprodutiva. Este trabalho teve o objetivo de avaliar através de experimentos *in vitro* (cultivo celular e ovulação) possíveis ações do H_2S na ovulação em camundongos. Para isto, foi avaliada a expressão de genes que estão relacionados a ovulação como *Areg*, *Ereg*, *Btc* e *Ptgs2*. Foi observado que o H_2S pode agir com potencializador do LH durante a ovulação *in vitro*. O NaHS (hidrossulfureto de sódio), agonista de H_2S é capaz de reverter parcialmente a ação causada pelo HA (hidroxilamina) antagonista de H_2S . Este trabalho ao mesmo tempo que traz novas descobertas, também traz novos questionamentos sobre as perspectivas dos gasotransmissores em sua ação nos diferentes tecidos. A aplicação deste modelo experimental *in vivo* é limitada.

Palavras chaves: sulfeto de hidrogênio, ovulação, camundongos.

ABSTRACT

Hydrogen sulfide (H₂S) is a simple gaseous molecule that participates as a transmitter in the regulation of vascular reactivity. H₂S has been demonstrated not only in many physiological processes as a promoter of vasodilation and angiogenesis but also in pathological processes, inflammatory responses and repair of cellular damage. But few studies are related to reproductive physiology. This work aimed to evaluate the possible actions of H₂S on ovulation in mice by in vitro experiments (cell culture and ovulation). For this, we evaluated the expression of genes that are related to ovulation as Areg, Ereg, Btc and Ptgs2. It has been observed that H₂S can act with ovulation enhancement in vitro. NaHS (sodium hydrosulfide), H₂S agonist is capable of partially re-acting the action caused by HA (hydroxylamine), H₂S antagonist. This work, while bringing new discoveries, also brings new questions about the perspectives of gasotransmitters in their action in different tissues. The application of this experimental model in vivo is limited.

Keys words: hydrogen sulfide, ovulation, mice.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	OBJETIVOS	10
2.1	Objetivo geral	10
2.2	Objetivos específicos	10
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1	Fisiologia ovariana	11
3.1.1	Ovulação	11
3.2	Gasotransmissores	12
3.2.1	Sulfeto de hidrogênio	13
4	MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1	Animais e tratamento	16
4.2	Cultivo celular	16
4.3	Ovulação in vitro	16
4.4	Extração de RNA e Real-time RT-qPCR	18
4.5	Análise estatística	19
5	RESULTADOS	20
5.1	Cultivo de celular	20
5.2	Ovulação in vitro	23
6	DISCUSSÃO	25
7	CONCLUSÃO	27
8	REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

O sulfeto de hidrogênio (H₂S) recentemente foi sugerido como "o terceiro transmissor de sinalização gasosa endógena", além do óxido nítrico (NO) e monóxido de carbono (CO) em tecidos de mamíferos (POLHEMUS e LEFER, 2014; CALVERT et al., 2010). O sulfeto de hidrogênio (H₂S) é um gás incolor, solúvel em água e inflamável com um odor desagradável (CALVERT et al., 2010).

Nos mamíferos, quatro enzimas estão envolvidas na produção endógena de sulfeto de hidrogênio do aminoácido dentre elas a L-cisteína (e, de acordo com os mais recentes estudos, da D-cisteína também) (BELTOWSKI, 2015). Também é citado na literatura a cistationina β-sintase (CBS), cistationina γ-liase (CSE) e cisteína aminotransferase (CAT) com 3-mercaptopiruvato sulfatransferase (3-MST) (LI et al., 2011).

O H₂S tem sido demonstrado não somente em muitos processos fisiológicos como promotor de vasodilatação e angiogênese (PAPAPETROPOULOS et al., 2009) mas também em processos patológicos, em particular, as respostas inflamatórias e reparação de danos celulares (LIU et al., 2016).

Em relação ao ovário poucos são os estudos publicados envolvendo a ação ou relação do H₂S nos processos fisiológicos reprodutivos. Entretanto, dentre os membros da família dos gasotransmissores o óxido nítrico vem sendo estudado desempenhando ações no processo ovulatório através da expressão de LH pelas células do cumulus quando estimuladas pela enzima oxido nítrico sintase (NOS) (ZAMBERLAM et al, 2014). Além disso o NO aumenta a expressão dos genes AREG e EREG relacionados a ovulação e também no processo de indução da ovulação através do aumento da secreção de prostaglandina no folículo pré-ovulatório (YAMAUCHI et al., 1997; ZAMBERLAM et al., 2014).

Desta forma, do campo dos estudos em biologia reprodutiva e evidências da ação de gasotransmissores no processo fisiológico reprodutivo, este trabalho

buscou trazer uma nova perspectiva dentro do processo ovulatório. Este estudo demonstra ações relacionadas aos gasotransmissores em particular o H₂S desempenhando eventos a partir da estimulação e inibição de sua ação pelo hidrosulfeto de sódio (NaHS) e a hidroxilamina (HA), respectivamente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar possíveis ações do agente oxidante sulfeto de hidrogênio (H₂S) na fisiologia ovariana e sua influência durante a ovulação através de experimentos *in-vitro* em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do agente agonista NaHS e do agente antagonista HA na expressão de genes pré ovulatórios de células da granulosa de camundongos.
- Avaliar a taxa de ovulação em folículos tratados com H₂S;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fisiologia ovariana

O ovário é um composto altamente organizado de células germinativas (oócitos ou ovos) e células somáticas (células da granulosa, células da teca e células estromais) cujas interações determinam a formação de folículos contendo oócitos, desenvolvimento de ambos, oócitos e células somáticas, ovulação e a formação do corpo lúteo (a estrutura endócrina que se forma a partir do folículo ovariano após a ovulação e extremamente importante para estabelecer e manter a gestação) (RICHARDS e PANGAS, 2010).

Após a puberdade, a hipófise anterior começa a secretar hormônio folículo-estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), em resposta à liberação de GnRH do hipotálamo e as células dormentes no ovário começam a secretar hormônios esteróides em resposta. A secreção do GnRH pelo hipotálamo normalmente ocorre através de pulsos (HOLESH e LORD, 2017).

Os pulsos de baixa frequência de GnRH estimulam um ligeiro aumento nos níveis de FSH no início do ciclo reprodutivo da fêmea, aumentando o crescimento do folículo, enquanto os pulsos de GnRH de alta frequência levam a um aumento acentuado dos níveis de LH imediatamente antes do ciclo intermediário (um evento conhecido como "pico de LH", desencadeando a ovulação e formação do corpo lúteo (RICHARDS e PANGAS, 2010).

O ovário também tem um papel fundamental nesses processos, garantindo a liberação constante de oócitos fertilizáveis e a manutenção da função das células lúteas, necessárias para a gravidez, direcionando os mecanismos de feedback ao hipotálamo e à hipófise. Por exemplo, o estrogênio produzido pelas células do folículo em desenvolvimento inibe a produção de GnRH no hipotálamo e provoca pulsos de GnRH elevados, que desencadeiam o aumento de LH no meio do ciclo que inicia a ovulação. Assim, a fertilidade depende de eventos endócrinos altamente orquestrados envolvendo múltiplos sistemas de órgãos (RICHARDS e PANGAS, 2010).

