JOSÉ EDUARDO DE OLIVEIRA ZANON

**Expressão gênica semi-quantitativa de receptores de
gonadotrofinas em folículos dominantes de novilhas
pré-púberes e adultas das raças Nelore (*Bos primigenius
indicus*) e Marchigiana (*Bos primigenius taurus*)**

São Paulo

2006

JOSÉ EDUARDO DE OLIVEIRA ZANON

**Expressão gênica semi-quantitativa de receptores de
gonadotrofinas em folículos dominantes de novilhas pré-púberes e
adultas das raças Nelore (*Bos primigenius indicus*)
e Marchigiana (*Bos primigenius taurus*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Adjunto Alicio Martins Júnior

São Paulo

2006

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Eduardo de Oliveira
BIBLIOTECA VIRGÍNIE BUFF D'APICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
7/2/06

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1641
FMVZ

Zanon, José Eduardo de Oliveira

Expressão gênica semi-quantitativa de receptores de gonadotrofinas em folículos dominantes de novilhas pré-púberes e adultas das raças Nelore (*Bos primigenius indicus*) e Marchigiana (*Bos primigenius taurus*) / José Eduardo de Oliveira Zanon. – São Paulo : J. E. O. Zanon, 2006.
93 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2006.

Programa de Pós-graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Alicio Martins Jr.

1. Novilhas pré-púberes. 2. Folículo dominante. 3. FSHr. 4. LHr.
5. Expressão gênica. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão de Bioética

PARECER

Interessado: José Ecuado de Oliveira Zanon

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto sob o número 835/2006, intitulado: "Expressão gênica semi-quantitativa de receptores de gonadotrofinas em folículos dominantes e hipófise de novilhas pré-púberes e adultas das raças Nelore (*Bos primigenius indicus*) e Marchigiana (*Bos primigenius taurus*)", no qual foram utilizados 08 (oito) cadáveres de novilhas, sob responsabilidade do Prof. Dr. Aécio Martins Júnior, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 02 de fevereiro de 2006

Prof. Dra. Júlia Maria de Fátima
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ZANON, José Eduardo de Oliveira

Título: Expressão gênica semi-quantitativa de receptores de gonadotrofinas em folículos dominantes de novilhas pré-púberes e adultas das raças Nelore (*Bos primigenius indicus*) e Marchigiana (*Bos primigenius taurus*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Medicina Veterinária

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

***Dedicado a meus pais,
José Fernando e Ana Lúcia,
que tanto lutaram e se sacrificaram para que eu
pudesse sonhar e correr atrás, me dando o exemplo
de vida e a compreensão necessários, além de
todo apoio além do necessário.
Muito obrigado.
Sempre.***

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Alicio Martins Jr., pela oportunidade de realização deste mestrado e de conhecer novas pessoas e fazer novos amigos.

Ao Prof. Dr. José Fernando Garcia, por toda colaboração, direta ou indireta, para a realização deste projeto e por toda uma vida de amizade, compreensão e aprendizagem e oportunidades.

Ao grande companheiro Sergio Aoki, pela enorme colaboração na elaboração e execução deste projeto de mestrado, pelas idéias, pelas discussões e pela amizade.

Aos meus grandes amigos Gustavo Avelar e Laércio Porto, por toda ajuda além da medida à realização e finalização deste projeto e dissertação, e também, principalmente, pela amizade eterna.

À amiga Valeria Menosso, por toda amizade, carinho e compreensão envolvidos durante o decorrer desta pós-graduação e de toda a vida fora dela, em momentos inesquecíveis, dos quais conseguia tirar forças para continuar dia após dia de dificuldades.

Ao Prof. Dr. José Buratini Jr., por toda a atenção dispensada, na confecção e discussão de idéias, projetos, e por toda a paciência e amizade.

Aos meus amigos funcionários Waldemar Soria e Laine Margareth Gabas (Margô), do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal da Unesp-Araçatuba, e à Renata Calegari, por todos os bons anos de convivência e cada momento de bate-papo e descontração.

Às secretárias da FMVA–Unesp–Araçatuba, Elza e Claudete, e do VRA–FMVZ–USP, Harumi, por toda paciência e enrascadas das quais me tiraram.

Um agradecimento especial para Fabiane Siqueira, Lúcia Sider e Fábio Pereira, sem os quais este trabalho não teria sido executado.

Aos professores Juliana Peiró, Luiz Cláudio Mendes e Francisco Leydson Feitosa, por todo apoio necessário para realização desta pós-graduação.

Aos companheiros Rúbia Silva e João Otávio Abujamra (Tatá), por toda a ajuda e energia desperdiçada em uma manhã de sol em Mirandópolis.

A todos os amigos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal, por todos os bons momentos vividos durante estes anos.

A todos os amigos, sejam professores ou pós-graduandos, do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP, por toda amizade e carinho durante o período em que estivemos juntos.

À Faz. Santa Cecília, pelo fornecimento e acondicionamento dos animais durante a realização do experimento.

A todos os funcionários dos frigoríficos Frigoalta, de Guararapes, e Fricouros, de Birigüi, por todo o material fornecido para realização de experimentos.

À Bioembryo Biotecnologia de Reprodução Animal, em nome de Walt Yamazaki, pela compreensão da necessidade e importância desta dissertação.

Um agradecimento especial a todos os meus amigos, que ajudaram diretamente ou indiretamente neste projeto e que, principalmente, ajudaram em muito nestes maravilhosos anos de convivência, amizade, diversão e aprendizagem.

À TODOS, MUITÍSSIMO OBRIGADO!!!

*“É verdade que não podemos encontrar a
pedra filosofal, mas é bom que ela seja
procurada; procurando-a, descobrem-se muitos
bons segredos que se não procurava”*

