



Reprodução & Climatério

<http://www.sbrh.org.br/revista>



Artigo de revisão

Importância das comunicações intercelulares para o desenvolvimento de folículos ovarianos



Laritzza Ferreira Lima, Jamily Bezerra Bruno, Andréa Moreira Sampaio da Silva, Ana Beatriz Graça Duarte, José Ricardo de Figueiredo e Ana Paula Ribeiro Rodrigues*

Faculdade de Veterinária, Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-Antrais (Lamofopa), Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 1 de dezembro de 2015

Aceito em 25 de dezembro de 2015

On-line em 4 de março de 2016

Palavra-chave:

Junções intercelulares

Junções gap

Folículo

Ovário

R E S U M O

Durante a foliculogênese em mamíferos, ocorre um longo e complexo processo no qual o oócito adquire a competência necessária para a fecundação. Nesse processo ocorre uma comunicação metabólica bidirecional entre os oócitos e as células somáticas dentro do folículo que garante substratos para o oócito em desenvolvimento. Essa comunicação é mediada pelas junções celulares (junções comunicantes e junções aderentes) presentes nas projeções transzonais. As junções celulares e moléculas de adesão são responsáveis principalmente por promover a adesão entre as células foliculares; mas podem atuar em vias de sinalização celular e na regulação da transcrição gênica nas células somáticas e oócitos. Além disso, as junções comunicantes (junções gap) são canais intermembranares que intermediam a comunicação entre essas células através da passagem de pequenas moléculas. Essas junções comunicantes são compostas por proteínas denominadas conexinas; as conexinas 37 e 43 são as predominantes nos folículos ovarianos. Dessa forma, o conhecimento acerca das junções celulares é de extrema importância para o estudo da foliculogênese. A presente revisão teve como objetivo abordar os principais tipos de junções celulares existentes entre as células foliculares, com destaque para as junções gap e as principais proteínas de membranas (conexinas) presentes nos diferentes estágios do desenvolvimento folicular.

© 2016 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Intercellular communications in ovarian follicles

A B S T R A C T

During the mammalian folliculogenesis, a long and complex process occurs, which the oocyte acquires the necessary competence for fecundation. In this process there is a metabolic bidirectional communication among the oocyte and somatic cells inside the follicle, which provides substrates for the oocyte developmental competence. This communication is mediated by cellular junctions (occlusions, adherens and gap junctions) localized in the

Keywords:

Intercellular junctions

Gap junction

Follicle

Ovary

* Autor para correspondência.

E-mail: aprrodriguespapers@gmail.com (A.P.R. Rodrigues).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.recli.2015.12.005>

1413-2087/© 2016 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

transzonal projections. Cellular junctions and adhesion molecules are responsible mainly for promoting the adhesion among follicular cells, however they can act in cellular signaling pathways and in regulation of gene transcription in the follicular cells and oocyte. Moreover, the communication junctions (gap junctions) are intermembrane channels that intermediate the communication among these cells through the passage of small molecules. These gap junctions are composed by connexins, of which the connexins 37 and 43 are the most frequently found in the ovarian follicle. Thus, knowledge of these cellular junctions are of great importance for studying the folliculogenesis process. The aim of this review was to report the main types of cellular junctions localized among the follicular cells, especially the gap junctions and the main membrane proteins (connexins) found in different stages of the follicular development.

© 2016 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Published by Elsevier Editora Ltda.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introdução

Os organismos multicelulares têm células com capacidade de se comunicar umas com as outras e proporcionar um mecanismo indispensável para os tecidos interagirem. A comunicação entre as células ocorre de forma parácrina, endócrina ou autócrina e é mediada por uma variedade de moléculas, como peptídeos, grandes proteínas inseridas na membrana celular, aminoácidos, nucleotídeos, esteroides e outros lipídeos. Além da comunicação via moléculas de sinalização e seus receptores, as células definem seus limites de contato, apical e basolateral, de acordo com características estruturais e funcionais presentes neles.¹

No seu domínio basolateral, as células têm principalmente junções celulares e moléculas de adesão para estabelecer o contato entre si e permitir a comunicação célula-célula. As junções celulares são divididas em três categorias, de acordo com as suas funções: *junções de oclusão*, *aderentes* e *comunicantes*. As junções de oclusão e *aderentes* formam importantes estruturas de contato entre células vizinhas. Essas junções são compostas por diferentes proteínas transmembranares que fazem contato entre as células e as ligações intracelulares com o citoesqueleto de actina, além de atuar em vias de sinalização celular, incluindo a regulação da transcrição gênica nas células² (fig. 1).

As junções comunicantes, também conhecidas como *junções gap*, são regiões especializadas da membrana celular que intermediam a comunicação entre as células. São canais intercelulares de membrana que permitem a passagem de íons, moléculas que atuam como segundos mensageiros e pequenos metabólitos (<100 KDa).³ As junções comunicantes ou *junções gap* são compostas por unidades chamadas *conexons* que formam um conjunto de canais proteicos compostos por uma família de mais de 20 proteínas chamadas *conexinas*.⁴

Diversas pesquisas têm tornado evidente que as comunicações intercelulares juncionais (junções comunicantes ou *junções gap*) exercem importante função no desenvolvimento embrionário e na reprodução.⁴⁻⁶ Especificamente no ovário, há uma clara evidência do envolvimento de junções celulares no desenvolvimento dos folículos ovarianos. Durante o crescimento e o desenvolvimento do gameta feminino (oócito) em mamíferos, há uma conexão contínua dos oócitos com as células foliculares circundantes através

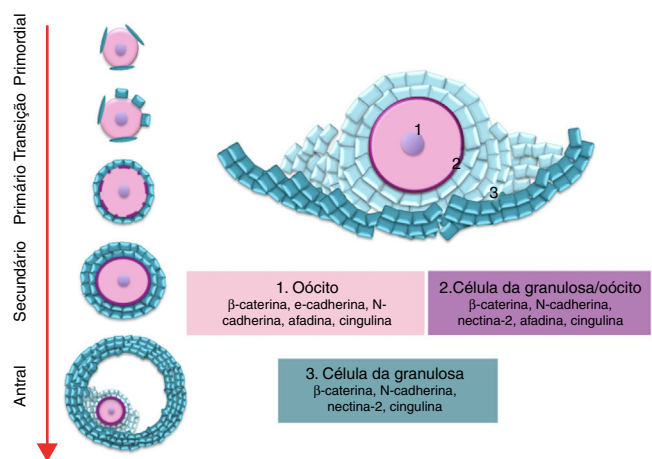


Figura 1 – Moléculas de adesão presentes na diferentes junções intercelulares (*aderentes* e *gap*) das células foliculares durante a foliculogênese.

de junções de oclusão, *aderentes* e *gap*.^{4,7-9} O folículo ovariano é um exemplo claro da importância das comunicações intercelulares no processo de desenvolvimento. Nos folículos ovarianos, tanto junções de adesão como *gap* se formam entre o oócito em crescimento e as células foliculares e formam um sincício funcional.¹⁰

Dada a importância das junções celulares para o desenvolvimento folicular ovariano, a presente revisão fará uma abordagem sobre os tipos de interações entre as células foliculares, com destaque para as junções *gap* e as principais conexinas encontradas nos folículos ovarianos.

Papel das comunicações intercelulares no desenvolvimento folicular ovariano

Foliculogênese e desenvolvimento folicular

O folículo ovariano consiste no oócito circundado por células somáticas, da granulosa e da teca, que representam a unidade funcional básica do ovário.¹¹ Em mamíferos, o oócito entra em meiose I, passa um período prolongado de quiescência nos folículos primordiais e constitui o pool de reserva de

gametas femininos no ovário. A foliculogênese é marcada por um período de proliferação das células da granulosa que circundam o oócito e pelo crescimento oocitário. O crescimento do oócito é acompanhado por expressão gênica seletiva para atender a demandas de estocagem de organelas e macromoléculas que serão herdadas pelo embrião.¹²

A foliculogênese pode ser dividida nas seguintes fases (1) *crescimento folicular pré-antral*: compreende a transição do folículo primordial para primário e formação dos folículos secundários em crescimento; (2) *crescimento antral*: marca o desenvolvimento dos folículos antrais iniciais para o estágio gonadotrofina-dependentes e (3) *crescimento antral terminal*: ocorre o desenvolvimento dos folículos antrais para o estágio pré-ovulatório.¹³

A foliculogênese inicia-se ainda na vida intrauterina na maioria das espécies, com a formação dos folículos primordiais quiescentes, que são formados pelo oócito em prófase I da meiose circundado por uma camada de células somáticas de formato pavimentoso. Os folículos primordiais saem do pool de reserva e passam para o pool de folículos em crescimento. O folículo primário é caracterizado pela mudança de células foliculares pavimentosas para cúbicas e entra em fase de crescimento. O crescimento progressivo do oócito é acompanhado pela proliferação e multiplicação das camadas de células da granulosa ao redor do oócito e os folículos passam a se denominar secundários ou multilaminares. Durante o crescimento dos folículos secundários, ocorre a diferenciação das células do estroma em células da teca ao redor do folículo em crescimento.^{14,15} Uma vez que o folículo pré-antral alcança um tamanho específico, com 6 ou 7 camadas de células da granulosa, começa a ocorrer a formação de uma cavidade preenchida por fluido e esses se tornam folículos antrais. O folículo pré-ovulatório contém um oócito completamente crescido, circundado por milhares de células do *cumulus* e células da granulosa murais que delimitam a cavidade antral e são circundadas pela células da teca¹³ (fig. 1).