3.1.1 Ovulação

O resultado do desenvolvimento folicular, ou seja, o início de uma ou mais ovulações, é característico de cada espécie de mamífero e de cada raça

(MONNIAUX et al., 2014). No início do processo para a ovulação os níveis de estrogênio aumentam como resultado do aumento da produção de estrogênio por células hormonal mente ativas dentro do folículo. Quando os níveis de estrogênio atingem um ponto crítico em que o estrogênio começa a exercer feedback positivo sobre o hipotálamo e a hipófise, levando a um aumento de LH.

O processo ovulatório é iniciado por uma onda de LH que atua sobre receptores LH presentes na superfície de células granulosas foliculares. Isso leva à ativação de enzimas proteolíticas que causam a liberação de proteínas de membrana epiregulina (EREG) e anfiregulina (AREG), que são membros da família do fator de crescimento epidérmico (EGF). Essas proteínas ativam o receptor de EGF em células de granulosa e cumulus, via proteína quinase ativada por amitogênio, para estimular a expressão de prostaglandina-endoperoxido sintase 2 (PTGS2, também conhecida como COX2), bem como AREG e EREG (SHIMADA et al., 2006). A enzima PTGS2 é a chave para a produção de prostaglandinas a partir de ácido araquidônico. As prostaglandinas são importantes para regular a expressão/atividade de proteases, como o fator ativador de plasminogênio que degradam a parede do folículo e resultam em ruptura do folículo (LI et al., 2006).

O aumento também provoca a luteinização de células da granulosa que aumenta os níveis de progesterona e começa o desenvolvimento do corpo lúteo. Uma vez que o oócito é liberado, é captado pelas fimbrias do oviduto. O oócito permanece na metafase da meiose II. Somente completando a meiose II após a fertilização (HOLESH e LORD, 2017).

3.2 Gasotransmissores

O óxido nítrico (NO), o monóxido de carbono (CO) e o sulfeto de hidrogênio (H₂S) são muitas vezes agrupados como uma família de moléculas de sinalização chamadas gasotransmissores. O termo "gasotransmissor" é agora considerado um pouco enganador, pois as moléculas são gases na temperatura e pressão padrão (0 °C e 100 000 Pa), mas atuam como solutos no ambiente aquoso dos fluidos intracelulares e extracelulares (FEELISCH e OLSON, 2013).

Antes de seu papel biológico ser descoberto, nos últimos tempos, esses gases foram sempre associados como subprodutos da industrialização e

considerados importantes poluentes. Todos são tóxicos para seres humanos em altas concentrações, entretanto em baixas concentrações funcionam como moléculas de sinalização importantes em sistemas biológicos (DONALD, 2016). O conceito geral de gases como moléculas de sinalização biológica começou quando finalmente foi demonstrado em 1987 que o NO era o fator lábil liberado do endotélio vascular de mamíferos para mediar a vasodilatação induzida por acetilcolina, mostrando pela primeira vez que um gás era uma molécula de sinalização produzida endogenamente em sistemas biológicos (PALMER, FERRIGE e MONCADA, 1987).

Essa descoberta levou Robert Furchgott, Louis Ignarro e Ferid Murad a receber o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina de 1998. Em meados da década de 1990, descobriu-se que o CO era uma molécula de sinalização envolvida na neurotransmissão e, em seguida, propôs-se na virada do século que o H₂S também era um gasotransmissor produzido de forma endógena e um regulador da função neuronal (FEELISCH e OLSON, 2013).

Existem muitas semelhanças entre H₂S, monóxido de carbono, e óxido nítrico. Enzimas para a síntese destes três gasotransmissores foram identificados e outras mais vem sendo estudas, pelo menos no caso de H₂S (SHIBUYA et al., 2009). Os três mediadores possuem meia-vida muito curta *in vivo* e produzem principalmente efeitos benéficos nas concentrações fisiológicas, porém causando lesões nas concentrações superfisiológicas. Ambos os três mediadores se ligam à hemoglobina (SEARCY e LEE, 1998; WANG, 2002) e podem influenciar na atividade e/ou expressão de enzimas responsáveis pela síntese de outros mediadores gasosos (HOSOKI, MATSUKI e KIMURA, 1997; ZHAO e WANG, 2002).

A pesquisa sobre o papel biológico dos gasotransmissores tem crescido rapidamente e atualmente não somente são reconhecidos como moléculas de sinalização clássicas, mas também com função regulatória do metabolismo celular através de interações químicas complexas entre si (incluindo metabólitos) e proteínas alvo (KAJIMURA, NAKANISHI e TAKENOUCI, 2012).

3.2.1 Sulfeto de hidrogênio

O sulfeto de hidrogênio (H₂S) é uma molécula gasosa simples que participa como transmissor na regulação da reatividade vascular

(CACANYIOVA, BERENYIOVA e. KRISTEK, 2016). O sulfeto de hidrogênio é uma molécula de sinalização biológica que é produzida por diversos organismos desde bactérias até mamíferos. Uma vez que também é tóxico em altas concentrações, existem estratégias para sua remoção eficiente e consequente manutenção de níveis baixos em estado estacionário nos mamíferos. As enzimas na cadeia metabólica do enxofre responsável pela biogênese de H₂S incluem as enzimas catimétricas de cistatinaína β-sintase e γ-cistoatiase da via de transsulfuração, além de mercaptopiruvato sulfatransferase que é tanto mitocondrial quanto citoplasmática (MOTL, YADAV e BANERJEE, 2013).

Os precursores para o H₂S são os aminoácidos cisteína e homocisteína e derivados de acetona como exemplo o mercaptopiruvato. O H₂S é liberado através de uma via de oxidação sulfito mitocondrial que começa com sulfureto quinona oxidoreductase e inclui uma persulfida dioxigenase, rhodanese e sulfito oxidase. Os principais produtos de oxidação do H₂S são o tiosulfeto e o sulfeto (MOTL, YADAV e BANERJEE, 2013).

Agonista

Os doadores de H₂S comumente utilizados incluem os sais inorgânicos de sulfeto de sódio (Na₂S) e hidrossulfeto de sódio (NaHS) que causam um pico transitório na concentração de H₂S quando dissolvido. Os doadores de liberação lenta já foram sintetizados, incluindo inúmeras moléculas solúveis em água, tais como GYY4137 e complexos de anidrato de tritona hidróxido (ADT-OH). Os compostos que ocorrem naturalmente são doadores de H₂S úteis, incluindo dissulfureto de dialilo e trissulfureto de dialilo do alho, e sulforafano do brócolis (OSLON, 2011; WANG, 2012). Os análogos de cisteína aplicados, como a S-propil cisteína, e outras moléculas de sulfonação como o 3-mercaptopiruvato, têm um efeito estimulador na produção endógena de H₂S (WANG, 2012).

Antagonista

Os inibidores primários disponíveis para realizar pesquisas sobre H₂S são os inibidores para as enzimas cistationina β-sintase (CBS), cistationina γ-liasase (CSE), D, L-propargilglicina (IC₅₀ 40 μM), β-cianoalanina (IC₅₀ 14 μM) e L-aminoetoxivinilglicina (IC₅₀ 1,0 μM) são inibidores específicos do CSE. O ácido aminoacético tem uma seletividade 8,5 vezes maior para CSE sobre CBS

(IC₅₀ 1 versus 8,5). A hidroxilamina (HA) é um inibidor geral das enzimas piridoxil 50-fosfato-dependentes e tem uma seletividade 57 vezes maior para CSE que sobre CBS (IC₅₀ 4,8 vs. 278). Trifluoroalanina tem uma IC₅₀ quatro vezes maior para CBS do que para CSE (IC₅₀ 66 vs. 289) (ASIMAKOPOULOU et al., 2013). A 3-MST é inibida por α -cetoácidos dentre eles: ácido pirúvico (IC₅₀ 13 mM), α -cetobutirato (IC₅₀ 14 mM) e α -cetogluturato (IC₅₀ 10 mM) (PORTER e BASKIN, 1996).