Fontenelle

RESUMO

ZANON, J. E. O. **Expressão gênica semi-quantitativa de receptores de gonadotrofinas em folículos dominantes de novilhas pré-púberes e adultas das raças Nelore (*Bos primigenius indicus*) e Marchigiana (*Bos primigenius taurus*)**. [Semi-quantitative gene expression of gonadotrophin receptors in dominant follicles of Nelore (*Bos primigenius indicus*) and Marchigiana (*Bos primigenius taurus*) prepubertal heifers and cows]. 2006. 93 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Com o objetivo de semi-quantificar a expressão gênica para receptores de gonadotrofinas nas células de folículos dominantes em animais pré-púberes (bezerras) das raças Nelore e Marchigiana e novilhas púberes da raça Nelore, buscando diferenças que possibilitem a procura de respostas para a deficiência da competência de desenvolvimento dos oócitos de animais pré-púberes que permitam a utilização destes em programas de melhoramento genético animal, foram utilizados 8 animais, sendo três bezerras Nelore, três bezerras Marchigiana, com 7 meses de idade, e duas novilhas Nelore, com 25 meses de idade. Foi realizado acompanhamento da onda folicular através de ultra-sonografia por dois meses, e os animais foram abatidos no momento que o folículo dominante apresentava diâmetro máximo (8, 10 e 14 mm, respectivamente). Folículos dominantes foram dissecados e isolados, e foi feita extração de RNA total. Foram feitas quatro reações de síntese de cDNA a partir de cada amostra. Para análise da expressão gênica semi-quantitativa, foram realizadas reações de Duplex-PCR, utilizando-se dois oligonucleotídeos iniciadores em cada reação, um para gene controle, o gapdh, e outro para o gene alvo, receptor do hormônio folículo estimulante ou receptor do

hormônio luteinizante. Estas reações foram realizadas em triplicata a partir de cada fonte de cDNA de cada amostra, e os produtos foram aplicados em gel de poliacrilamida, e fotografados. Os resultados foram obtidos a partir da razão entre a intensidade da banda do gene alvo e a intensidade da banda do gene controle, e os valores médios foram analisados estatisticamente. Foi encontrada menor expressão relativa do gene do receptor de LH em bezerras da raça Nelore quando comparadas com as novilhas da raça Nelore e as bezerras da raça Marchigiana. Foi detectada a presença de um *splicing* alternativo para o gene do LHr, que apresentou comportamento semelhante ao gene padrão. Não foi encontrada diferença significativa na expressão do gene do FSHr entre os grupos estudados. Os resultados sugerem uma maior importância do LH nos estágios finais de desenvolvimento folicular, demonstrado aqui pela menor expressão relativa de *lhr* nos folículos dominantes de bezerras Nelore em relação às novilhas púberes, que pode ser um dos motivos para o baixo potencial de desenvolvimento dos oócitos destes animais após a fertilização *in vitro*.

Palavras-chave: Novilhas pré-púberes. Folículo dominante. FSHr. LHr. Expressão gênica.

ABSTRACT

ZANON, J. E. O. **Semi-quantitative gene expression of gonadotrophin receptors in dominant follicles of Nelore (*Bos primigenius indicus*) and Marchigiana (*Bos primigenius taurus*) prepubertal heifers and cows.** [Expressão gênica semi-quantitativa de receptores de gonadotrofinas em folículos dominantes de novilhas pré-púberes e adultas das raças Nelore (*Bos primigenius indicus*) e Marchigiana (*Bos primigenius taurus*)] 2006. 93 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

With the objective to semiquantify the gene expression for gonadotrophins receptors in dominant follicles in Nelore and Marchigiana prepubertal heifers and Nelore adult cows, being searched differences that make possible the search of answers for the low developmental potential of oocytes from prepubertal heifers that allow the use of these in programs of animal genetic improvement, had been used 8 animals, being three Nelore heifers, three Marchigiana heifers, with 7 months of age, and two Nelore heifers, with 25 months of age. Accompaniment of the follicular wave was carried through daily ultrasonografic exams for two months, and the animals had been slaughtered at the moment that dominant follicle presented maximum diameter (8, 10 and 14 mm, respectively). Dominant follicles had been dissected and isolated, and extraction of total RNA was performed. Four reactions of synthesis of cDNA from each sample had been made. For analysis of the semi-quantitative gene expression, reactions of Duplex-PCR had been carried through, using themselves two initiating oligonucleotídeos in each reaction, one for housekeeping gene, *gapdh*, and another one for the target gene, *fshr* and *lhr*. These reactions had been carried through in third copy from each source of cDNA of each sample, and the products had been applied in poliacrilamida gel electrophoresis, and photographed. The

results had been gotten from the reason enter the intensity of the band of the target gene and the intensity of the band of the housekeeping gene, and the average values had been analyzed in a statistical software. Lower relative expression of *lhr* in Nelore heifers was found when compared with the Nelore adult cows and the Marchigiana heifers. An alternative *splicing* for *lhr* was detected, that presented similar behavior to the gene standard. Significant difference in the expression of the gene of the FSHr between the studied groups was not found. The results suggest a importance of the LH in the final periods of follicular development, demonstrated for the lower relative expression of *lhr* in the dominant follicles of Nelore heifers in relation to the adult cows in this study, that can after be the one of the reasons for the low developmental capacity of oocytes of these animals after *in vitro* fertilization.

Key words: Prepubertal heifers. Dominant follicle. FSHr. LHr. Gene expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 -	Novilhas utilizadas nos experimentos. A: novilhas da raça Nelore pré-púberes (bezerras Nelore); B: novilhas da raça Marchigiana pré-púberes (bezerras Marchigiana); C: novilhas da raça Nelore púberes (novilhas Nelore). Araçatuba, SP, 2005.	42
Figura 3.2 -	Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%, corado com SYBR Green, para padronização do número de ciclos de amplificação para análise da expressão gênica nos duplex-PCR <i>gapdh-fshr</i> e <i>gapdh-lhr</i> . Araçatuba, SP, 2005.	50
Figura 3.3 -	Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% corado com SYBR® Green com produtos de duplex-PCR <i>gapdh-lhr</i> em folículos dominantes. Araçatuba, SP, 2005.....	53
Figura 3.4 -	Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% corado com SYBR® Green com produtos de duplex-PCR <i>gapdh-fshr</i> em folículos dominantes. Araçatuba, SP, 2005.....	53
Figura 3.5 -	Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% corado com SYBR® Green com produtos de duplex-PCR <i>gapdh-lhr</i> em amostras de tecido hipofisário. Araçatuba, SP, 2005.	54
Figura 3.6 -	Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% corado com SYBR® Green com produtos de duplex-PCR <i>gapdh-fshr</i> em amostras de tecido hipofisário. Araçatuba, SP, 2005.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 -	Seqüência dos pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para padronização do RT-PCR semi-quantitativo.	48
Tabela 4.1 –	Estatísticas descritivas associadas à expressão relativa dos genes <i>lhr</i> , <i>lhr-alt</i> e <i>fshr</i> , em folículos dominantes, de bezerras e novilhas da raça Nelore – tamanho da amostra (n); média ($\bar{x}$), desvio padrão (s), mediana e valores extremos (mínimo e máximo). Araçatuba, SP, 2005.	60
Tabela 4.2 –	Estatísticas descritivas associadas à expressão relativa dos genes <i>lhr</i> , <i>lhr-alt</i> e <i>fshr</i> , em folículos dominantes, de bezerras e novilhas da raça Nelore – estatística de teste de comparação de amostras independentes e valor P correspondente ao teste de comparação de médias (teste-t). Araçatuba, SP, 2005.....	61
Tabela 4.3 –	Estatísticas descritivas associadas à expressão relativa dos genes <i>lhr</i> , <i>lhr-alt</i> e <i>fshr</i> , em folículos dominantes, para bezerras das raças Marchigiana e Nelore – tamanho da amostra (n); média ($\bar{x}$), desvio padrão (s), mediana e valores extremos (mínimo e máximo). Araçatuba, SP, 2005.....	67
Tabela 4.4 –	Estatísticas descritivas associadas à expressão relativa dos genes <i>lhr</i> , <i>lhr-alt</i> e <i>fshr</i> , em folículos dominantes, para bezerras das raças Marchigiana e Nelore, estatística de teste de comparação de amostras independentes e valor P correspondente ao teste de comparação de médias (teste-t). Araçatuba, SP, 2005.	68