Comunicações intercelulares durante o desenvolvimento folicular

A morfologia das células da granulosa regula a proliferação celular e a esteroidogênese em camundongos e ratos.^{16,17} Em outros tipos celulares, a morfologia celular pode ainda regular a síntese de DNA, expressão gênica, diferenciação e apoptose.¹⁸ Durante a foliculogênese ocorre uma cooperação metabólica entre oócitos e células somáticas dentro do folículo para assegurar substratos para o oócito em desenvolvimento. Evidências morfológicas sugerem que essa cooperação se estende durante toda a foliculogênese, nos estágios primário, secundário e terciário (antral).¹⁹ Essa cooperação é mediada pelas junções comunicantes entre o oócito e as células da granulosa.²⁰ Substratos como aminoácidos, glicose, metabólitos e nucleotídeos são transferidos para o oócito via junções *gap*.⁷ Além disso, moléculas que regulam a maturação meiótica do oócito também passam através de junções *gap*.¹⁰

A comunicação entre as células da granulosa e os oócitos acontece de maneira bidirecional e é essencial para o desenvolvimento tanto do oócito como das células da granulosa.⁷ O oócito também secreta fatores que afetam os padrões de expressão gênica nas diferentes populações de células da

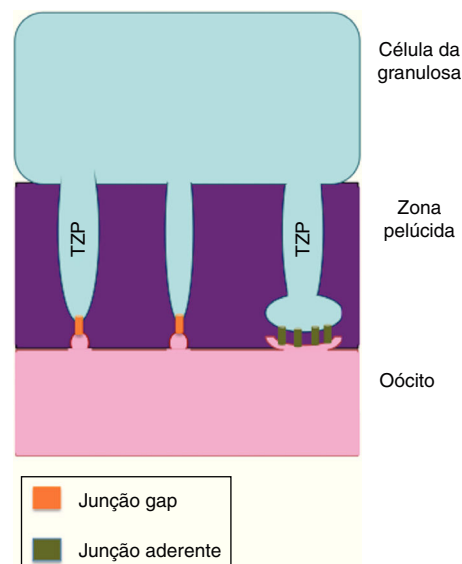


Figura 2 – Representação esquemática das projeções transzonais (TZP) entre o oócito e as células da granulosa. Nas extremidades das projeções são encontradas as moléculas de adesão que formam as junções aderentes e gap responsáveis pela comunicações intercelulares.

granulosa, como, por exemplo, suprime a expressão de fatores importantes para o desenvolvimento do oócito como Kit Ligand e receptores para o hormônio luteinizante (LH) nas células do *cumulus*.²¹⁻²³ Além disso, Sugiura et al.²⁴ demonstraram que a produção energética nos folículos antrais, ou seja, glicólise e ciclo do ácido tricarboxílico, essencial para produção de ATP celular, é regulada por sinais emitidos dos oócitos para as células da granulosa e que a produção desses sinais e a capacidade de responder a eles são coordenados e dependentes do estágio de desenvolvimento das células.

Estudos relatam que essa comunicação entre o oócito em desenvolvimento e as células da granulosa circundantes é facilitada por projeções transzonais (PTZ) das células da granulosa que entram em contato com a superfície do oócito. Esses estudos indicam que esses contatos possibilitam a passagem de fatores de crescimento e a ocupação de receptores na interface entre as células da granulosa e o oócito.²⁵ As PTZ são extensões das células da granulosa que atravessam a zona pelúcida e entram em contato com a superfície do oócito e são estruturas caracterizadas em muitas células de mamíferos por microscopia eletrônica.²⁶ O número e a estrutura dessas PTZ variam de forma dinâmica de acordo com o desenvolvimento folicular e parecem modular a comunicação e a troca de substâncias entre o oócito e as células foliculares.²⁷

As PTZ partem da superfície das células da granulosa e entram em contato com a membrana plasmática do oócito, onde estão presentes junções comunicantes (*gap*) e junções aderentes ou de oclusão (fig. 2). As PTZ são estruturas ricas em proteínas estruturais dos microtúbulos que dão suporte ao movimento ativo de organelas dentro das células somáticas e permitem o maior contato com a superfície do oócito.

Conforme o oócito aumenta em volume citoplasmático, a complexidade das PTZ evolui e aumenta o número de junções comunicantes e junções aderentes.¹⁹ Em folículos pré-antrais as PTZ são numerosas e têm zonas de contato compostas por moléculas de adesão e junções comunicantes que permitem a comunicação entre as células da granulosa e o oolema. Durante o crescimento oocitário inicial, as PTZ se estendem tão profundamente no ooplasma que afetam a vesícula germinativa. Após o desenvolvimento do antro, as PTZ se retraem e mantêm poucas conexões terminais com o oócito em relação aos folículos pré-antrais.²⁶

Recentemente, Mora et al.⁸ verificaram que durante o primeiro sinal da diferenciação das células da granulosa nos folículos primordiais murinos, ou seja, durante a transição de células pavimentosas a cúbicas que caracteriza a transição do folículo quiescente para folículo em desenvolvimento, é o momento em que ocorre o aumento do contato entre as membranas do oócito e das células da granulosa. Além disso, observaram que durante o crescimento folicular e mediante surgimento da zona pelúcida as PTZ se tornaram abundantes, concomitantemente ao aumento no número de microvilosidades no oócito e ao aparecimento de regiões elétricas densas nos pontos de contato entre as PTZ e as microvilosidades, o que indica a presença de junções celulares nessa região.

Junções de oclusão presentes em folículos ovarianos

As junções de oclusão presentes nas PTZ que entram em contato com a membrana do oócito são complexos proteicos que determinam a polaridade das células e impedem a livre difusão de lipídeos e proteínas entre os domínios apicais e basolaterais da membrana plasmática. Além disso, formam uma barreira epitelial que impede a livre passagem de substâncias via paracelular. As junções de oclusão formam faixas de proteínas transmembranares ao redor de todo o perímetro celular. Proteínas transmembranares, como claudinas e ocludinas, auxiliam a manter adesão celular e regulam a sinalização intracelular e a organização do citoesqueleto.^{19,26} As moléculas transmembranares que participam das junções de oclusão se ligam a proteínas que ancoram o citoesqueleto das células. Dentre as proteínas de adesão presentes nesses complexos, as ocludinas e claudinas são as mais extensivamente estudadas. Embora as ocludinas sejam moléculas altamente conservadas, as claudinas compreendem uma família de mais de 20 diferentes proteínas, nas quais a claudina-5 está expressa nas células endoteliais vasculares.²⁸

As proteínas ocludina e claudina-5 que compõem as junções de oclusão foram encontradas em folículos ovarianos de primatas diferencialmente expressas durante o desenvolvimento folicular.²⁹ Nesse mesmo estudo, quando os autores suprimiram a angiogênese folicular pela inibição do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), verificaram que essa inibição afetou negativamente a expressão de ocludinas nas células da granulosa. Portanto, esse estudo leva a crer que a adesão mediada pela ocludina e claudina-5 pode exercer um papel crítico durante o crescimento folicular, que exige mudanças morfológicas e fisiológicas no processo de remodelamento do tecido ovariano.