Ações e mecanismos

O H₂S também exibe papéis complexos na inflamação (LIU et al., 2016). Os trabalhos ao longo da última década mostraram que este gás pode ser um agente pró-inflamatório, anti-inflamatório e/ou pode promover a resolução de uma resposta inflamatória em curso. O efeito preciso depende de uma gama de fatores, ainda não compreendidos, como o estágio da doença e a concentração e localização celular do gás. O H₂S é sintetizado por uma ampla gama de células inflamatórias e afeta múltiplos processos biológicos envolvidos no início, manutenção e resolução da inflamação. Estes incluem a dilatação dos vasos sanguíneos, adesão, migração e sobrevivência de leucócitos, edema e dor e hiperalgesia. Além disso, o H₂S ajuda a regular a liberação e os efeitos de vários outros mediadores inflamatórios (PAPAPETROPOULOS et al., 2009). As drogas que visam o sistema H₂S podem fornecer uma nova abordagem para o tratamento da inflamação (LI, MOHAMED E MOORE, 2013).

Além disso, o H₂S também tem sido relacionado como uma ação terapêutica. As primeiras descrições dos efeitos fisiológicos do sulfeto de hidrogênio (H₂S) foram publicadas em meados da década de 1990, mas os benefícios terapêuticos deste mediador gasoso foram apreciados durante séculos, através do banho em fontes termais contendo sulfetos e pelo consumo de alimentos que podem liberar H₂S, como o alho (HOSOKI, MATSUKI e KIMURA, 1997; LI, MOHAMED E MOORE, 2013).

Na última década, com o aumento acentuado do fomento e aumento de dados sobre as características e a contribuição do H₂S para muitos processos fisiológicos e fisiopatológicos, têm sido feitos esforços para explorar essa substância endógena como um fármaco em potencial (FLANNIGAN e WALLACE, 2013).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e tratamento

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos C57B/6 w-t criados e reproduzidos no biotério experimental da Université de Montréal com alimentação e água ad-libitum e 12 horas de luz diurna. Para a realização dos experimentos de cultivo de células da granulosa e cultivo de folículos foram usados camundongos de idade em torno de 23 a 28 dias de vida precedidos de injeção 48 h de eCG (5 IU i.p., Folligon, Intervet, Kirkland QC).

4.2 Cultivo celular

Os ovários foram colocados em placas petri 35 mm com meio de cultura DMEM / F12 e perfurados com agulhas de calibre 26G para liberação das células que em seguida foram suspensas em meio de cultura DMEM / F12 contendo 5% de soro de bovino fetal descomplementado (FBS). As células de granulosa foram cultivadas em placas de 24 poços com uma densidade de 1×10^6 células viáveis/ml/poço e incubadas durante 2 h a 37 ° C com atmosfera controlada contendo 5% de CO₂. O meio de cultura foi então substituído por meio isento de soro durante 3 h antes da adição de LH ovina. O papel do H₂S na ovulação foi determinado pelo pré-tratamento das células com o antagonista de CTH HA e / ou com o agonista de H₂S, NaHS, 3 horas antes do tratamento com LH. O pico de LH para a indução da ovulação e a luteinização das células da granulosa foram imitados pela adição de 10 ng/ml de LH (NIDDK) durante 15 minutos para análises de fosforilação de proteínas e 2 h para análise de expressão gênica.

4.3 Ovulação *in vitro*

Fêmeas de 25 a 28 dias de C57B/6 w-t não injetadas com eCG (5 IU i.p., Folligon) foram eutanasiadas usando CO₂. Os folículos antrais ($\geq 300 \mu\text{m}$ de diâmetro) foram isolados em estereoscópio em 3 ml de meio MEM α não suplementado, utilizando-se de pinças de pequeno calibre e agulhas de seringa 30-gauges Figura 2). Aproximadamente 10 a 20 folículos foram obtidos por camundongo, com variação de tamanho entre 300 e 270 μm de diâmetro.

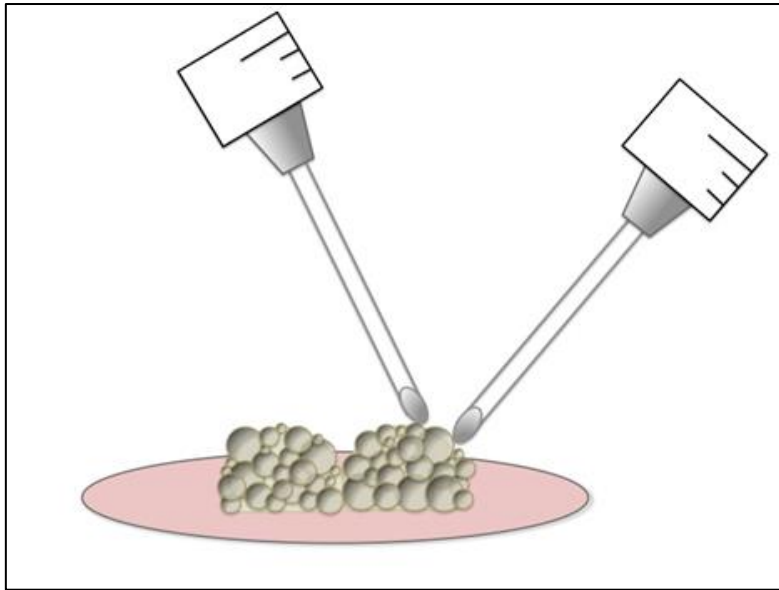


Figura 2 – Esquema demonstrativo da dissecção de folículos camundongos. Fonte: Mehlmann (2005) adaptado por: V. Roussel.

Os folículos foram cultivados em gotas de 2 μ l sobre uma tela MilliCelli, posicionada em uma placa petri 35 mm com 2 ml de meio de cultura (Figura 3). O meio de cultura utilizado foi MEM α com sais de Earle, L-glutamina, 10 000 UI/ml de penicilina G (potássica), 10 000 μ g/ml de sulfato de estreptomicina, insulina (1 mg/ml), transferrina (0,55 mg/ml), selênio (0,5 μ g/ml), suplementados com 5% de FBS. Os folículos também foram tratados com FSH ovino (30 ng/ml) (NIDDK) e mantidos em atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de ar por 24 horas. Após esta pré-cultura, foi avaliada a qualidade dos folículos pela observação da presença de vesícula germinal (GV) no oócito, folículos com oócito central, homogênea camada de células da granulosa e folículos não rompidos.