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 3.1 –	Valores de intensidade média das bandas dos produtos de duplex-PCR dos genes <i>gapdh</i> e <i>lhr</i> em folículos dominantes por número de ciclos de amplificação. Araçatuba, SP, 2005.	51
Gráfico 3.2 –	Valores de intensidade média das bandas dos produtos de duplex-PCR dos genes <i>gapdh</i> e <i>fshr</i> em folículos dominantes por número de ciclos de amplificação. Araçatuba, SP, 2005.	51
Gráfico 4.1 –	Gráfico de valores individuais e IC(95%) para a média relativos à expressão semi-quantitativa do gene do receptor do hormônio luteinizante em folículos dominantes de bezerras e novilhas da raça Nelore. Araçatuba, SP, 2005.....	62
Gráfico 4.2 –	Gráfico box plot para média de expressão relativa do gene do receptor do hormônio luteinizante em folículos dominantes de bezerras e novilhas da raça Nelore. Araçatuba, SP, 2005.....	62
Gráfico 4.3 –	Gráfico de valores individuais e IC(95%) para a média relativos à expressão semi-quantitativa do <i>splicing</i> alternativo do gene do receptor do hormônio luteinizante em folículos dominantes de bezerras e novilhas da raça Nelore. Araçatuba, SP, 2005.....	63
Gráfico 4.4 –	Gráfico box plot para média de expressão relativa do <i>splicing</i> alternativo do gene do receptor do hormônio luteinizante em folículos dominantes de bezerras e novilhas da raça Nelore. Araçatuba, SP, 2005.	63
Gráfico 4.5 –	Gráfico de valores individuais e IC(95%) para a média relativos à expressão semi-quantitativa do gene do receptor do hormônio folículo estimulante em folículos dominantes de bezerras e novilhas da raça Nelore. Araçatuba, SP, 2005.....	64
Gráfico 4.6 –	Gráfico box plot para média de expressão relativa do gene do receptor do hormônio folículo estimulante em folículos dominantes de bezerras e novilhas da raça Nelore. Araçatuba, SP, 2005.	64

Gráfico 4.7 – Gráfico de valores individuais e IC(95%) para a média relativos à expressão semi-quantitativa do gene do receptor do hormônio luteinizante em folículos dominantes de bezerras das raças Nelore e Marchigiana. Araçatuba, SP, 2005.	69
Gráfico 4.8 – Gráfico box plot para média de expressão relativa do gene do receptor do hormônio luteinizante em folículos dominantes de bezerras das raças Nelore e Marchigiana. Araçatuba, SP, 2005.....	69
Gráfico 4.9 – Gráfico de valores individuais e IC(95%) para a média relativos à expressão semi-quantitativa do <i>splicing</i> alternativo do gene do receptor do hormônio luteinizante em folículos dominantes de bezerras das raças Nelore e Marchigiana. Araçatuba, SP, 2005.....	70
Gráfico 4.10 – Gráfico box plot para média de expressão relativa do <i>splicing</i> alternativo do gene do receptor do hormônio luteinizante em folículos dominantes de bezerras das raças Nelore e Marchigiana. Araçatuba, SP, 2005.....	70
Gráfico 4.11 – Gráfico de valores individuais e IC(95%) para a média relativos à expressão semi-quantitativa do gene do receptor do hormônio folículo estimulante em folículos dominantes de bezerras das raças Nelore e Marchigiana. Araçatuba, SP, 2005.	71
Gráfico 4.12 – Gráfico box plot para média de expressão relativa do gene do receptor do hormônio folículo estimulante em folículos dominantes de bezerras das raças Nelore e Marchigiana. Araçatuba, SP, 2005.	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPC	adenosina monofosfato cíclico
Ca ⁺²	cálcio
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
cm	centímetro
DEPC	dietil pirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	deoxiribonucleotídeos trifosfatados
EDTA	etilenodiaminotetra-acetato sódico
FSH	hormônio folículo estimulante
FSHr	receptor para hormônio folículo estimulante
<i>fshr</i>	gene do receptor para hormônio folículo estimulante
g	gauge
GAPDH	gliceraldeído fosfato desidrogenase
<i>gapdh</i>	gene da enzima gliceraldeído fosfato desidrogenase
GDP	guanosina 5 difosfato
Gs	proteína G estimulatória
GTP	guanosina 5 trifosfato
IC(95%)	índice de confiança de 95%.
IGF-1	fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
LH	hormônio luteinizante
LHr	receptor para hormônio luteinizante
<i>lhr</i>	gene do receptor do hormônio luteinizante
<i>lhr-alt</i>	<i>splicing</i> alternativo do receptor do hormônio luteinizante

mA	mili Ampère
mg	miligrama
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MHz	megahertz
min.	minuto
ml	milímetro
mm	milímetro
nm	nanômetro
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia pela polimerase
RNA	ácido ribonucléico
RNA _m	ácido ribonucléico mensageiro
RT-PCR	reação em cadeia pela polimerase – transcrição reversa
s	segundo
TBE	tris borato EDTA
x g	gravidade
°C	graus Celsius
µg	micrograma
µl	microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Objetivos	24
1.1.1	<i>Objetivos gerais</i>	24
1.1.2	<i>Objetivos específicos</i>	24
2	REVISÃO DE LITERATURA	26
3	MATERIAL E MÉTODO	40
3.1	Animais e local de realização dos experimentos	41
3.2	Acompanhamento da dinâmica folicular, determinação do diâmetro máximo de desenvolvimento dos folículos e coleta das amostras	41
3.3	Extração de RNA total	43
3.4	Quantificação do RNA total	45
3.5	Síntese do DNA complementar	46
3.6	Amplificação do cDNA para análise semi-quantitativa da expressão gênica..	47
3.7	Análise dos resultados.....	55
4	RESULTADOS	56
4.1	Comparação entre bezerras e novilhas da raça Nelore.....	58
4.2	Comparação entre bezerras das raças Nelore e Marchigiana.....	65
4.3	Expressão gênica dos receptores de gonadotrofinas em tecido hipofisário ...	72
5	DISCUSSÃO	73
6	CONCLUSÕES	81
7	REFERÊNCIAS	83

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O constante avanço das biotecnologias aplicadas à área de reprodução animal tem potencial para elevar rapidamente o ganho genético do rebanho bovino no Brasil e no mundo.