As junções de oclusão influenciam o transporte de fluidos extracelulares entre as células e são os componentes mais apicais dos complexos juncionais intercelulares, os quais selam completamente o espaço entre as células adjacentes. Dessa forma, são importantes não apenas para a comunicação entre as células, mas também promovem a formação de uma barreira na membrana celular que regula a permeabilidade paracelular e mantém a integridade celular e do tecido.³⁰

No folículo ovariano a formação de uma barreira epitelial pelas células da granulosa favorece um movimento seletivo de fluido de fora para dentro do folículo no espaço entre as células da granulosa que é essencial para a formação da cavidade antral.³¹ Durante a passagem do estágio de folículo pré-antral para antral, solutos e água atravessam o endotélio capilar para dentro da cavidade antral e se deparam com a multicamada de células da granulosa e seus complexos juncionais, que garantem que o movimento de fluido não ocorra de maneira descontrolada.³² Durante o crescimento do folículo, múltiplos espaços preenchidos por fluido acumulam entre as células da granulosa, os quais se expandem, coalescem e formam uma grande cavidade central que é o antro. A formação desses espaços entre as células da granulosa ocorre provavelmente onde as junções comunicantes e moléculas de adesão estejam reduzidas. A diminuição das junções celulares e de moléculas de adesão provavelmente favorece o desenvolvimento do antro, juntamente com a secreção de moléculas de alto peso molecular, como glicosaminoglicanos e proteoglicanos, que aumentam a pressão osmótica. No entanto, como ocorre a regulação da presença dessas junções nas células da granulosa para formação do fluido folicular ainda não está bem claro.^{31,32}

Curiosamente, em um estudo recente com folículos pré-antrais de camundongos, as junções de oclusão não foram evidenciadas pela análise ultraestrutural, expressão do mRNA ou pela expressão proteica durante o desenvolvimento folicular. As proteínas presentes nas junções de oclusão, como ocludinas e claudinas, foram encontradas apenas no epitélio do oviduto, mas não em folículos. Os autores encontraram apenas proteínas que são expressas durante a formação das junções de oclusão, as moléculas de adesão juncionais (JAMs) e cingulinas, mas em baixos níveis nas células da granulosa de folículos antrais.⁸ Sabe-se que as JAMs se ligam à afadina, a qual já foi encontrada na membrana do oócito. Entretanto, até o momento não há registros de JAMs na membrana do oócito em desenvolvimento.

As adesões epiteliais ocorrem no epitélio que reveste o ovário, incluindo os complexos juncionais e componentes de adesão da matriz extracelular. Esses componentes são críticos para manutenção da integridade estrutural, polaridade e comunicação célula-célula e sua expressão é estritamente regulada nas células normais. A perda de adesão celular é frequentemente observada em células tumorais, provoca um colapso na organização celular e causa extravasamento de nutrientes e outros fatores necessários para a sobrevivência e o crescimento de tumores e perda do contato entre as células, o que favorece a aquisição de motilidade celular e de fenótipo maligno. A redução da expressão de moléculas de adesão está diretamente relacionada com doenças invasivas e metástases no ovário.³³

Junções aderentes presentes em folículos ovarianos

As mudanças no formato das células durante a transição de folículos primordiais para primários e o controle de sua proliferação no início do crescimento folicular são regulados por mudanças nas junções intercelulares e por modificações na arquitetura do citoesqueleto, que influenciam na polaridade das células e na orientação do eixo mitótico.¹⁸ Eventos que levam à maturação do folículo e à formação do corpo lúteo no ovário assemelham-se aos processos estruturais que ocorrem durante a embriogênese. A divisão celular, dissociação, morte, migração e adesão são fenômenos comuns ao desenvolvimento de ovário e organogênese.³⁴ Dessa forma, tem sido proposto que as moléculas de adesão presentes nas junções de ancoragem ou junções aderentes estão envolvidas nos processos de sobrevivência, proliferação, remodelação folicular, maturação, ovulação e formação do corpo lúteo no ovário.³⁴

Nos epitélios, as junções de ancoragem, de adesão ou aderentes (*Adherens Junctions*) são encontradas abaixo das junções de oclusão, próximas à superfície apical das células com função de adesão celular e parecem estar envolvidas também nos eventos de sinalização celular.³⁵ As junções aderentes são formadas por proteínas transmembranares que formam interações com o citoesqueleto de actina.¹⁸ Essas junções exercem múltiplas funções, incluindo a estabilização da adesão entre as células, regulação do citoesqueleto de actina e regulação da sinalização intracelular e transcricional. O eixo das junções aderentes incluem interações com glicoproteínas transmembranares conhecidas como a superfamília das caderinas, como as E-caderinas, e a superfamília das cateninas, como as B-cateninas, que juntas controlam a formação e manutenção da estrutura das junções aderentes.³⁶ As E-caderinas são encontradas em todos os epitélios, enquanto as N-caderinas são encontradas no tecido nervoso e muscular. As caderinas são proteínas transmembranares dependentes de cálcio que se ligam à actina do citoesqueleto via α -cateninas e β -cateninas intracelulares. As nectinas também fazem parte desse complexo juncional e são proteínas transmembranares independentes de cálcio.

Estudos em oócitos de hamsters e ratos demonstraram que a E-caderina está localizada no oócito, enquanto a N-caderina foi detectada nas células da granulosa.^{34,37} Estudos anteriores identificaram o mRNA e a proteína de caderinas e cateninas no ovário de camundongos e ratos, mas não foram verificados em folículos pré-antrais.^{38,39} A nectina-2 também foi imunolocalizada em folículos primários murinos, especificamente na interface entre as células da granulosa e oócito.⁴⁰

Recentemente, Mora et al.⁸ caracterizaram as junções celulares no ovário de camundongos e verificaram que, assim como nas células epiteliais, as células da granulosa dos folículos ovarianos expressam as moléculas de adesão que compõem as junções de oclusão, junções aderentes e desmossomos. Além disso, nesse estudo também foram identificadas por RT-PCR e imunofluorescência as moléculas que associam as junções celulares ao citoesqueleto. Além disso, esses autores caracterizaram por microscopia eletrônica de transmissão a ultraestrutura das junções aderentes entre as células da granulosa e entre a granulosa e oócitos

de folículos em diferentes estágios de desenvolvimento. Nesse estudo, os autores identificaram as junções aderentes como um complexo de adesão chave para o crescimento inicial dos folículos. As células da granulosa apresentaram principalmente N-caderina e nectina-2 nas junções aderentes e entre o oócito e as células da granulosa existem N-caderinas oócito específicas e granulosa específicas que interagem entre essas células foliculares. Os autores sugerem que durante a foliculogênese as células da granulosa sofrem mudanças de polaridade, especialmente durante a formação do antro, e não se comportam exatamente como células epiteliais clássicas.

Portanto, acreditamos que ainda há muito para se investigar sobre os processos envolvidos na diferenciação das células da granulosa e do oócito durante a foliculogênese em mamíferos. Ainda são necessários estudos futuros de como as proteínas envolvidas nas junções celulares, moléculas de adesão e do citoesqueleto estão envolvidos na polarização das células foliculares e como participam desses processos de sinalização celular nos folículos ovarianos.

Junções gap em folículos ovarianos

As junções gap são canais intercelulares que permitem a troca citoplasmática de íons e metabólitos de baixo peso molecular entre células adjacentes. Essas comunicações são essenciais em muitos aspectos da fisiologia animal, incluindo a propagação de sinais elétricos e a coordenação da sinalização celular por transferência de mensageiros secundários.⁴¹

Durante todo o desenvolvimento folicular e oocitário existe um contínuo acoplamento com as células foliculares circundantes via junções gap,⁷ o qual se inicia com os folículos primordiais, em algumas espécies, e vai até o estágio antral.¹⁸ Na literatura, têm sido constatadas algumas evidências de que a comunicação direta célula-célula via junções gap está envolvida no crescimento do folículo⁴² e na maturação do oócito⁴³ através da passagem de substâncias que controlam esse processo.⁴⁴ Além disso, a presença dessas junções a partir do estágio pré-antral mostra que o padrão de expressão das junções gap pode refletir uma regulação do desenvolvimento de folículos pré-antrais em crescimento.

Essas conexões permitem a transferência de aminoácidos, glicose, nucleotídeos e fatores de crescimento endócrinos e parácrinos necessários para o crescimento do oócito. De acordo com Eppig,⁶ o desenvolvimento dos oócitos é estritamente dependente do suprimento de nutrientes transmitido das células foliculares via junções gap. Durante o crescimento folicular o número de camadas de células da granulosa e de células da teca aumenta. Consequentemente, aumenta a distância do suprimento sanguíneo do oócito. Essa condição faz necessário, portanto, um mecanismo de comunicação intercelular eficiente que permita a passagem de nutrientes essenciais do sangue, necessários para a saúde do oócito, bem como para o desenvolvimento do antro folicular.⁴² Em um estudo recente com folículos ovarianos de camundongos, Mora et al.⁸ identificaram por microscopia eletrônica de transmissão a presença de junções gap entre células da granulosa, mostradas pela sua estrutura pentalaminar.