Os folículos ruins, com excesso de restos de outros folículos agregados, rompidos ou com dois oócitos, foram removidos e a tela MilliCelli com os folículos bons foram colocadas em uma nova placa Petri contendo novo meio de cultura MEM α complementado e pré-tratada por 3 horas com HA a 10 mM. Após o pré-tratamento com HA, adicionou-se LH de ovino a 10 μ g/ml ao meio de cultura para induzir a ovulação in vitro dos folículos. As ovulações foram avaliadas ao microscópio 12 horas após o tratamento com LH. Boas ovulações, apresentando decomposição da vesícula germinal (VG) nos oócitos, expulsão do oócito para fora do folículo e expansão do cúmulos foram consideradas.

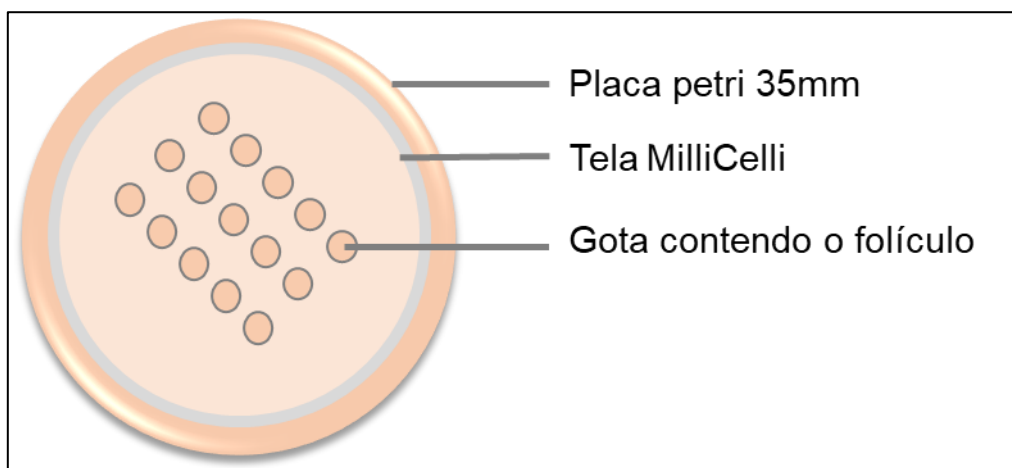


Figura 3 - Representação gráfica de uma situação de cultura de folículos.

4.4 Extração de RNA e Real-time RT-qPCR

As células da granulosa foram lavadas com PBS e lisadas com 100µl/amostra com RNA lysis buffer. RNA total foi extraído usando PureLink RNA mini extraction kit de acordo com as orientações do fabricante (12183025, Ambion by life Technologies).

As transcrições reversas foram feitas sob 200 ng de RNA com SuperScript Vilo cDNA synthesis Kit (Thermo Scientific-Invitrogen, Carlsbad CA). Real-Time PCR foram realizadas com 10 µl SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Mississauga ON), 6 µl de cDNA, 10 mol primers (1,5µl) e 1 µl de água em um termociclador CFX96 Touch thermocycler (Bio-Rad).

Tabela 1 – Informação sobre os primers utilizados

Gene	Número de Acesso	Primer Forward	Primer Reverse
<i>Rpl19</i>	XM_006532610.3	CTGAAGGTCAAAGGGAATGTG	GAGATCATCAAGACTCTGTCC
<i>Hprt</i>	J00423.1	ATGATCAGTCAACGGGGGAC	TGCTGGTGAAAAGGACCTCTC
<i>B2m</i>	NM_009735.3	GACCGGCCTGTATGCTATCC	CCACCCGCCTCACATTGAAA
<i>Cth</i>	NM_145953.2	GGCTGAGCTTCCAGCAATCAT	TCTAGGCCACAGAAAGTCG
<i>Areg</i>	NM_009704.4	CTCGCAGCTATTGGCATCGGCA	TTGCATGCACAGTCCCGTTT
<i>Ereg</i>	NM_007950.2	ACGTTGCGTTTACAGTGATTCTCAT	GGTCCCCTGAGGTCACTCTCTCAT
<i>Btc</i>	NM_007568.5	CTTGCCCTGGGTCTTGCAAT	GAGGGAGTTTGCTCGTCCAC
<i>Egr1</i>	NM_007913.5	CCTTCAATCCTCAAGGGGAGCCGA	AGGTGATGGGAGGCAACCGAGT
<i>Ptgs2</i>	AF378830.1	TCCCCTTCCTGCGAAGTTTA	TAGAAGAACCTTTTCCAGCACTTC

Informações sobre os primers estão contidas na Tabela 1. Foram utilizados parâmetros de ciclagem térmica comuns (3 min a 95°C, 40 ciclos de 15s a 95°C, 30s a 60°C e 30s a 72°C) para amplificar cada transcrição. Foram realizadas análises das curvas de dissociação para verificar a identidade do produto. As amostras foram executadas em duplicata, e foram expressas em relação a Rpl19, Hprt e B2M como housekeeping genes. O limite de ciclo (Ct) dos genes alvo foi comparado com o da média geométrica Rpl19, Hprt e B2m como um gene de referência interna (Ref), de acordo com a razão $R = [E_{Ref}^{Ct(Ref)} / E_{target}^{Ct(target)}]$.

4.5 Análise estatística

Todos os experimentos foram replicados 3 ou 4 vezes de forma independente, onde cada experimento utilizou ovários coletados em diferentes momentos. Os dados que não seguiram uma distribuição normal (teste Shapiro-Wilk) foram transformados em logaritmos. A análise dos dados foi realizada com o software GraphPad Prism 6 de forma aleatoriamente variável. Os tratamentos foram comparados aos controles com One-Way ANOVA com o teste de comparações múltiplas de Tukey, ou com teste ANOVA One-Way pairwise de comparação múltipla de Dunnett quando apropriado. O número de oócitos liberados em resposta ao eCG in vivo foi analisado pelo teste t pareado. Os dados são apresentados como médias \pm SEM.

5 RESULTADOS

5.1 Cultivo de celular

No primeiro experimento (Figura 4) os genes *Areg*, *Btc*, *Ereg* apresentaram resultados semelhantes. Grupo controle sem nenhum tratamento somente meio de cultura, apresentou a menor expressão. A segunda menor expressão para os mesmos genes se deu para o tratamento isolado com NaHS 1 mM.

A comparação dos tratamentos com LH isolados, a dose de LH 50 ng/ml obteve maior expressão nos três genes *Areg*, *Btc* e *Ereg* do que a dose de LH 5 ng/ml. A mesma condição pode ser observada no tratamento LH + NaHS, quando LH na dose 5 ng/ml + NaHS 1 mM a expressão para os três genes (*Areg*, *Btc* e *Ereg*) é menor que a dose 50 ng/ml + NaHS 1 mM (Figura 4).

Entretanto, quando comparado o tratamento isolado de LH e o tratamento de LH + NaHS, a expressão dos genes (*Areg*, *Btc* e *Ereg*) é menor quando LH é aplicado isoladamente, de modo geral, as maiores expressões para estes genes em ambas as doses de LH, foram nos tratamentos feitos com LH + NaHS (Figura 4). Adicionalmente o tratamento com maior expressão dos genes *Areg*, *Btc* e *Ereg* foi no tratamento LH 50 ng/ml + NaHS, sendo a maior dose de LH junto a adição de NaHS (Figura 4). Para os genes *Egr1* e *Ptgs2* (Figura 4) os testes estatísticos revelaram que não houve diferenças estatisticamente significativas.