Essas biotecnologias têm alcançado grandes progressos nos últimos anos, incluindo grandes avanços na área de produção de embriões *in vitro*, principalmente com pesquisas utilizando a aspiração folicular de animais adultos e oócitos coletados a partir de ovários provenientes de abatedouros bovinos e, nos últimos anos, utilizando pesquisas na área da biologia molecular para entender os fenômenos que cercam o desenvolvimento de oócitos e embriões, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

No início das pesquisas, a grande quantidade de oócitos disponível possibilitou a pesquisa de várias formulações de meios de maturação, de fertilização e cultura *in vitro* de embriões, com grande grau de sucesso na obtenção de blastocistos saudáveis (FIRST et al., 1994; GARDNER, 1999). Esse desenvolvimento possibilitou a realização de programas de melhoramento genético que utilizem as técnicas de produção de embriões *in vitro*, onde se fez necessário o desenvolvimento de técnicas que permitissem a aspiração repetida de folículos em ovários de um animal vivo (doadora) (FARIN; CROSIER; FARIN, 2000; GREVE; MADDISON, 1991; MERMILLOD; MASSIP; DESSY, 1992).

Desde o nascimento do primeiro bezerro originado de fertilização *in vitro* (FIV) (BRACKET et al., 1982), vários avanços tecnológicos têm sido alcançados no desenvolvimento de meios de maturação e cultura de embriões *in vitro*. Além disso,

as biotécnicas para obtenção de oócitos de doadoras vivas, seja por aspiração folicular transvaginal guiada por ultra-sonografia (PIETERSE et al., 1991) ou por laparoscopia (ARMSTRONG et al., 1992) têm colaborado com o avanço tecnológico da FIV.

O desenvolvimento das técnicas de colheita de oócitos e de FIV permite uma melhor utilização do material genético disponível no rebanho bovino, aumentando as taxas de produção de descendentes de vacas de alto valor genético, de qualquer idade.

Apesar disso, existem contratempos em relação à utilização de jovens doadoras (bezerras e novilhas) em programas de transferência de embriões (TE) ou FIV, apesar do alto potencial destes animais para aumentar o ganho genético, diminuindo o intervalo entre gerações (DEKKERS, 1992; LOHUIS, 1995). Nestes animais, tentativas de produzir embriões e coletá-los através de lavagem uterina após programas de superovulação têm mostrado baixa eficiência de colheita (BROGLIATTI et al., 1997). Estes contratempos podem ser vencidos pela utilização da técnica de FIV de oócitos coletados dos ovários de jovens bezerras através de aspiração folicular, um procedimento que já apresenta resultados, com o nascimento de animais a partir de doadoras com idade entre 8 a 12 semanas (ARMSTRONG et al., 1992; REVEL et al., 1995; TANEJA et al., 2000).

A idade das bezerras interfere na onda folicular e no desenvolvimento de embriões *in vitro*. Oócitos de animais de menor idade mostram menor competência para desenvolvimento de embriões transferíveis que de animais de idade mais avançada, mesmo que em poucas semanas, e também maior quantidade de oócitos de qualidade inferior (TERVIT et al., 1997).

Entre 3 e 4 meses de idade ocorre um aumento na secreção de gonadotrofinas em novilhas pré-púberes, associado com aumento no número de grandes folículos ovarianos e no diâmetro do maior folículo (EVANS; CURRIE; RAWLINGS, 1992; EVANS ; RAWLINGS, 1995), e esse pode ser um dos fatores que influenciam na qualidade dos oócitos coletados em animais jovens.

Esse aumento da secreção de gonadotrofinas deve ser acompanhado pelo aumento da concentração dos receptores para esses hormônios, para que as células foliculares adquiram a competência para o desenvolvimento e maturação, que permitam a fecundação dos oócitos. Mudanças na expressão de receptores estão associadas com diferentes estágios do crescimento e atresia foliculares. Normalmente a expressão de receptores para gonadotrofinas e enzimas esteroidogênicas aumenta com o desenvolvimento do folículo atingindo o pico quando o folículo chega ao maior diâmetro próximo à ovulação (BAO et al., 1997; EVANS ; FORTUNE, 1997; BAO ; GARVERICK, 1998; ABDENNEBI et al., 1999).

Desse modo, este trabalho objetivou semi-quantificar a expressão gênica para receptores de gonadotrofinas nas células foliculares em animais pré-púberes (bezerras) das raças Nelore e Marchigiana e novilhas púberes da raça Nelore, buscando diferenças que possibilitem a procura de respostas para a deficiência da competência de desenvolvimento dos oócitos de animais pré-púberes, que permitam a utilização destes em programas de melhoramento genético animal.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivos gerais

- Incrementar programas de melhoramento genético bovino;
- Procurar respostas para a deficiência da competência de desenvolvimento dos oócitos de animais pré-púberes.

1.1.2 Objetivos específicos

- Comparar a expressão gênica semi-quantitativa do receptor do hormônio folículo estimulante em células de folículos dominantes de animais pré e pós-púberes da raça Nelore;
- Comparar a expressão gênica semi-quantitativa do receptor do hormônio luteinizante em células de folículos dominantes de animais pré e pós-púberes da raça Nelore;
- Comparar a expressão gênica semi-quantitativa do receptor do hormônio folículo estimulante em células de folículos dominantes de animais pré-púberes das raças Nelore e Marchigiana;

- Comparar a expressão gênica semi-quantitativa do receptor do hormônio luteinizante em células de folículos dominantes de animais pré-púberes das raças Nelore e Marchigiana;
- Encontrar e semi-quantificar a expressão gênica dos receptores de gonadotrofinas em células do tecido hipofisário de animais pré e pós-púberes das raças Nelore e Marchigiana.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os oócitos, em mamíferos, de maneira geral, entram em meiose no estágio de vida fetal e permanecem bloqueados em estágio de prófase da primeira divisão meiótica (vesícula germinal). A continuidade do desenvolvimento destes oócitos e a maturação meiótica iniciam a partir de estímulos provocados pela presença de gonadotrofinas circulantes. Este desenvolvimento envolve a ruptura da vesícula germinal e progressão através da metáfase I, anáfase e telófase, até a extrusão do primeiro corpúsculo polar e o bloqueio na fase de metáfase II. Em adição a estas alterações nucleares, os oócitos sofrem também alterações citoplasmáticas necessárias para a fertilização e o subsequente desenvolvimento embrionário (MOCHIZUK; FUKUI; ONO, 1991). Estas alterações envolvem rearranjo estrutural de organelas citoplasmáticas (CRAN, 1985; CRAN; CHENG, 1986) e, principalmente, alterações no perfil de proteínas sintetizadas (KASTROP et al., 1990; MOOR; CROSBY, et al., 1986; WU et al., 1996).