Nos tecidos em geral, inclusive no ovário, sabe-se que essas estruturas são formadas pelo acoplamento de hemicanais

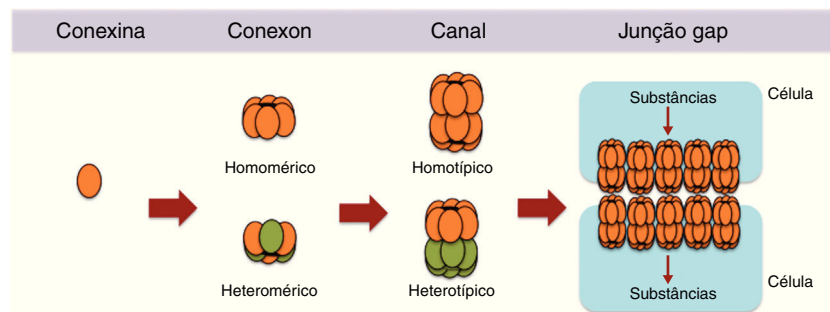


Figura 3 – Representação esquemática da conexinas, dos conexons, dos hemicanais e das junções gap.

chamados conexons, formados, por sua vez, por oligômeros hexaméricos de proteínas transmembranares chamadas de conexinas.⁴⁵ Os conexons podem ser formados por apenas um tipo de conexina (*conexon homomérico*) ou pela interação de diferentes isoformas de conexinas (*conexon heteromérico*). Os conexons homoméricos e heteroméricos podem formar canais homotípicos e heterotípicos, ou seja, um hemicanal pode se acoplar com um hemicanal idêntico, para formar um canal homotípico, ou um hemicanal diferente para formar um canal heterotípico (fig. 3). De fato, essas variações de conexinas na formação da junção gap fazem com que esses canais sejam permeáveis a praticamente a todos os mensageiros secundários solúveis, aminoácidos, nucleotídeos, íons de cálcio, glicose e seus metabólitos.²

As conexinas são membros de uma grande família de proteínas integrais de membrana e cada uma é produto de um gene diferente, porém todas têm a mesma estrutura básica. Essas proteínas consistem de quatro domínios membranares, dois loops extracelulares, um loop citoplasmático, um domínio N-terminal e um C-terminal, citoplasmáticos. Os loops extracelulares formam o domínio de contato que permite o encaixe de conexons das células adjacentes. As similaridades das sequências entre os membros da família das conexinas são concentradas nos domínios transmembranares e nos loops extracelulares, enquanto o tamanho e a variação da sequência estão concentrados nos loops citoplasmáticos e extremidades C-terminal.⁵ Estudos mostram que 20 e 21 membros da família de genes das conexinas são expressos no genoma de camundongos e de humanos, respectivamente.⁴⁶

Embora nos ovários as conexinas apresentem um padrão único de expressão, essas proteínas podem ser reguladas pelo metabolismo, pelos hormônios e pelo desenvolvimento.^{43,47,48} Várias conexinas são expressas dentro do folículo ovariano,

em alguns casos dentro do mesmo tipo celular (tabela 1). Por exemplo, as Cx32 e Cx43 foram detectadas em junções gap que unem as células da granulosa em folículos de camundongos.⁴⁹ Essas mesmas conexinas estão também presentes em células da granulosa de ratos.⁵⁰ A Cx45 está presente como o menor componente das junções gap em células da granulosa de camundongos e de ratos adultos e oócitos de suínos e colocalizada com a Cx43 em algumas junções gap das mesmas espécies.^{42,51-53} A Cx60 é expressa em células da granulosa e oócitos em suíno.⁵¹

Além das conexinas já mencionadas, outras têm sido detectadas nos folículos ovarianos de outras espécies, notadamente, a Cx30.3 em células da granulosa e da teca de ratas e porcas.^{54,55} A Cx26 foi identificada em oócitos de ovelhas e vacas e células da teca de porcas.^{48,54,56} De acordo com Wright et al.,⁴² a Cx26 e Cx32 também são expressas em oócitos e células da teca de camundongos, porém o RNAm para a Cx26 não foi detectado em oócitos de camundongos desnudos nem em células da granulosa de ovários juvenis.⁵⁷

Embora existam várias conexinas (Cx26, Cx30, Cx32, Cx37, Cx43 e Cx45) que constituem as junções gaps presentes no ovário, estudos indicam que os tipos que mais influenciam a foliculogênese são as Cx37 e Cx43⁵⁸ e por essa razão esses tipos têm sido amplamente estudados nos folículos ovarianos.

Localização e importância da Cx37 durante a foliculogênese e oogênese

A Cx37 é um membro da família alfa das conexinas,⁵⁹ a qual parece ser essencial na foliculogênese e oogênese. Essa conexina é expressa principalmente na superfície dos oócitos^{60,61} de muitas espécies animais, como camundongos, ratas, vacas e ovelhas.⁶²⁻⁶⁴ Entretanto, alguns autores

Tabela 1 – Expressão das conexinas em células foliculares de diferentes espécies

Conexina (Cx)	Localização folicular	Espécie	Referência
Cx26	Oócito e células da teca	Ovino, bovino, suíno e murino	42,47,54,56
Cx30	Células da granulosa e da teca	Murino e suíno	54,55
Cx32	Células da granulosa	Murino	42,49,50
Cx37	Oócito, células da granulosa e teca	Murino, ovino, bovino e humano	60-64,67-69,71-74
Cx43	Oócito, células da granulosa e teca e corpo lúteo	Murino, ovino, bovino, suíno, felino e humano	42,47-53,56,58,69,71,85-89,91,92,94,96,106,109
Cx45	Oócito e células da granulosa	Murino e suíno	42,51
Cx 60	Células da granulosa e oócito	Suíno	51

identificaram marcações dessa proteína espalhadas no citoplasma do oócito de camundongos^{60,61} e vacas.⁶² Os autores acreditam que a presença dessa proteína no citoplasma do oócito pode ter ocorrido devido à ligação do anticorpo com essa conexina antes da formação da junção *gap* e sua associação com a membrana⁶⁵ durante a internalização da Cx37 para degradação ou, ainda, a Cx37 estaria armazenada no citoplasma para ser usada durante as fases subsequentes do desenvolvimento folicular.⁶² Outros autores associaram essa desorganização em torno do perímetro do oócito como um sinal precoce de atresia ou morte folicular.^{61,66}

Outros investigadores também revelaram que a Cx37 está presente em células da granulosa de folículo de camundongo, bovinos e ovinos adultos,^{62,64,67} bem como em células da teca de ovinos.^{64,65} Em bovinos, mesmo em estágios iniciais de desenvolvimento folicular, a Cx37 foi imunomarcada em toda a membranas da células da granulosa e não se restringiu à interface entre as células da granulosa e os oócitos.⁶² Veitch et al.⁶⁸ afirmaram que é comum a presença dessa proteína tanto no oócito quanto nas células da granulosa. Entretanto, só existe formação das junções *gap* com essa estrutura se houver contato direto com o oócito. Além disso, Gittens and Kidder⁶⁹ verificaram a que a deleção da Cx37 somente nas células da granulosa não afeta a foliculogênese, enquanto a ausência dessa proteína no oócito afeta a oogênese, apresenta oócitos menores e meioticamente incompetentes.

A distribuição dessa conexina nos diferentes compartimentos dos folículos ao longo da foliculogênese parece ser espécie-específica. Aparentemente, em alguns animais, como camundongos e ratos, essa proteína pode ser detectada a partir de folículos primários.⁶⁰ Entretanto, Grazul-Bilska et al.⁷⁰ verificaram que a proteína está uniformemente distribuída na periferia do citoplasma do oócito e nas células da granulosa de folículos primordiais, está também presente em folículos primários e secundários. De acordo com esses autores, a Cx37 também está presente entre o oócito e as células do *cumulus* de folículos antrais de ovários fetais ovinos. Kristensen et al.⁷¹ demonstraram que a Cx37 é expressa em todos estágios de folículos pré-antrais humanos, no entanto com uma fraca expressão. Em vacas, a Cx37 foi detectada no oócito e nas células da granulosa, predominantemente localizada em estágios de folículos pré-antrais.⁶² Outros autores confirmam a presença dessa proteína mesmo após a ovulação, durante a formação do corpo lúteo,⁶⁰ e sugeriram que essa proteína está envolvida na regulação da produção de progesterona.⁶⁴

Devido à presença da Cx37 ao longo de toda a foliculogênese, acredita-se que essa proteína tem um importante papel nesse processo. Sabe-se que a Cx37 atua no transporte de metabólitos essenciais para a transição do folículo pré-antral para a fase antral, ovulação e formação do corpo lúteo.^{60,64} De fato, camundongos deficientes para a Cx37 tiveram a foliculogênese interrompida no estágio inicial antral e os oócitos não atingiram tamanho normal nem adquiriram competência meiótica.^{60,72} Carabatsos et al.⁷² relataram que os oócitos e folículos deficientes em Cx37 param o crescimento quando atingem 52 μ m e 150 μ m, respectivamente. Em camundongos e ratos, também tem sido mostrado claramente que a Cx37 é essencial para a oogênese/foliculogênese nessas espécies.^{60,68,69,73,74} Baseado nos estudos de *knockout* de gene em camundongos, a ausência de Cx37 nos folículos

em desenvolvimento promove a luteinização precoce dessas estruturas, sugere que essa conexina também permite a passagens de importantes substâncias que regulam a formação do corpo lúteo.⁶⁰ A expressão do RNAm para a Cx37 foi relativamente elevada em corpos lúteos maduros, indicando que pode ser requerida para o desenvolvimento completo e funcional do corpo lúteo.⁶⁴