Para o segundo experimento (Figura 5) os tratamentos com LH isoladamente mostraram a maior expressão relativa para os genes *Areg*, *Btc* e *Ereg*. No tratamento com o inibidor da síntese de H₂S, a hidroxilamina na dose de 10 mM + LH 10 ng/ml, observou-se a menor expressão para os três genes (*Areg*, *Btc* e *Ereg*) (Figura 5). Quando as células foram tratadas com LH 10 ng/ml + HA 10 mM + NaHS 1mM apresentou um aumento da expressão dos genes *Areg*, *Btc* e *Ereg* em comparação ao tratamento LH 10 ng/ml + HA 10 mM, mas, menor em relação ao tratamento isolado com LH 10 ng/ml (Figura 5).

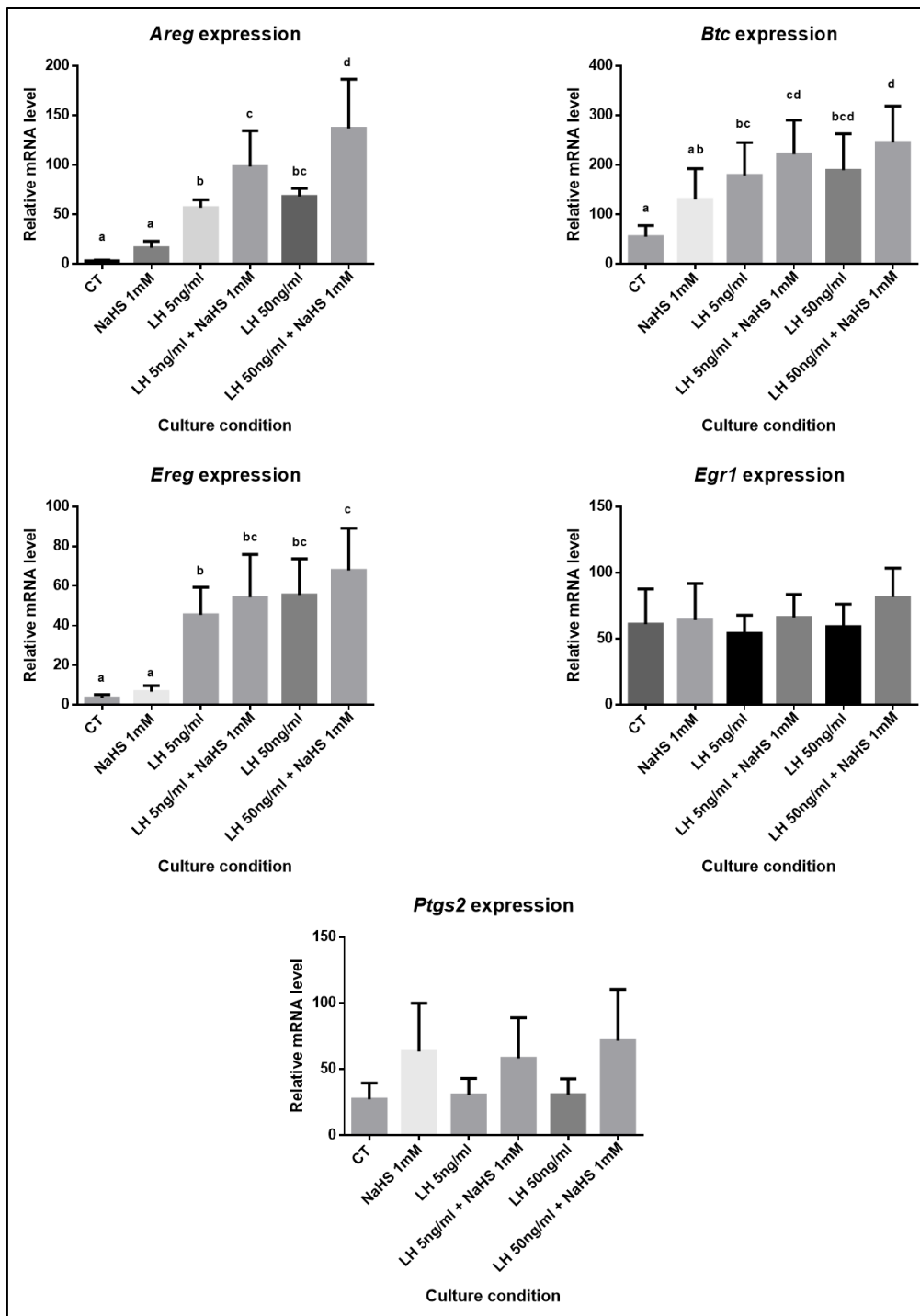


Figura 4 - Expressão de genes pelas células da granulosa de camundongos sob condições de tratamento com NaHS e LH. As células da granulosa obtidas dos ovários de camundongos foram cultivadas durante 2 horas com meio suplementado com FBS, e mais 2 horas com meio de cultura sem FBS (período *starvation*) antes da estimulação. Após isto as células foram então estimuladas durante 2 horas com ou sem LH em doses 5 e 50 ng/ml e com ou sem NaHS em dose de 1 mM. A expressão de genes foi medida por transcrição reversa e qPCR usando Rpl19, B2m e Hprt como genes de referência. Os níveis relativos de mRNA dos genes Areg, Btc, Ereg, Egr1 e Cox2 foram analisados estatisticamente pelo teste estatístico ANOVA One-Way e o teste de comparações múltiplas de Tukey, podendo assim comparar todas as condições de cultura entre eles. Número de repetições = 5. Os resultados significativos ($p \leq 0.01$) são indicados com letras diferentes (a, b, c e d).