Entretanto a competência para o desenvolvimento de oócitos obtidos a partir de bezerras tem apresentado menores taxas de desenvolvimento de embriões após FIV quando comparadas com vacas adultas. Embora as taxas de fertilização e clivagem inicial apresentem níveis semelhantes aos encontrados em vacas, pequenas quantidades de blastocistos têm sido alcançadas e podem ser somadas a altas taxas de perda embrionária após a transferência dos embriões (DAMIANI et al., 1996; DEKKERS, 1992; KHATIR et al., 1996; REVEL et al., 1995). A utilização de oócitos de animais jovens pode diminuir a eficiência de um programa de fertilização

in vitro, apesar de seu potencial para aumentar ganho em programas de melhoramento genético (PALMA; TORTONESE; SINOWATZ, 2001).

O crescimento dos folículos ovarianos em bovinos ocorre de maneira cíclica, em um padrão semelhante a ondas, sendo que uma onda de crescimento folicular compreende o desenvolvimento conjunto de um grupo de folículos recrutados num mesmo momento (GINTHER et al., 1996). A dinâmica folicular ovariana em bovinos *Bos primigenius indicus* é caracterizada pela ocorrência de dois, três, ou algumas vezes, por quatro ondas de crescimento folicular (BÓ; BARUSELLI; MARTÍNEZ, 2003).

O início do crescimento de cada onda folicular é precedido por um aumento transitório de FSH (BAO; GARVERICK, 1998; BODENSTEINER et al., 1996; EVANS; FORTUNE, 1997), o qual declina após o início do aparecimento da onda de folículos. Estes folículos crescem por 36 a 48 horas (entre 8 e 9 mm de diâmetro), momento que ocorre a seleção de um folículo, que se diferencia dos demais pela capacidade de continuar seu crescimento e passa a ser chamado de folículo dominante (BAO; GARVERICK, 1998). O FSH se mantém importante até o início do crescimento do folículo antral, um pouco antes da divergência (seleção do folículo dominante), sendo que após este evento o FSH volta a concentrações basais na circulação (BAO; GARVERICK, 1998; BODENSTEINER et al., 1996).

Em espécies monovulatórias como a bovina, durante este crescimento apenas um folículo é selecionado para continuar o seu desenvolvimento e chegar à ovulação. Este folículo passa a exercer o efeito de dominância, caracterizando ação parácrina sobre os demais folículos recrutados, que entram em processo de atresia via apoptose. A secreção de estradiol e inibina, pelo folículo dominante causa

redução na concentração plasmática de FSH, até níveis insuficientes para o crescimento e manutenção dos folículos subordinados (MIHM et al., 2002).

Após a seleção folicular, o destino do folículo dominante depende da prevalência do padrão dos pulsos de LH, ou seja, em um ambiente hormonal caracterizado por pulsos freqüentes de LH o folículo dominante atinge a maturação final e culmina com a ovulação. Se os pulsos de LH não são freqüentes, o folículo dominante se torna atrésico e uma nova onda folicular se desenvolve (MIHM et al., 2002).

Segundo Silcox, Powell e Kiser (1993) o desenvolvimento do folículo dominante é dividido em três categorias: fase de crescimento, fase estática e fase de regressão. Na primeira onda de crescimento folicular, a fase de crescimento vai desde a emergência da onda até em torno do oitavo dia após o estro; a fase estática ocorre entre o oitavo e décimo dia e, a fase de regressão ocorre após o décimo dia. Ao redor do décimo dia do ciclo estral começa a segunda onda de crescimento folicular e o processo se reinicia.

Após a divergência, o LH torna-se mais importante para o desenvolvimento, a maturação e o crescimento final do folículo dominante, sendo que este hormônio passa a apresentar um aumento na freqüência de pulsos aumentando as concentrações basais (BAO; GARVERICK, 1998).

Uma evidência que o aumento da freqüência de pulsos de LH é importante no final do crescimento e desenvolvimento folicular foi demonstrado por Sirois e Fortune (1990), onde a dominância folicular foi mantida por um maior período quando vacas foram tratadas com baixas concentrações de progesterona e alta freqüência de pulsos de LH.

Além disso, as gonadotrofinas têm estreita relação com os hormônios esteróides, pois potencializam a atividade das enzimas que sintetizam os mesmos, sendo que o FSH estimula a atividade da aromatase (que converte andrógeno em estradiol) nas células da granulosa, e o LH estimula a atividade da citocromo 17 α hidroxilase (que converte progestágenos em andrógenos) nas células da teca (BAO; GARVERICK, 1998).

Entre o nascimento e a puberdade, os folículos iniciam seu desenvolvimento, seguidos pela atresia em um padrão cíclico, no qual um folículo adquire a dominância sobre os demais na onda folicular, mas entram em atresia, sem ocorrer ovulação, seguida pela emergência de uma nova onda folicular. Durante a puberdade, que em bovinos ocorre entre 10 e 12 meses de idade, os folículos continuam a entrar sucessivamente em ondas de crescimento e atresia, assim como ocorre durante a fase pré-púbere, mas com intervalos maiores entre o surgimento das sucessivas ondas e maior concentração de atividade de síntese de estrógenos nos folículos dominantes (EVANS; ADAMS; RAWLINGS, 1994).

O aumento nas concentrações de estrógenos resulta em troca da ação de feedback negativo para positivo no eixo hipófise-hipotálamo, resultando em aumento de secreção de LH, aumentando a frequência dos pulsos, culminando num pico de LH que estimula a progressão da meiose e a ovulação do folículo dominante (ARMSTRONG, 2001). A mudança na resposta do hipotálamo ao estradiol, de feedback negativo para positivo está relacionada a uma diminuição na sensibilidade do hipotálamo, envolvendo diminuição nos receptores para estradiol (DAY et al, 1984; DAY et al., 1987; RODRIGUES; KINDER; FITZPATRICK, 2002).