Estudos *in vitro* têm mostrado que a expressão das conexinas em folículos ovarianos pode ser alterada com a presença de hormônios no meio de cultivo, como, por exemplo, gonadotrofina coriônica humana (hCG), LH, hormônio folículo estimulante (FSH), insulina e esteroides.^{47,58,75,76} Em camundongos, a adição de insulina associada ou não ao FSH no meio de cultivo *in vitro* de ovário reduz a expressão do RNAm para essa conexina.⁷⁶ Entretanto, o FSH sem associação com a insulina aumenta a expressão do RNAm para a Cx37. Em ovinos, a expressão de RNAm para a Cx37 nas células da granulosa e tecais é estimulada ou mantida pela adição de hCG.⁶⁴

A Cx37 está diretamente relacionada com a preparação para a maturação oocitária. A deficiência de Cx37 pode resultar numa assincronia da maturação nuclear e citoplasmática no oócito.⁷² Uma explicação para essa assincronia poderia ser atribuída a deficiências nutricionais e o bloqueio da transferência de substâncias inibidoras do meio, como AMPc, resultantes de uma perda de transferência de junções *gap*. O AMPc produzido nas células da granulosa mantém a maturação via proteína quinase A (PKA), a qual inativa o fator promotor da meiose (MPF). Entretanto, durante a ovulação e a presença do pico de LH (*in vivo*), existe a perda da comunicação entre as células foliculares e o oócito, pelo fechamento das Junções *gap*, o que ocasiona a queda da concentração de AMPc no oócito e inativa a PKA, o que possibilita a reativação do MPF e, consequentemente, a ativação da meiose.⁷⁷

A presença da Cx37 no endotélio do ovário de ovinos^{64,70} condiz com a detecção dessa proteína predominantemente no endotélio dos grandes vasos sanguíneos do ovário de camundongos.^{42,61} Além disso, em vários outros tecidos a Cx37 foi predominantemente expressa em células endoteliais e, portanto, é também conhecida como conexina vascular.⁷⁸⁻⁸³ Dessa forma, é possível que a Cx37 também possa desempenhar um papel na função vascular da célula ovariana.

Localização e importância da Cx43 durante a foliculogênese

A Cx43, também pertencente à família alfa das conexinas, forma conexons homoméricos, os quais permitem a passagem de moléculas de até 1.2 KDa, preferencialmente de carga negativa. Por esses canais, moléculas como AMPc, derivados do inositol trifosfato (IP3) e Ca²⁺ passam livremente por citoplasmas de células adjacentes.⁸⁴ Essa conexina é bastante estudada no ovário, pois também exerce um importante papel durante os processos de foliculogênese e oogênese.

Essa proteína que foi detectada em ovários de fetos de ovelhas e ratas,⁸⁵ demonstrou um possível papel no desenvolvimento fetal desse órgão. De fato, essa conexina é uma das principais proteínas das junções *gap*, expressas nas células da granulosa e nos COCs de várias espécies, como bovinos, suínos, ovinos e murinos.^{47-49,56,86-88} No entanto, a Cx43 também foi encontrada nas células do corpo lúteo de bovinos, suínos e

ovinos.^{47,48,54,64} A Cx43 também foi imunolocalizada em oócitos murinos^{49,58} e bovinos.⁸⁹ No entanto, esses relatos não foram apoiados por outros estudos,^{47,68,90} os quais afirmam que a localização da Cx43 é restrita às células do *cumulus*. Estudos *in vitro* têm relatado a possibilidade de formação de canais heterotípicos de Cx43 com a Cx37 em células do *cumulus* que rodeiam o oócito.⁶⁸

Em suínos e murinos, a Cx43 foi localizada nas células da granulosa de folículos primários e sua expressão aumenta com o desenvolvimento folicular e com a formação do antro em folículos saudáveis.^{87,91,92} Em um estudo mais recente, Grazul-Bilska et al.,⁷⁰ além de observar em que a Cx43 foi detectada em células da granulosa e da teca em todas as categorias de folículos ovarianos ovinos, observaram que o seu nível de expressão aumentou do folículo primário para o folículo antral. Essa expressão em folículos primordiais também foi detectada em mulheres⁷¹ e ratas.⁸⁶ O aumento no número das junções *gap* com o tamanho do folículo pode estar relacionado com as crescentes demandas do folículo em crescimento por uma maior troca de metabólitos e sinais regulatórios através de vias de sinalização dependentes de contato.

Ao contrário da Cx37, ainda não foi possível uma investigação acerca da Cx43 no ovário de camundongos *knock-out*, pois esses animais morreram logo após o nascimento.⁹³ No entanto, alguns pesquisadores fizeram o transplante desse ovário para animais selvagens com o intuito de verificar os efeitos da deficiência dessa proteína. O estudo mostrou, portanto, que a ausência da Cx43 levou à interrupção do desenvolvimento folicular no estágio de folículo primário e um retardo no crescimento dos oócitos.^{9,73}

Alguns autores citam que essa proteína está presente também em folículos atresícos de ratas,⁸⁷ porcas⁹⁴ e vacas, mas ausente em ovelhas.⁴⁸ Cheng et al.⁹⁴ verificaram que folículos antrais de porcas saudáveis têm Cx43 fosforilada, ou seja, junções *gap* abertas e atuantes. Por outro lado, nos folículos atresícos existe uma rápida desfosforilação, uma baixa expressão dessa proteína e consequente fechamento desses canais, o qual causa um aumento da beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase (1ST6 Gal 1). Dessa forma, esses autores sugeriram que a alteração na expressão dessa substância

promoveria alteração nos glicoconjugados membranares que iriam sinalizar a morte das células da granulosa e a sua fagocitose.⁹⁴

A expressão da Cx43 e das junções *gap* nos ovários é afetada por várias substâncias, incluindo hormônios como FSH, LH, seus análogos gonadotrofina coriônica de égua prenhe (PMSG) e hCG, hormônio do crescimento (GH) ou estradiol e segundos mensageiros.^{47,48,56,58,62,75,95} O estímulo da produção dessas proteínas pode estar ligado ao estímulo da proliferação celular que algumas dessas substâncias proporcionam. Kaiser et al.⁹⁶ verificaram que o GH recombinante aumenta significativamente o número de folículos em crescimento, bem como o número de estruturas que expressam essa proteína. Porém, em folículos antrais, a expressão da Cx43 é regulada principalmente pelos hormônios FSH e LH, bem como seus análogos (PMSG e hCG, respectivamente). O FSH estimula a expressão da Cx43 no ovário, enquanto o LH reduz.⁹⁷

A atividade biológica do FSH é traduzida através, principalmente, da via de ativação da PKA dependente de AMPc. Por isso, sugere-se que o FSH aumenta as comunicações intercelulares através da ativação dessa via, o que ocasiona o aumento da expressão dessas proteínas, bem como a fosforilação delas, e forma as junções *gap* funcionais.⁴⁷ Além disso, sabe-se que o aumento do AMPc levaria a uma redistribuição rápida da Cx43 para a membrana celular e mais tarde à estimulação da expressão do gene Cx43. O estímulo da expressão gênica ocorre através dos estímulos de regiões promotoras, como promotor P1.⁹⁸

Por outro lado, a exposição de células das granulosa/*cumulus* ao LH, apesar de estimular a via da PKA,^{99,100} também ativa a via proteína quinase C (PKC),^{99,100} a qual promove a hiperfosforilação das proteínas das junções *gap* e leva ao fechamento dos canais.^{58,101} Sela-Abramovich et al.¹⁰¹ verificaram que após 10 min do estímulo do FSH ocorre a hiperfosforilação desses canais, consequentemente o seu fechamento, além de demonstrar que isso ocorre através da ativação da MAPK. Além disso, após 3 h do estímulo do LH ocorre uma redução nas comunicações celulares nos COCs e na expressão da proteína e RNAm da CX43, o que resulta na redução substancial das áreas de membranas das junções