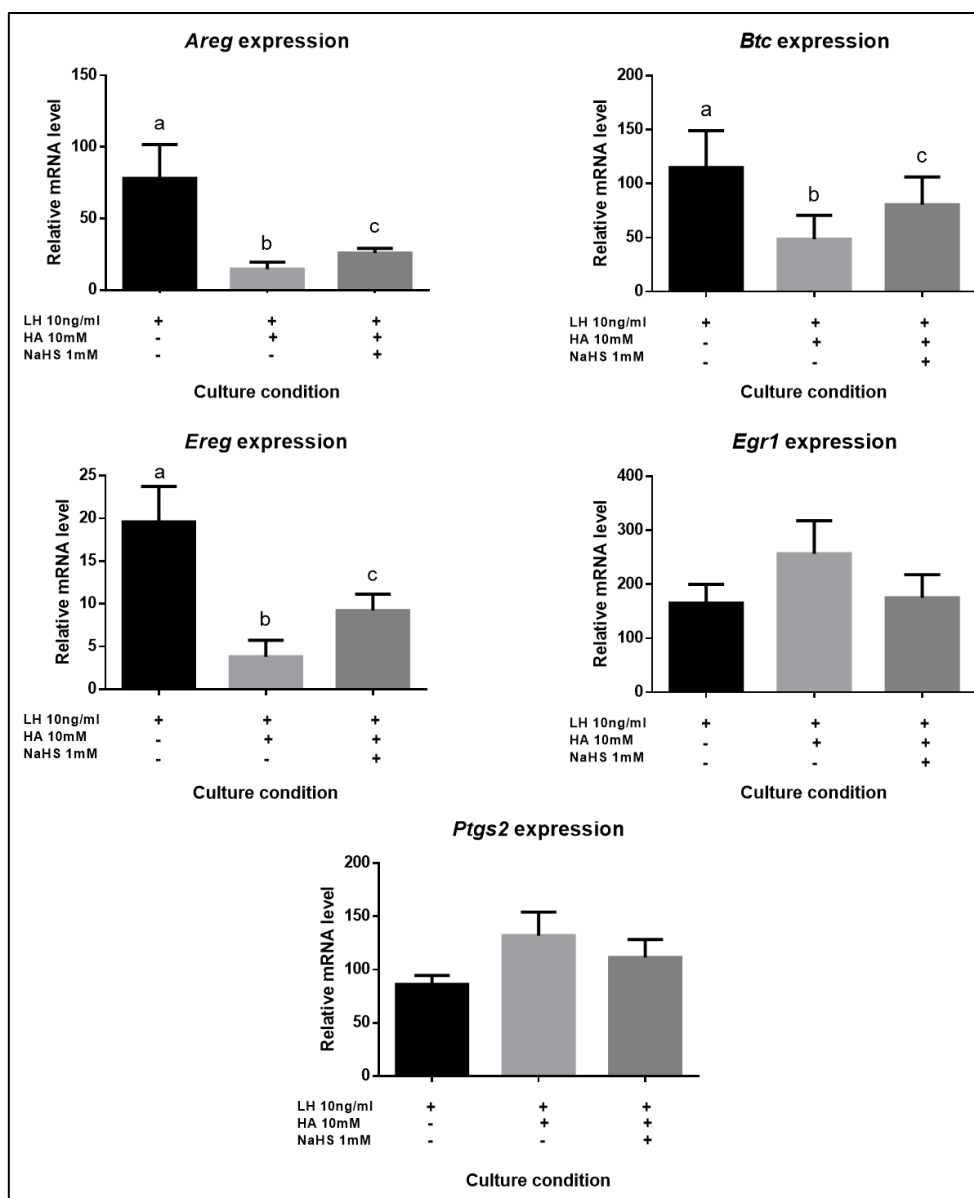


Figura 5. Efeito na expressão de genes em células da granulosas tratadas com NaHS, HÁ e LH. As células da granulosas obtidas dos ovários de camundongos foram cultivadas durante 2 horas com meio suplementado com FBS, e mais 2 horas com meio de cultura sem FBS (período *starvation*) antes da estimulação. As células foram pré-tratadas durante 2 horas com ou sem HA a 10 mM durante o período de *starvation*. O meio de cultura foi então alterado e as células foram estimuladas durante 2 horas com LH a 10 ng / ml e com ou sem NaHS a 1 mM. A expressão de genes foi medida por transcrição reversa e qPCR usando Rpl19, B2m e Hprt como genes de referência. Os níveis relativos de mRNA dos genes Areg, Btc, Ereg, Egr1 e Cox2 foram analisados pelo teste estatístico ANOVA One-Way e o teste de comparações múltiplas de Tukey, podendo assim comparar todas as condições de cultura entre eles. Número de repetições = 4. Os resultados significativos ($p \leq 0.01$) são indicados com letras diferentes (a, b e c).

Nas condições de tratamento LH 10 ng/ml, LH 10 ng/ml + HA 10 mM e LH 10 ng/ml + HA 10 mM + NaHS 1mM, os genes Egr1 e COX2 (Figura 5) em relação estatística tiveram resultados semelhantes aos da primeira condição de

tratamentos (Figura 4), apresentando somente tendências sem relação estatística significativa.

5.2 Ovulação *in vitro*

No experimento realizado com cultivo de folículos *in vitro* observou-se que o tratamento com LH 10 ng/ml obteve maiores taxas de ovulação (26,98%) (Figura 6). Quando os folículos foram tratados com o inibidor da síntese da enzima produtoras de H₂S no tratamento LH 10 ng/ml + HA 10 mM não houve ovulação (0%) (Figura 6). Na última condição LH 10 ng/ml + HA 10mM + NaHS 5 mM foi obtido uma taxa de ovulação de 11,52% (Tabela 1) sendo menor que quando tratado isoladamente com LH 10 ng/ml, demonstrando reversão parcial do efeito inibitório do HA.

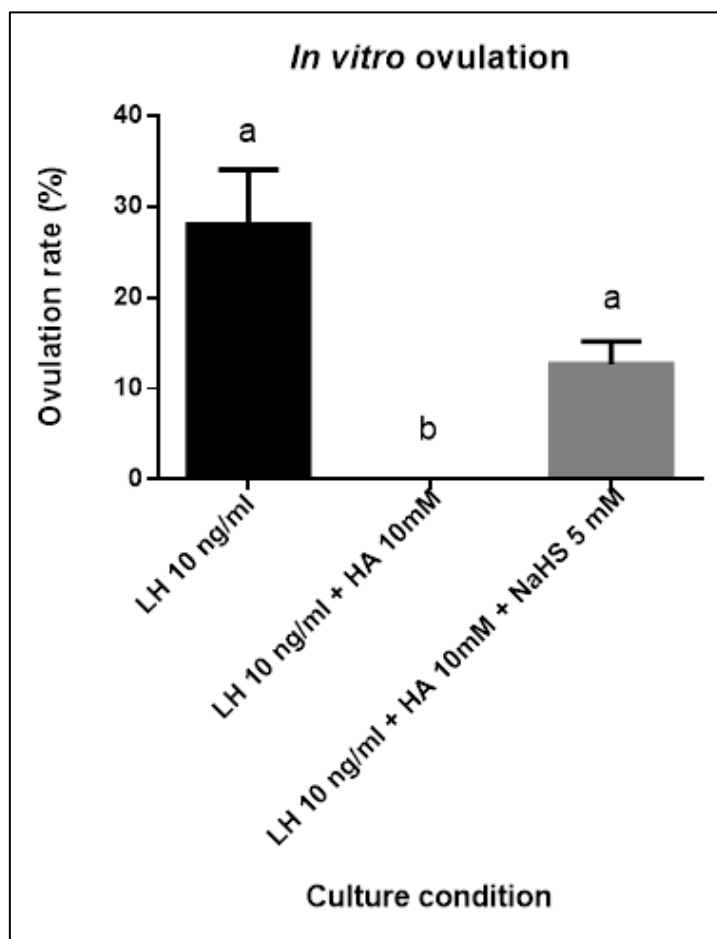


Figura 6. Efeito na ovulação *in vitro* de folículos antrais de camundongos tratados com NaHS. Os folículos com diâmetro $\geq 300 \mu\text{m}$ foram recuperados por microdissecção de ovários de camundongos C58Bl6 de 26-28 dias e cultivados *in vitro* durante 24 horas em meio de cultura MEM α com 30 ng/ml de FSH de ovino. Após 24 horas, os folículos atresicos ou deformados foram removidos. O meio de cultura foi então alterado e os folículos saudáveis foram/ou não pré-tratados durante 3 horas com FSH a 30 ng/ml e HA a 10 mM. Após 3 horas, o meio de cultura foi novamente alterado e os folículos foram estimulados durante 12 horas com FSH a 30 ng/ml e LH a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para induzir a ovulação. A porcentagem de ovulação foi determinada contando os folículos ovulados sob

microscópio e calculando a relação entre folículos ovulados e não ovulados. Os resultados foram analisados pelo teste estatístico ANOVA One-Way e o teste de comparações múltiplas de Tukey, podendo assim comparar todas as condições de cultura entre eles. Número de repetições = 3. Os resultados significativos ($p \leq 0.01$) são indicados com letras diferentes (a, b e c).