A ação do FSH é mediada por receptores de membrana específicos. Simoni, Gromoll e Nieschlag (1997) descreveram modelo das vias de transdução do

sinal do FSH. No momento em que este hormônio se liga a seu receptor na membrana plasmática, ocorre a dissociação da subunidade α da proteína G estimulatória ($G_s \alpha$). Juntamente com o guanosina 5-trifosfato (GTP), este complexo ativa diretamente a adenil ciclase (AC), promovendo a síntese do adenosina monofosfato cíclico (AMPc). O AMPc ativa a proteína kinase A (PKA) que causará a dissociação da subunidade catalítica da subunidade regulatória (R). O sítio catalítico ativo pode ativar proteínas por fosforilação. Por outro lado, a produção de AMPc promove aumento intracelular de Ca^{+2} , devido à abertura de canais de Ca^{+2} . No núcleo, a subunidade de PKA ativa, pode fosforilar fatores de transcrição, iniciando a ação do FSH através da síntese de RNAm de genes de respostas primárias.

A ação intracelular do LHr é mediada por via que envolve a ativação de uma ou mais proteínas triméricas reguladoras, ligadoras de GTP, chamadas de proteína G (MILAZZOTO, 2001). Essa via de sinalização, comum a essa família de receptores, é iniciada pela ligação do hormônio ao seu receptor específico na superfície celular. Evidências experimentais revelam alta semelhança estrutural e funcional desses receptores entre humanos e demais espécies, assim como entre outros receptores da família a que pertencem (a superfamília de receptores ligados à proteína G), com sete regiões transmembrânicas intercaladas por alças intra e extracelulares (DUFAU, 1998).

Essa interação hormônio-receptor causa mudança conformacional do receptor e permite sua interação com a proteína G induzindo sua ativação e fazendo com que a mesma se dissocie da guanosina 5-difosfato (GDP) a que está ligada, substituindo-a pelo GTP. A proteína G hidroliza o GTP convertendo-o novamente em GDP, mas antes disso se difunde para longe do receptor e libera sua mensagem para o alvo seguinte (JIA et al., 1991; STRADER et al., 1994). No caso do LHr, a via

de transdução de sinal inclui tanto a ativação do sistema adenilato ciclase/adenosina monofosfato cíclico (cAMP) quanto o da fosfolipase C/inositol trifosfato (InsP₃), sendo que a via predominante é a da adenilato ciclase. A segunda via pode ser estimulada apenas em certos estágios durante o ciclo ovariano; gerada pelo aumento da estimulação hormonal gonadal (GUDERMANN; BIRNBAUMER; BIRNBAUMER, 1992). O LHr interage primeiramente com a proteína G estimulatória (Gs) através de sua interação com alças intracelulares em conjunção com o domínio carboxi-terminal citoplasmático do receptor (STRADER et al., 1994).

Diversos aminoácidos participam da atividade do receptor no que se refere à sua afinidade com o hormônio, ativação e transdução de sinal. Deleções ou mutações no gene desse receptor podem alterar a interação hormônio/receptor, mudando a transdução do sinal endocrinológico e podendo interferir na gametogênese (AITTOMAKI et al., 1995).

Sistemas utilizados para produção de embriões *in vitro* em bovinos utilizam oócitos coletados a partir de folículos que ainda não completaram seu crescimento e, com isso, podem apresentar certas deficiências em transcritos específicos para o total potencial de desenvolvimento. Aproximadamente 85% dos oócitos ovulados em vacas inseminadas desenvolvem-se em embriões capazes de estabelecer prenhez (ARMSTRONG, 2001), indicando altos níveis de competência para o desenvolvimento de oócitos totalmente maturados e ovulados *in vivo*. Em contraste, para as mais comuns técnicas de produção *in vitro* de embriões utilizadas recentemente, as taxas de embriões transferíveis variam entre 20 e 50% dos oócitos coletados por aspiração transvaginal a partir de folículos não estimulados hormonalmente e maturados *in vitro* (GALLI et al., 2001; 2003; HOSHI, 2003; THATCHER et al., 2001). Os oócitos são recuperados pela aspiração de folículos

não estimulados, que são consideravelmente menores que folículos pré-ovulatórios, e por isso possuem uma menor reserva citoplasmática de fatores necessários para a fertilização e completo desenvolvimento embrionário. Além disso, são recuperados oócitos em estágios desconhecidos do ciclo de desenvolvimento ovariano, e estes oócitos podem estar em diversos estágios de desenvolvimento ou de atresia. O uso de sistemas tratamento com gonadotrofinas que aumentam o crescimento folicular, inibem a atresia e induzem o surgimento do pico de LH para induzir a maturação dos oócitos podem aumentar a eficiência na produção de embriões transferíveis em até 60% (BORDIGNON et al, 1997; VAN DE LEEMPUT et al., 1999).

Dados obtidos por Duby *et al.* (1996) sugerem presença de retardo na maturação de oócitos de animais impúberes em relação a animais adultos, mesmo havendo estimulação dos folículos ovarianos por administração de FSH e HCG, as taxas de penetração espermática encontradas, em vários grupos de tratamento, mostraram-se normais, mas alta taxa de polispermia e fertilização anormal foi encontrada nos oócitos de bezerras. Além destas diferenças, foi encontrada uma menor competência dos oócitos colhidos de bezerras, onde foi obtida pequena taxa de produção de blastocistos (1,6%).

Com o desenvolvimento de eficientes sistemas de produção de embriões *in vitro*, foi possível observar o potencial de desenvolvimento dos oócitos de animais jovens sem confundir com os efeitos da idade do animal sobre o trato genital que influenciam o desenvolvimento embrionário. Cerca de vinte anos após o nascimento do primeiro bezerro a partir de embriões de animais pré-púberes produzidos *in vivo* (SEIDEL et al., 1971), as técnicas de produção de embriões *in vitro* propiciaram o nascimento de animais a partir de oócitos colhidos de animais de três a cinco meses de idade (ARMSTRONG et al, 1992; KAJIHARA et al., 1991). Resultados de várias

investigações subseqüentes avaliaram as diferenças de desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro* a partir de oócitos de bezerras, novilhas pré-púberes e vacas adultas, sempre constatando um menor potencial para produção de embriões e o nascimento de animais com oócitos de animais jovens (DAMIANI et al., 1996; EARL et al., 1998; MERMILLOD et al., 1997; PALMA; CLEMENT-SENCEWALD; KREFFT, 1993; REVEL et al, 1995). Embora a diferença entre os oócitos de animais jovens e adultas, quanto à maturação, fertilização e taxa de clivagem após a fecundação sejam ausentes ou pequenas, menores taxas de blastocistos e altas taxas de perda embrionária precoce após a transferência dos embriões foram encontrados nestes estudos (DAMIANI et al., 1996; DUBY et al., 1996; KHATIR et al., 1996; LEVESQUE; SIRARD, 1994; REVEL et al, 1995; TERVIT et al., 1997). Estas observações indicam as deficiências citoplasmáticas dos oócitos de bezerras que resultam seu baixo ou incompleto potencial de desenvolvimento.