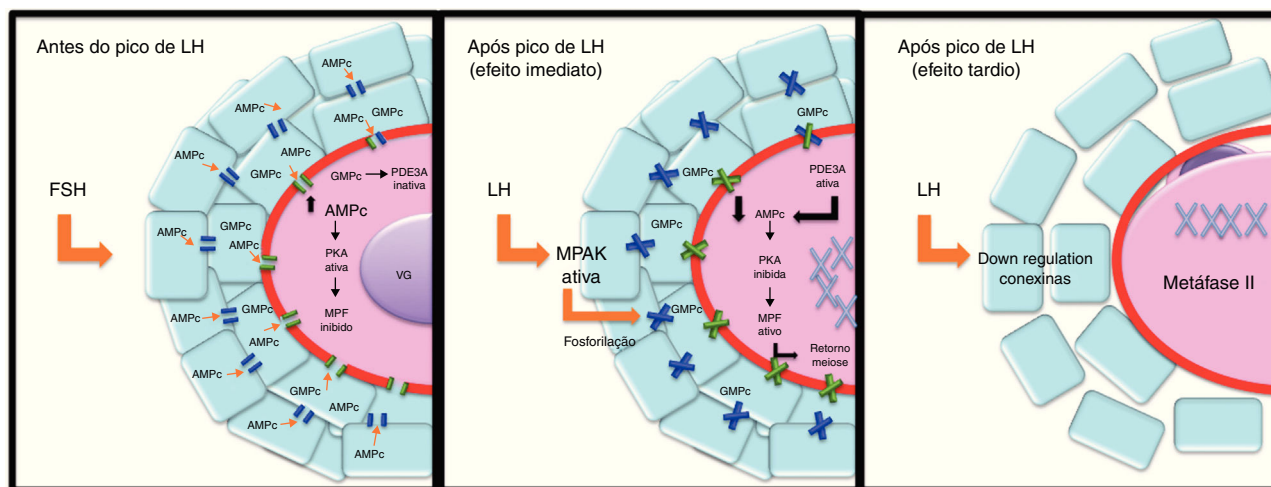


Figura 4 – Representação esquemática da expressão e funcionalidade das conexinas 37 (verde) e 43 (azul) com a exposição de LH.

gap.^{58,86,101} Essa alteração na expressão da Cx43 restringe o fluxo de sinais das células foliculares para o oócito e promove a maturação meiótica.^{102,103} O fechamento dessa conexina cessa o fornecimento de AMPc das células somáticas para o oócito e reduz a concentração intraoocitária desse nucleótido.¹⁰⁴ Com a redução do AMPc, a PKA é inativada no oócito e consequentemente ocorre a ativação do MPF.⁷⁷ O fechamento das conexinas também impede a passagem do GMPc produzido pelas células do cumulus, o qual inibe a hidrólise do AMPc pela fosfodiesterase 3A (PDE3A)¹⁰⁵ (fig. 4).

Curiosamente tem sido reportado que processos como a criopreservação e o cultivo *in vitro* causam danos nas conexinas, as quais são importantes na interação entre oócito e células foliculares.^{106,107} Os danos nas conexinas podem prejudicar severamente o desenvolvimento folicular, através da interrupção da troca de substâncias entre os componentes foliculares, como aminoácidos, glicose, nucleotídeos e fatores de crescimento endócrinos e parácrinos, necessários para o crescimento do folículo e, consequentemente, para a maturação do oócito.⁶

Estudos anteriores mostraram uma menor expressão de Cx43 em tecidos ovarianos criopreservados, que foi associada com inadequado desenvolvimento folicular em ratos¹⁰⁸ e felinos.¹⁰⁹ Também foi demonstrado que a criopreservação pelo processo de vitrificação afeta o padrão de expressão gênico e proteico da Cx43 em camundongo e gatas.^{106,110} Recentemente, Tanpradit et al.¹⁰⁶ observaram que o padrão de expressão gênica da Cx43 reduziu após a criopreservação, tanto por congelamento lento como por vitrificação de folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano de gatas.

Além da criopreservação, o cultivo *in vitro* reduz a expressão da Cx43, seja em folículos isolados ou inclusos em tecido ovariano.¹⁰⁷ Recentemente, nossa equipe verificou uma redução na expressão gênica da Cx43 em folículos ovinos vitrificados e cultivados por 6 dias (Silva, dados não publicados).

Considerações finais

Conforme mostrado nos tópicos acima, as junções intercelulares estão presentes durante toda a foliculogênese de diversas espécies, ou seja, desde o estágio de folículo primordial até o desenvolvimento do folículo pré-ovulatório. Essas junções estão envolvidas nos processos de desenvolvimento folicular e maturação oocitária. Mais especificamente, a presença das junções de oclusão e aderentes é essencial para a manutenção da polaridade e da comunicação entre as células. Já as junções gap estão presentes no oócito, nas células da granulosa e no cumulus em diversos animais e têm importante papel na passagem de substâncias essenciais para a foliculogênese e a oogênese. Portanto, o conhecimento dessas junções (oclusão, aderentes e gaps) é de extrema importância para o estudo da foliculogênese. Conforme mostrado em vários estudos, as conexinas são afetadas pelos processos de criopreservação e cultivo *in vitro*. Portanto, o estabelecimento de protocolos de ambas as técnicas que afetem minimamente essas proteínas é de extrema importância para as tecnologias de reprodução assistida que envolvam o desenvolvimento de oócitos e folículos ovarianos, *in vitro*.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. Anderson E, Albertini DF. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J Cell Biol.* 1976;71:680-6.
2. Harris AL, Bevans CG. Exploring hemichannel permeability *in vitro*. *Methods Mol Biol.* 2001;154:357-77.
3. Gittens JE, Mhawi AA, Lidington D, Ouellette Y, Kidder GM. Functional analysis of gap junctions in ovarian granulosa cells: distinct role for connexin43 in early stages of folliculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;284(4):C880-7.
4. Gilula NB, Epstein ML, Beers WH. Cell-to-cell communication and ovulation: a study of the cumulus-oocyte complex. *J. Cell Biol.* 1978;78:58-75.
5. Kidder GM, Mhawi AA. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction.* 2002;123:613-20.
6. Eppig JJ. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *Bioessays.* 1991;13:569-74.
7. Eppig JJ, O'Brien MJ. Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. *Biology of Reproduction.* 1996;54:197-207.
8. Mora JM, Fenwick MA, Castle L, Baithun M, Ryder TA, Mobberley M, et al. Characterization and significance of adhesion and junction-related proteins in mouse ovarian follicles. *Biol Reprod.* 2012;86(5):1-14, 153.
9. Ackert CL, Gittens JEI, O'Brien MJ, Eppig JJ, Kidder GM. Intercellular communication via connexin 43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. *Dev Biol.* 2001;233:258-70.
10. Orisaka M, Tajima K, Tsang Bk Kotsuji F. Oocyte-granulosa-theca cell interaction during preantral follicular development. *J Ovarian Res.* 2009;9:2-9.
11. Pant D, Reynolds LP, Luther JS, Borowicz PP, Stenbak TM, Bilski JJ, et al. Expression of connexin 43 and gap junctional intercellular communication in the cumulus-oocyte complex in sheep. *Reproduction.* 2005;129:191-200.
12. Van Den Hurk R, Zhao J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology.* 2005;63:1717-51.
13. Hirshfield AN. Overview of ovarian follicular development: considerations for the toxicologist. *Environ Mol Mutagen.* 1997;29:10-5.
14. Figueiredo JR, Celestino JJH, Rodrigues APR, Silva JRV. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. *Rev Bras Reprod Anim.* 2007;31(2):143-52.
15. Carnegie JA, Byard R, Dardick I, Tsang BK. Culture of granulosa cells in collagen gels: the influence of cell shape on steroidogenesis. *Biol Reprod.* 1988;38:4881-90.
16. Da Silva-Buttkus P, Jayasooriya GS, Mora JM, Mobberley M, Ryder TA, Baithun M, et al. Effect of cell shape and packing density on granulosa cell proliferation and formation of multiple layers during early follicle development in the ovary. *J Cell Sci.* 2008;121:3890-900.
17. Jamora C, Fuchs E. Intercellular adhesion, signalling, and the cytoskeleton. *Nat Cell Biol.* 2002;4:E101-8.
18. Mitchell PA, Burghardt RC. The ontogeny of nexuses (gap junctions) in the ovary of the fetal mouse. *Anat Rec.* 1986;214(3):283-8.