Tabela 1. Porcentagem de ovulações nos respectivos tratamentos.

Réplica	LH 10ng/ml	LH 10ng/ml + HA 10mM	LH 10ng/ml + HA 10mM + NaHS 5mM
1	35,72%(5/14)	0%(0/16)	6,25%(1/16)
2	21,42%(3/14)	0%(0/14)	14,3%(2/14)
3	23,80%(5/21)	0%(0/21)	14%(3/22)
Média	26,98%(13/49)	0,00%(0/42)	11,52%(5/42)

%(nº de folículos ovulados/nº total de folículos no tratamento)

6 DISCUSSÃO

A ação isolada de NaHS como estimulador da produção de H₂S não substitui a ação do LH na ovulação, processo esse complexo, induzido pelo pico pré-ovulatório de LH, durante o qual a meiose do oócito é retomada, a expansão do cumulus, a ruptura do polo apical do folículo, a liberação do oócito ao oviduto e a formação do corpo lúteo a partir de células somáticas do folículo ovulatório (MONNIAUX et al., 2014).

Nas condições de tratamento o NaHS demonstrou ser um potencializador do LH, aumentando a expressão dos genes-chave para o processo ovulatório (Areg, Ereg e Btc). Isso demonstra um possível papel do H₂S durante o processo ovulatório. Areg, Ereg e Btc pertencem à família de fatores de crescimento semelhantes ao EGF sintetizados como precursores de membrana integral (HSIEH et al., 2007) e são responsáveis também por induzirem a expressão de Ptgs2 (prostaglandina sintase-2 ou ciclooxigenase-2 [COX2]), Tnfaip6 (proteína induzida por alfa de tumor de necrose tumoral [Tnfaip6]) e Has2 (hyaluronan synthase 2 [HAS2]), genes que são necessários para síntese e estabilização da matriz extracelular e também estimuladores potentes da expansão das células do cumulus (HSIEH et al., 2007).

Ptgs2 e Egr1 obtiveram baixa expressão, este fato pode estar relacionado com a indução do LH da expressão rápida e transitória de Areg, Ereg e Btc (codificando amfiiregulina (AREG), epiiregulina (EREG) e betacelulina (BTC)) respectivamente) em células da granulosa em camundongos (PARK et al., 2004). Neste caso o que poderia ser feito é aumentar o tempo de tratamento e verificar a expressão de Ptgs2 novamente.

Os experimentos com cultivos de células e de folículos sugerem um efeito inibitório do HA sobre a ação do LH na ovulação e uma possível reversão do efeito inibitório da HA pela NaHS. Este fato pode ser importante futuramente, devido o interesse farmacológico relacionado ao H₂S. Um dos primeiros trabalhos publicados sobre as características farmacológicas e possivelmente as mais importantes avaliou a ação anti-inflamatória do H₂S, descrevendo a capacidade desta molécula na inibição da adesão de leucócitos ao endotélio vascular (ZANARDO et al., 2006).

O estudo no aspecto patológico também pode ser explorado já que uma das causas mais comuns da infertilidade feminina nos Estados Unidos é a disfunção ovulatória, na qual, uma variedade de fatores hormonais interfere na sequência complexa de eventos necessários para desencadear a ovulação. Problemas podem ocorrer em qualquer ponto desta via (hipotálamo, pituitária, ovário) e podem levar à falhas na ovulação. A causa mais comum de disfunção ovulatória crônica nos Estados Unidos é a Síndrome Ovariana Policística, ou SOP, que interfere com a ovulação em múltiplos pontos (HOLESH e LORD, 2017). E se o H₂S, como demonstrado neste trabalho, participa de alguma forma do processo ovulatório poderá oferecer novas perspectivas neste campo de pesquisa.

Um dos maiores limites para este é a realização de testes *in vivo*, já que as condições *in vitro* podem não refletir os reais efeitos que o H₂S pode ter quando aplicado *in vivo* neste caso em destaque a relação do efeito tóxico desta molécula.

Em suma, sabe-se que o H₂S está envolvido no controle de uma vasta gama de funções fisiológicas (BUCCI et al., 2012), incluindo a regulação dos sistemas cardiovascular, nervoso, gastrointestinal, excretório, imunológico (BUCCI et al., 2012) e com o presente trabalho sistema reprodutor também. Todavia, fica o questionamento dos efeitos que H₂S possui na fisiologia reprodutiva em outras espécies, ou até mesmo sua relação com o surgimento de patologias ovarianas relacionadas a ovulação.

Outrossim, sabe-se que a expressão elevada de ER α , descrita em células de granulosa e teca de folículos císticos, concomitante com uma diminuição na expressão de ER β em bovinos (SALVETTI et al., 2007; ALFARO et al., 2011), ratos (SALVETTI et al., 2009) e humanos (WALTERS, ALLAN e HANDELSMAN, 2008). Porém, nenhum estudo relaciona esta patologia com genes relacionados as enzimas produtoras H₂S ou até mesmo, NO, outro gasotransmissor envolvido na ovulação agindo principalmente ao aumentar a secreção de prostaglandina e os níveis de mRNA de PTGS2 no folículo pré-ovulatório (YAMAUCHI et al., 1997; ZAMBERLAM et al., 2014).

7 CONCLUSÃO

Os gasotransmissores tem cada vez mais sido descritos presentes em processos metabólicos em diversos tecidos. Com este trabalho o estudo realizado sobre o efeito do H₂S, um dos agentes oxidantes da família dos gasotransmissores, relata novas descobertas sobre eventos fisiológicos já bem estabelecidos no campo de investigação como a ovulação. Porém, trazendo novas perspectivas e questionamentos a serem investigados.

O H₂S mostrou um efeito bastante marcante referente a uma possível potencialização do efeito de LH. Além disso, quando foram aplicados os agentes estimulantes (NaHS) e inibitórios (HA), o fator estimulante obteve um efeito aparentemente reversor do efeito inibitório.

A continuação *in vivo* deste projeto pode ser considerada de difícil aplicabilidade já que os tratamentos envolveram a exposição temporária de agentes. Podem ser realizados estudos dos fármacos disponíveis para a avaliação do mecanismo de ação e tempo de meia vida para testar aplicabilidade em possível experimento futuro.

8 REFERÊNCIAS

ALFARO, N.S.; SALVETTI, N.R.; VELAZQUEZ, M.M.; STANGAFERRO, M.L.; REY, F.; ORTEGA, H.H. Steroid receptor mRNA expression in the ovarian follicles of cows with cystic ovarian disease. **Res Vet Sci**. 2011.

ASIMAKOPOULOU, A.; PANOPOULOS, P.; CHASAPIS, C.T.; COLETTA, C.; ZHOU, Z.; CIRINO, G.; GIANNIS, A.; SZABO, C.; SPYROULIAS, G.A.; PAPAPETROPOULOS, A. Selectivity of commonly used pharmacological inhibitors for cystathionine beta synthase (CBS) and cystathionine gamma lyase (CSE). **Br J Pharmacol**. 2013.