O provável motivo para esta deficiência na competência de oócitos de bezerras é a incapacidade de se obter a completa maturação do citoplasma (ooplasma), que gera deficiências para a sobrevivência dos zigotos pós-fertilização e para a divisão celular (DAMIANI et al., 1996; ARMSTRONG, 2001; PAZ et al., 2001; SALAMONE et al., 2001).

Outros motivos encontrados são diferenças no metabolismo de glicose, piruvato e glutamina (STEEVES; GARDNER, 1999; STEEVES et al., 1999) e no padrão de síntese de proteínas (GANDOLFI et al., 1998; KHATIR; LONERGAN; MERMILLOD, 1998). O padrão de proteínas encontrado em ovócitos de bezerras é significativamente diferente do padrão encontrado em ovócitos de vacas adultas e interferiram significativamente na produção de embriões ao estágio de mórula (LÉVESQUE; SIRARD, 1994).

Algumas anormalidades durante o processo de meiose estão relacionadas à idade das doadoras, e entre elas podemos citar a incompetência ou inabilidade de prosseguir ou completar a maturação meiótica resultando em oócitos incompetentes para a fecundação, e alterações durante a maturação que são compatíveis à fecundação mas levam a anormalidades genéticas que comprometem a viabilidade embrionária e podem levar a abortos espontâneos e anomalias fetais (ARMSTRONG, 2001). A competência meiótica é adquirida quando os oócitos acumulam moléculas regulatórias do ciclo celular em quantidades suficientes para permitir a progressão da meiose. Este fator está diretamente correlacionado com o tamanho do oócito, que está relacionado ao tamanho do folículo em crescimento. Partindo do princípio que oócitos de animais muito jovens são geralmente menores que oócitos de animais adultos, torna-se difícil separar os efeitos da idade da doadora e da aquisição de competência destes oócitos relacionada ao diâmetro folicular (ARMSTRONG, 2001).

Estudos detectaram diferenças no padrão de proteínas sintetizadas nas células de cumulus-oócitos de bezerras e vacas adultas durante a maturação, demonstrando a presença de proteínas específicas para cada estágio de desenvolvimento do folículo e do oócito relacionadas com a idade da doadora, que podem estar envolvidas na deficiência de competência de oócitos de bezerras (KHATIR; LONERGAN; MERMILLOD, 1998).

Estas alterações na maturação citoplasmática podem ser expressas através de falha na penetração e descondensação espermática, incapacidade de formação do pró-núcleo masculino, falha no bloqueio da polispermia, falha no início da clivagem, incapacidade de alcançar ou transpor a transição da expressão genômica maternal para a embrionária, ou ainda problemas de desenvolvimento que

levam à perda embrionária precoce nos estágios de desenvolvimento pré ou pós-implantacional (ARMSTRONG, 2001).

Estudos de Palma, Tortonese e Sinowatz (2001) com bezerras abatidas não tratadas com gonadotrofinas, detectaram baixa proporção de oócitos viáveis para fertilização *in vitro* em relação a vacas adultas, mas a suplementação com altas concentrações de FSH durante a maturação pode aumentar as taxas de embriões produzidos.

Avaliando o padrão de proteínas produzidas *in vitro* por folículos de diferentes diâmetros de bezerras de três meses de idade, comparando com seus respectivos diâmetros foliculares de vacas adultas, foram encontradas diferenças significativas na quantidade de subunidades α -inibina, ausente no fluido folicular produzido em bezerras. Neste mesmo estudo, através de eletroforese bi-dimensional, foi detectado a presença de quinze “spots” de proteínas produzidas pelas células foliculares de bezerras, e também três proteínas mais expressas em folículos de vacas adultas (DRIANCOURT; REYNALD; SMITZ, 2001). A maneira como essas diferenças podem afetar o potencial de desenvolvimento dos oócitos de bezerras, ainda é um fator que necessita estudos mais detalhados.

A atividade de MPF (fator promotor de maturação), MAPK (proteína quinase de ativação mitogênica) e IP₃R (receptor de inositol tri-fosfato), três importantes indicadores de maturação oocitária, de oócitos de bezerras com menos de seis meses, foi comparada com oócitos coletados de vacas adultas, por Salamone et al. (2001). Foram constatadas uma menor concentração e atividade destes fatores, que indicam uma deficiência ou incapacidade apresentada pelos oócitos de bezerras em completar a maturação ooplásmica.

As células da granulosa completam seu processo de diferenciação durante o crescimento e maturação dos folículos ovarianos. Parte deste processo é a aquisição de receptores para o FSH no início do crescimento folicular. A indução de receptores para FSH e LH nas células da granulosa é um passo crítico na fisiologia reprodutiva após o desvio, ou seja, a fase de seleção do folículo dominante (MINEGISHI et al., 1997, 1999).

Mudanças na expressão de receptores estão associadas com diferentes estágios do crescimento e atresia foliculares. Normalmente a expressão de receptores para gonadotrofinas e enzimas esteroidogênicas aumenta com o desenvolvimento do folículo atingindo o pico quando o folículo chega ao maior diâmetro próximo à ovulação (ABDENNEBI et al., 1999; BAO et al., 1997; EVANS; FORTUNE, 1997; BAO; GARVERICK, 1998). A expressão de receptores para FSH foi localizada especificamente nas células da granulosa (BAO et al., 1997; BAO; GARVERICK, 1998). O FSH e o estradiol induzem a síntese de receptores de LH na membrana das células da granulosa também durante estágios avançados de desenvolvimento folicular (BAO et al., 1997; BAO; GARVERICK, 1998; XU et al., 1995).

O folículo dominante tem quantidade abundante de RNAm para LHR nas células da granulosa, e isto pode permitir respostas tanto para FSH quanto para LH, porque estes dois hormônios dividem o mesmo sistema de segundo mensageiro pós-receptor para suas ações (BAO et al., 1997; BAO; GARVERICK, 1998; XU et al., 1995; GINTHER et al., 2001).

Animais pré-púberes estimulados com FSH e doses intra-ovarianas de IGF-1 demonstraram quantidades inferiores de oócitos considerados competentes para o desenvolvimento quando comparados com vacas adultas (OROPEZA et al.,

2004). As taxas de produção de blastocistos destes grupos foi semelhante, superiores à de animais pré-púberes estimulados apenas com FSH ou com FSH e tratadas com somatotropina bovina recombinante (bST), demonstrando que a injeção intra-ovariana de IGF-1, aliada ao tratamento superovulatório com FSH, pode, parcialmente, suprir a deficiência no potencial de desenvolvimento de oócitos dos animais pré-púberes (OROPEZA et al., 2004).