19. Rong Li Albertini DF. The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14:141-52.
20. Eppig JJ, Chesnel F, Hirao Y, O'Brien MJ, Pendola FL, Watanabe S, et al. Oocyte control of granulosa cell development: how and why. *Hum Reprod.* 1997;12:127-32.
21. Joyce IM, Pendola FL, Wigglesworth K, Eppig JJ. Oocyte regulation of kit ligand expression in mouse ovarian follicles. *Dev Biol.* 1999;214:342-53.
22. Joyce IM, Khalid M, Haresign W. The effect of recombinant GH treatment on ovarian growth and atresia in sheep. *Theriogenology.* 2000;54(2):327-38.
23. Sugiura K, Pendola FL, Eppig JJ. Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. *Dev Biol.* 2005;279(1):20-30.
24. Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, Carabatsos MJ. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction.* 2001;121:647-53.
25. Motta PM, Nottola SA, Pereda J, Croxatto HB, Familiari G. Ultrastructure of human cumulus oophorus: a transmission electron microscopic study on oviductal oocytes and fertilized eggs. *Hum Reprod.* 1995;10(9):2361-7.
26. Nunes FD, Lopez LN, Lin HW, Davies C, Azevedo RB, Gow A, et al. Distinct subdomain organization and molecular composition of a tight junction with adherens junction features. *J. Cell Sci.* 2006;119:4819-27.
27. Morita K, Sasaki H, Furuse K, Furuse M, Tsukita S, Miyachi Y. Expression of claudin-5 in dermal vascular endothelia. *Exp Dermatol.* 2003;12(3):289-95.
28. Rodewald M, Herr D, Fraser HM, Hack G, Kreienberg R, Wulff C. Regulation of tight junction proteins occludin and claudin 5 in the primate ovary during the ovulatory cycle and after inhibition of vascular endothelial growth factor. *Mol Hum Reprod.* 2007;13:781-9.
29. Peppi M, Ghabriel MN. Tissue-specific expression of the tight junction proteins claudins and occludin in the rat salivary glands. *J Anat.* 2004;205(4):257-66.
30. Clarke HG, Hope SA, Byers S, Rodgers RJ. Formation of ovarian follicular fluid May be due to the osmotic potential of large glycosaminoglycans and proteoglycans. *Reproduction.* 2006;132:119-31.
31. Rodgers RJ, Irving Rodgers HF. Morphological classification of bovine ovarian follicles. *Reproduction.* 2010;139:309-18.
32. Heinzelmann-Schwarz VA, Gardiner-Garden M, Henshall SM. Overexpression of the cell adhesion molecules DDR1, Claudin 3, and Ep-CAM in metaplastic ovarian epithelium and ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10:4427-36.
33. Ryan PL, Valentine AF, Bagnell CA. Expression of epithelial cadherin in the developing and adult pig ovary. *Biol Reprod.* 1996;55:1091-7.
34. Smith SR, Fulton N, Collins CS, Welsh M, Bayne RA, Coutts SM, et al. N- and E-cadherin expression in human ovarian androgenital duct development. *Fertil Steril.* 2010;93:2348-53.
35. Erez N, Bershadsky A, Geiger B. Signaling from adherens-type junctions. *Eur J Cell Biol.* 2005;84:235-44.
36. Hartsock A, Nelson WJ. Adherens and tight junctions: structure, function, and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1778(3):660-9.
37. Wang C, Roy SK. Expression of E-cadherin and N-cadherin in perinatal hamster ovary: possible involvement in primordial follicle formation and regulation by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology.* 2010;151:2319-30.
38. Machell NH, Blaschuk OW, Farookhi R. Developmental expression and distribution of N- and E-cadherin in the rat ovary. *Biol Reprod.* 2000;63:797-804.
39. Sundfeldt K, Piontekewitz Y, Billig H, Hedin L. E-cadherin-catenin complex in the rat ovary: cell-specific expression during folliculogenesis and luteal formation. *J Reprod Fertil.* 2000;118:375-85.
40. Kawagishi R, Tahara M, Morishige K, Sakata M, Tasaka K, Ikeda W, et al. Expression of nectin-2 in mouse granulosa cells. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005;121:71-6.
41. Nielsen MS, Axelsen LN, Sorgen PL, Verma V, Delmar M, Holstein-Rathlou NH. Gap junctions. *Compr Physiol.* 2012;2:1981-2035.
42. Wright CS, Becker DL, Lin JS, Warner AE, Hardy K. Stagespecific and differential expression of gap junctions in the mouse ovary: connexin-specific roles in follicular regulation. *Reproduction.* 2001;121(1):7-88.
43. Gershon E, Plaks V, Dekel N. Gap junctions in the ovary: expression, localization and function. *Mol Cell Endocrinol.* 2008;282(1-2):18-25.
44. Santiquet N, Robert C, Richard FJ. The dynamics of connexin expression, degradation, and localisation are regulated by gonadotropins during the early stages of in vitro maturation of swine oocytes. *PlosOne.* 2013;8(7):1-11.
45. Gilleron J, Malassiné A, Carette D, Segretain D, Pointis G. Chemical connexin impairment in the development gonad associated with offspring infertility. *Cur Med Chemistry.* 2011;18:5145-58.
46. Sohl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res.* 2004;62:228-32.
47. Grazul-Bilska AT, Reynolds LP, Redmer DA. Gap junctions in the ovaries. *Biol Reprod.* 1997;57(5):947-57.
48. Grazul-Bilska AT, Redmer DA, Bilska JJ, Jablonka-Shariff A, Doraiswamy V, Reynolds LP. Gap junctional proteins, connexin 26, 32, and 43 in sheep ovaries throughout the estrous cycle. *Endocrine.* 1998;8(3):269-79.
49. Valdimarsson G, De Sousa PA, Kidder GM. Coexpression of gap junction proteins in the cumulus-oocyte complex. *Mol Reprod Dev.* 1993;36:7-15.
50. Li R, Mather JL. An inhibitor of gap junction formation, abolishes oocyte directed follicle organizing activity in vitro. *Endocrinology.* 1997;138:4477-80.
51. Nitta M, Yogo K, Ohashi M, Akiyama M, Kunitomo Y, Ogawa T, et al. Identification and expression analysis of connexin-45 and connexin-60 as major connexins in porcine Oocytes. *J Anim Sci.* 2010;88:3269-79.
52. Okuma A, Kuraoka A, Iida H, Inai T, Wasano K, Shibata Y. Colocalization of connexin 43 and connexin 45 but absence of connexin 40 in granulosa cell gap junctions of rat ovary. *J Reprod Fertil.* 1996;107(2):255-64.
53. Alcolea S, Theveniau-Ruissy M, Jarry-Guichard T, Marics I, Tzouanacou E, Chauvin JP, et al. Downregulation of connexin 45 gene products during mouse heart development. *Circ Res.* 1999;84:1365-79.
54. Itahana K, Morikazu Y, Takeya T. Differential expression of four connexin genes, Cx-26, Cx-30.3, Cx-32, and Cx-43, in the porcine ovarian follicle. *Endocrinology.* 1996;137(11):5036-44.
55. Itahana K, Tanaka T, Morikazu Y, Komatsu S, Ishida N, Takeya T. Isolation and characterization of a novel connexin gene, Cx-60, in porcine ovarian follicles. *Endocrinology.* 1998;139:320-9.
56. Johnson M, Redmer D, Reynolds L, Grazul-Bilska A. Expression of gap junctional proteins connexin 43, 32, and 26 throughout follicular development and atresia in cows. *Endocrine.* 1999;10:43-51.
57. Risek B, Guthrie S, Kumar N, Gilula NB. Modulation of gap junction transcript and protein expression during pregnancy in the rat. *J. Cell Biol.* 1990;110:269-82.
58. Granot I, Dekel N. The ovarian gap junction protein connexin43: regulation by gonadotropins. *Trends Endocrinol Metab.* 2002;13:310-3.