BELTOWSKI, J. Hydrogen sulfide in pharmacology and medicine—An update. **Pharmacol. Rep.** 67, 2015.

BUCCI, M.; PAPAPETROPOULOS, A.; VELLECCO, V. et al. cGMP-dependent protein kinase contributes to hydrogen sulfide-stimulated vasorelaxation. **PLoS One**. 2012

CACANYIOVA, S.; BERENYIOVA, A.; KRISTEK, F. The Role of Hydrogen Sulphide in Blood Pressure Regulation. *Physiol. Res.* 65 (Suppl. 3): S273-S289, 2016.

CALVERT, J.W.; COETZEE, W.A.; LEFER, D.J. Novel insights into hydrogen sulfide-mediated cytoprotection. **Antioxid. Redox Signal** 12 (10), 2010.

DONALD, J.A. Gasotransmitter Family *In*: TAKEI, Y.; ANDO, H.; TSUTSUI, K. **Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research**, Academic Press is an imprint of Elsevier, 2016.

FEELISCH, M.; OLSON, K. Embracing sulfide and CO to understand nitric oxide biology. **Nitric Oxide**. 2013.

FLANNIGAN, K.L. E WALLACE, J.L. Hydrogen Sulfide: Its Production, Release, and Functions: Therapeutic Applications of Hydrogen Sulfide *In*: KIMURA, H. **Hydrogen Sulfide and its Therapeutic Applications**, Springer-Verlag Wien 2013.

HI, J.; MIYAZAKI, T.; IWASAKI, S.; KISHI, I.; KUROSHIMA, M.; TEI, C.; YOSHIMURA, Y. Effects of nitric oxide on ovulation and ovarian steroidogenesis and prostaglandin production in the rabbit. **Endocrinology**, 1997.

HOLESH, J.E.; LORD, M. Physiology, Ovulation. StatPearls [Internet]. LastAtualizado: October 6, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441996/> Acessado dia 10/11/2017.

HOSOKI, R.; MATSUKI, N.; KIMURA, H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. **Biochem Biophys Res Commun** 237: 527–531, 1997.

HSIEH, M.; LEE, D.; PANIGONE, S.; HORNER, K; CHEN, R. THEOLOGIS, A.; LEE, D.C.; THREADGILL, D;W; CONTI, M. Luteinizing hormone-dependent activation of the epidermal growth factor network is essential for ovulation. **Mol Cell Biol**. 2007

KAJIMURA, M.; NAKANISHI, T.; TAKENOUCI, T. Mechanisms of nitrite bioactivation. **Respir Physiol Neurobiol**. 2012.

- LI, L.; MOHAMED, M.S.B.; MOORE, P.K. Multiple Roles of H₂S in Inflammation: A New Class of Therapeutics? In: KIMURA, H. **Hydrogen Sulfide and its Therapeutic Applications**, Springer-Verlag Wien 2013.
- LI, L.; ROSE, P.; MOORE, P.K. Hydrogen sulfide and cell signaling, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **51**, 2011.
- LI, Q.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; KOBAYASHI, Y.; IRELAND, J.J.; SMITH, G.W. Effect of Intra follicular in domethacin injection on gonadotropin surge-induced expression of select extra cellular matrix degrading enzymes and their inhibitors in bovine pre ovulatory follicles. *Reproduction* 131:533–543; 2006.
- LIU, W.; XU, C.; YOU, X.; OLSON, D.M.; CHEMTOB, S.; GAO, L.; XIN, N. Hydrogen Sulfide Delays LPS-Induced Preterm Birth in Mice via Anti-Inflammatory Pathways. **PLoS ONE**, 2016.
- MONNIAUX, D.; DALBIES-TRAN, R.; FABRE, S.; GÉRARD, N.; MONGET, P.; CLÉMENT, F. La développement folliculaire ovarien er l'ovulation in: Saint-Dizier, M. e Chastant-Maillard, S. **La reproduction animale et humaine**. Éditions Quae, 2014.
- MOTL, N.; YADAV, P.; BANERJEE, R. Enzymology of Hydrogen Sulfide Turnover In: KIMURA, H. **Hydrogen Sulfide and its Therapeutic Applications**, Springer-Verlag Wien 2013.
- OLSON, K.R. The therapeutic potential of hydrogen sulfide: separating hype from hope. **Am J Physiol.** 2011.
- PALMER, R.M.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature.** 1987.
- PAPAPETROPOULOS, A.; PYRIOCHOU, A.; ALTAANY, Z.; YANG, G.; MARAZIOTI, A.; ZHOU, Z.; JESCHKE, M.G.; BRANSKI, L.K.; HERNDON, D.N.; WANG, R.; SZABÓ, C. Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2009.
- PARK, J. Y.; SU, Y. Q.; ARIGA, M.; LAW, E.; JIN, S.L.; CONTI, D.M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. **Science**, 2004.
- POLHEMUS, D.J.; LEFER, D.J. Emergence of hydrogen sulfide as an endogenous gaseous signaling molecule in cardiovascular disease. **Circ. Res.** 2014.
- PORTER, D.W.; BASKIN, S.I. The effect of three α -keto acids on 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase activity. **J Biochem Toxicol.** 1996
- RICHARDS, J.S.; PANGAS, S.A. The ovary: basic biology and clinical implications. **J Clin Invest.** 2010.
- SALVETTI, N.R.; ACOSTA, J.C.; GIMENO, E.J.; MULLER, L.A.; MAZZINI, R.A.; TABOADA, A.F.; ORTEGA, H.H. Estrogen receptors alpha and beta and progesterone receptors in normal bovine ovarian follicles and cystic ovarian disease. **Vet Pathol.** 2007.
- SALVETTI, N.R.; BARAVALLE, C.; MIRA, G.A.; GIMENO, E.J.; DALLARD, B.E.; REY, F.; ORTEGA, H.H. Heat shock protein 70 and sex steroid receptors in the follicular structures of induced ovarian cysts. **Reprod Domest Anim.** 2009.

SEARCY, D.G.; LEE, S.H. Sulfur reduction by human erythrocytes. **J Exp Zool** 282: 310–322, 1998.

SHIBUYA, N.; MIKAMI, Y.; KIMURA, Y.; NAGAHARA, N.; KIMURA, H. Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide. **J Biochem** 146: 623–626, 2009.

SHIMADA, M.; HERNANDEZ-GONZALEZ, I.; GONZALEZ-ROBAYNA, I.; RICHARDS, J.S. Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. *Mol. Endocrinol.* 20:1352–1365;2006.

WALTERS, K.A.; ALLAN, C.M.; HANDELSMAN, D.J. Androgen actions and the ovary. **Biol Reprod.** 2008.

WANG, R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. **Physiol Rev.** 2012.

WANG, R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? **FASEB J** 16: 1792–1798j, 2002.

ZAMBERLAM, G.; SAHMI, F.; PRICE C.A. Nitric oxide synthase activity is critical for the preovulatory epidermal growth factor-like cascade induced by luteinizing hormone in bovine granulosa cells. **Free Radic Biol Med** 74, 237–244; 2014.

ZANARDO, R.C.; BRANCALEONE, V.; DISTRUTTI, E.; FIORUCCI, S.; CIRINO, G.; WALLACE, J.L. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. **FASEB**, 2006.

ZHAO, W.; WANG, R. H₂S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. **Am J Physiol** 283: H474-H480, 2002.