59. Oyamada M, Takebe K, Oyamada Y. Regulation of connexin expression by transcription factors and epigenetic mechanisms. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1828:118–33.
60. Simon AM, Goodenough DA, Li E, Paul DL. Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature*. 1997;385:525–9.
61. Teilmann SC. Differential expression and localisation of connexin-37 and connexin-43 in follicles of different stages in the 4-week-old mouse ovary. *Mol Cell Endocrinol*. 2005;234:27–35.
62. Nuttinck F, Peynot N, Humblot P, Massip A, Dessy F, Flechon JE. Comparative immunohistochemical distribution of connexin 37 and connexin 43 throughout folliculogenesis in the bovine ovary. *Mol Reprod Dev*. 2000;57:60–6.
63. Granot I, Bechor E, Barash A, Dekel N. Connexin43 in rat oocytes: developmental modulation of its phosphorylation. *Biol Reprod*. 2002;66:568–73.
64. Borowczyk E, Johnson ML, Redmer DA, Reynolds LP, Navanukraw C, Grazul-Bilska AT. Expression of gap junctional connexins (Cx) 26, 32, 37, and 43 mRNA in ovarian preovulatory follicles and corpora lutea in sheep. *Can J Physiol Pharmacol*. 2006;84:1–9.
65. Musil LS, Goodenough DA. Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell*. 1993;74:1065–77.
66. Ganesan S, Nteeba J, Keating AF. Impact of obesity on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced altered ovarian connexin gap junction proteins in female mice. *Toxicol Appl Pharm*. 2015;282:1–8.
67. Ratchford AM, Esguerra CR, Moley KH. Decreased oocyte-granulosa cell gap junction communication and connexin expression in a type 1 diabetic mouse model. *Mol Endocrinol*. 2008;22:2643–54.
68. Grazul-Bilska AT, Vonnahme KA, Bilski JJ, Borowczyk E, Soni D, Milkkelson B, et al. Expression of gap junctional connexin proteins in ovine fetal ovaries: effects of maternal diet. *Domest Anim Endocrinol*. 2011;41:185–94.
69. Veitch GI, Gittens JE, Shao Q, Laird DW, Kidde GM. Selective assembly of connexin37 into heterocellular gap junctions at the oocyte/granulosa cell interface. *J Cell Sci*. 2004;117:2699–707.
70. Gittens JE, Kidder GM. Differential contributions of connexin37 and connexin43 to oogenesis revealed in chimeric reaggregated mouse ovaries. *J Cell Sci*. 2005;118:5071–8.
71. Kristenssens G, Ebbesen P, Andersen CY. Transcriptional profiling of five isolated size-matched stages of human preantral follicles. *Mol Cell Endocrinol*. 2015;401(5):189–201.
72. Carabatsos MJ, Selitto C, Goodenough DA, Albertini DF. Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. *Dev Biol*. 2000;226:167–79.
73. Juneja SC, Barr KJ, Enders GC, Kidder GM. Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin43. *Biol Reprod*. 1999;60:1263–70.
74. Li TY, Colley D, Barr KJ, Yee SP, Kidder GM. Rescue of oogenesis in Cx37-null mutant mice by oocyte-specific replacement with Cx43. *J Cell Sci*. 2007;120:4117–25.
75. Johnson ML, Reynolds LP, Redmer DA, Bilski JJ, Grazul-Bilska AT. Gap junctional intercellular communication of bovine granulosa and thecal cells from antral follicles: effects of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone. *Endocrine*. 2002;18:261–70.
76. Sun LL, Sun ZY, Zhang P, Zhai XW, Tang J, Pan QJ, et al. Effect of insulin on oogenesis from mouse fetal germ cells in a serum-free 3D culture system. *Reprod Biomed Online*. 2010;20:11–25.
77. Dekel N. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. *Mol Cell Endocrinol*. 2005;234:19–25.
78. Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Güldenagel M, et al. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem*. 2002;383:725–37.
79. Reed KE, Westphale EM, Larson DM, Wang HZ, Veenstra RD, Beyer EC. Molecular cloning and functional expression of human connexin37, an endothelial cell gap junction protein. *J Clin Invest*. 1993;91(3):997–1004.
80. Carter TD, Chen XY, Carlile G, Kalapothakis E, Ogden D, Evans WH. Porcine aortic endothelial gap junctions: identification and permeation by caged InsP3. *J Cell Sci*. 1996;109:1765–73.
81. Munari-Silem Y, Rousset B. Gap junction-mediated cell-to-cell communication in endocrine glands—molecular and functional aspects: a review. *Eur J Endocrinol*. 1996;135(3):251–64.
82. Seul KH, Beyer EC. Mouse connexin37: gene structure and promoter analysis. *Biochim Biophys Acta*. 2000;492:499–504.
83. Haefliger J-A, Nicod P, Meda P. Contribution of connexins to the function of the vascular wall. *Cardiovasc Res*. 2004;62(2):345–56.
84. Niessen H, Harz H, Bedner P, Krämer K, Willecke K. Selective permeability of different connexin channels to the second messenger inositol 1,4,5-trisphosphate. *J Cell Sci*. 2000;113:1365–72.
85. Perez-Armendariz EM, Saez JC, Bravo-Moreno JF, Lopez-Olmos V, Enders GC, Villalpando I. Connexin43 is expressed in mouse fetal ovary. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2003;271:360–7.
86. Wiesen JF, Midgley AR Jr. Changes in expression of connexin 43 gap junction messenger ribonucleic acid and protein during ovarian follicular growth. *Endocrinology*. 1993;133:741–6.
87. Mayerhofer A, Garfield RE. Immunocytochemical analysis of the expression of gap junction protein connexin 43 in the rat ovary. *Mol Reprod Dev*. 1995;41:331–8.
88. Marchal R, Caillaud M, Martoriati A, Gérard N, Mermillod P, Goudet G. Effect of growth hormone (GH) on *in vitro* nuclear and cytoplasmic oocyte maturation, cumulus expansion, hyaluronan synthases, and connexins 32 and 43 expression, and GH receptor messenger RNA expression in equine and porcine species. *Biol Reprod*. 2003;69(3):1013–22.
89. Sutovsky P, Flechon JE, Flechon B, Motlik J, Peynot N, Chesne P, et al. Dynamic changes of gap junctions and cytoskeleton during *in vitro* culture of cattle oocyte cumulus complexes. *Biol Reprod*. 1993;49(6):1277–87.
90. Simon AM, Chen H, Jackson CL. Cx37 and Cx43 localize to zona pellucida in mouse ovarian follicles. *Cell Commun Adhes*. 2006;13:61–77.
91. Lenhart JA, Downey BR, Bagnell CA. Connexin 43 gap junction protein expression during follicular development in the porcine ovary. *Biol Reprod*. 1998;58(2):583–90.
92. Melton CM, Zaunbrecher GM, Yoshizaki G, Patino R, Whisnant S, Rendon A, et al. Expression of connexin 43 mRNA and protein in developing follicles of prepubertal porcine ovaries. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2001;130:43–55.
93. Reaume AG, Desousa PA, Kulkarni S, Langille BL, Zhu D, Davies TC, et al. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science*. 1995;267:1831–4.
94. Cheng Y, Inoue N, Matsuda-Minehata F, Goto Y, Maeda A, Manabe N. Changes in expression and localization of connexin 43 mRNA and protein in porcine ovary granulosa cells during follicular atresia. *J. Reprod Devel*. 2005;51:627–37.

95. Kolle S, Stojkovic M, Boie G, Wolf E, Sinowatz F. Growth hormone-related effects on apoptosis, mitosis, and expression of connexin 43 in bovine *in vitro* maturation cumulus-oocyte complexes. *Biol Reprod.* 2003;68:1584-9.
96. Kaiser GG, Kolle S, Boie G, Sinowatz F, Palma GA, Alberio RH. *In vivo* effect of growth hormone on the expression of connexin-43 in bovine ovarian follicles. *Mol Reprod Dev.* 2006;73:600-6.
97. Yogo K, Ogawa T, Akiyama M, Ishida N, Takeya T. Functional analysis of novel phosphorylation sites in Cx43 in rat primary granulosa cells. *FEBS Lett.* 2002;531:132-6.
98. Van der Heyden MA, Rook MB, Hermans MM, Rijkse G, Boonstra J, Defize LH, et al. Identification of connexin43 as a functional target for Wnt signalling. *J Cell Sci.* 1998;111:1741-9.
99. Gudermann T, Birnbaumer M, Birnbaumer L. Evidence for dual coupling of the murine luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phosphoinositide breakdown and Ca²⁺ mobilization. Studies with the cloned murine luteinizing hormone receptor expressed in L cells. *J Biol Chem.* 1992;267:4479-88.
100. Morris JK, Richards JS. Hormonal induction of luteinization and prostaglandin endoperoxide synthase-2 involves multiple cellular signaling pathways. *Endocrinology.* 1993;133:770-9.
101. Sela-Abramovich S, Chorev E, Galiani D, Dekel N. Mitogen-activated protein kinase mediates luteinizing hormone-induced breakdown of communication and oocyte maturation in rat ovarian follicles. *Endocrinology.* 2005;146(3):1236-44.
102. Larsen WJ, Wert SE, Brunner GD. A dramatic loss of cumulus cell gap junctions is correlated with germinal vesicle breakdown in rat oocytes. *Dev Biol.* 1986;113:517-21.
103. Downs SM, Hunzickerdunn M. Differential regulation of oocyte maturation and cumulus expansion in the mouse oocyte-cumulus cell complex by site-selective analogs of cyclic adenosine-monophosphate. *Dev Biol.* 1995;172:72-85.
104. Dekel N. Spatial relationship of follicular cells in the control of meiosis. *Prog Clin Biol Res.* 1988;267:87-101.
105. Norris RP, Ratzan WJ, Freudzon M, Mehlmann LM, Krall J, Movsesian MA, et al. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development.* 2009;136:1869-78.
106. Tanpradit N, Comizzoli P, Srisuwatanasagul S, Chatdarong K. Positive impact of sucrose supplementation during slow freezing of cat ovarian tissues on cellular viability, follicle morphology, and DNA integrity. *Theriogenology.* 2015;83:1553-61.
107. Xu M, Banc A, Teresa KW, Lonnie DS. Secondary follicle growth and oocyte maturation by culture in alginate hydrogel following cryopreservation of the ovary or individual follicles. *Biotechnol Bioeng.* 2009;103:378-86.
108. Boland NI, Gosden RG. Effects of epidermal growth-factor on the growth and differentiation of cultured mouse ovarian follicles. *J Reprod Fertil.* 1994;101:369-74.
109. Luciano AM, Chigioni S, Lodde V, Franciosi F, Luvoni GC, Modena SC. Effect of different cryopreservation protocols on cytoskeleton and gap junction mediated communication integrity in feline germinal vesicle stage oocytes. *Cryobiology.* 2009;59:90-5.
110. Lee RK-K, Li S-H, Lu C-H, Ho H-Y, Chen Y-J, Yeh H-I. Abnormally low expression of connexin 37 and connexin 43 in subcutaneously transplanted cryopreserved mouse ovarian tissue. *J Assist Reprod Genet.* 2008;25:489-97.