Utilizando as técnicas de RT-PCR semi-quantitativo e de Western blot, Nuttinck et al. (2004) investigaram a expressão temporal e espacial dos genes do sistema IGF e de receptores de gonadotrofinas em complexos cumulus-oócitos de animais adultos durante a maturação *in vitro*. Foram encontrados transcritos para FSHr somente em células do cumulus oophorus de oócitos.

Animais de origem taurina (*Bos primigenius taurus*) são melhor adaptados à regiões de clima temperado que animais *Bos primigenius indicus* (zebuínos) enquanto estes últimos são melhor adaptados às regiões de clima tropical (ELZO et al., 1990a,b; HETZEL, 1987). A adaptação também envolve algumas diferenças fisiológicas (RANDEL, 1984), tais como a puberdade ocorrer em idades mais avançadas em animais zebuínos do que em taurinos.

Existem algumas diferenças na dinâmica folicular entre raças zebuínas e européias, principalmente quanto ao diâmetro máximo do folículo dominante, onde as raças zebuínas apresentam de 10 a 12 mm de diâmetro, observado em novilhas Nelore e Brahman (FIGUEIREDO et al., 1997; RHODES; DE'ATH; ENTWISTLE, 1995) e as raças européias apresentam de 14 a 20 mm (ADAMS et al, 1993; GINTHER et al., 1989; KASTELIC; BERGFELT; GINTHER, 1990).

Bó, Baruselli e Martínez (2003) relataram que a dominância folicular é semelhante entre zebuínos e taurinos, mas há diferença no diâmetro máximo do

folículo dominante e do corpo lúteo em favor das raças taurinas, e que se deve à baixa secreção de LH das raças zebuínas.

Outra importante diferença é o padrão de crescimento do folículo ovulatório e folículos dominantes, que foram menores (aproximadamente 0,92 mm/dia) em vacas Nelores (FIGUEIREDO et al., 1997), quando comparados com vacas de raças européias que tem aproximadamente 1,6 mm de crescimento ao dia (SIROIS; FORTUNE, 1988).

Baseado nestes achados de literatura foi realizado este trabalho, que visou estudar a presença de possíveis diferenças entre os animais pré-púberes e adultos, no que se refere à expressão gênica dos receptores de gonadotrofinas em células dos folículos dominantes (pré-ovulatórios) destes animais, buscando um maior esclarecimento sobre o papel das gonadotrofinas e seus receptores no desenvolvimento dos folículos, relacionando com o potencial para o desenvolvimento dos oócitos dos animais pré-púberes após a fertilização *in vitro*. Também foi avaliado um possível efeito da raça sobre a expressão gênica dos receptores de gonadotrofinas, visando esclarecer as diferenças existentes entre os animais de origem taurina e zebuína, que contribua para programas de melhoramento genético animal.

Material e Método

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Animais e local de realização dos experimentos

Foram utilizadas seis novilhas, sendo três da raça Nelore e três da raça Marchigiana, todas com sete meses de idade (pré-púberes), e duas novilhas Nelore com 25 meses de idade (púberes), provenientes da Fazenda Santa Cecília, localizada no município de Araçatuba, SP, região noroeste do estado de São Paulo.

A parte laboratorial do experimento foi realizada nas dependências do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal (LBBMA), localizado na Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP (Universidade Estadual Paulista), Campus de Araçatuba, localizado no município de Araçatuba, SP.

3.2 Acompanhamento da dinâmica folicular, determinação do diâmetro máximo de desenvolvimento dos folículos e coleta das amostras

Foi realizado acompanhamento da dinâmica folicular através de exames ultra-sonográficos diários (a partir dos quatro meses de idade para as novilhas pré-púberes e dos 22 meses de idade para as novilhas púberes) utilizando o equipamento de ultra-sonografia GE (General Electric Logic™ α -100 CE 0459; GE

Medical System, Milwaukee, EUA) acoplado a um transdutor linear de 5 MHz para uso transretal. Os exames para avaliação dos ovários foram feitos de acordo com metodologia descrita por GINTHER et al. (1996).

Figura 3.1 - Novilhas utilizadas nos experimentos. A: novilhas da raça Nelore pré-púberes (bezerras Nelore); B: novilhas da raça Marchigiana pré-púberes (bezerras Marchigiana); C: novilhas da raça Nelore púberes (novilhas Nelore).

Durante os três meses de acompanhamento das ondas foliculares nas novilhas, foi possível determinar o diâmetro máximo de crescimento dos folículos ovarianos. Os diâmetros máximos determinados foram 8 mm para as novilhas pré-púberes da raça Nelore, 10 mm para as novilhas pré-púberes da raça Marchigiana e 14 mm para as novilhas púberes.

As novilhas foram abatidas quando seus folículos apresentavam o diâmetro máximo de desenvolvimento e a necropsia foi realizada imediatamente após o sacrifício de cada animal.

Hipófise e o folículo dominante foram coletados de cada animal, através de dissecação dos tecidos cerebrais e ovarianos realizada no laboratório; em seguida foram armazenados em frascos criogênicos e congelados em nitrogênio líquido para posterior extração de RNA total.

3.3 Extração de RNA total

O isolamento do RNA das células do complexo cumulus-oócito foi realizado em duas amostras por vez, para facilitar o manuseio e evitar degradação do RNA e perda de amostras, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante do kit TRIzol Reagent® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), com pequenas alterações descritas a seguir.

Os tecidos dissecados foram retirados do nitrogênio líquido e triturados, com o auxílio de nitrogênio líquido, em cadinhos específicos, para lisar as células,

evitando-se a degradação do RNA. As amostras foram pesadas, e o protocolo de TRIzol foi adaptado para cada amostra conforme a quantidade de tecido presente.

Adicionou-se a quantidade necessária de TRIzol às amostras, fazendo uma completa homogeneização destas, através de repetidas pipetagens ou, quando necessário, utilizando-se de um vórtex.

Após a homogeneização total das amostras, estas foram deixadas à temperatura ambiente por 5 minutos para haver a total dissociação das nucleoproteínas. Adicionou-se clorofórmio a cada amostra, agitou-se vigorosamente, como as mãos por 15 segundos e em seguida as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 2 minutos.

A seguir, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g a 4°C por 15 minutos. Após a centrifugação, foi retirada a parte superior da fase aquosa dos tubos, que é a fase que contém todo o RNA das amostras, que foram transferidos para novos tubos de 1,5 mL. A estes tubos foram adicionados isopropanol, e em seguida foram incubados em gelo por 10 minutos.

As amostras foram então novamente centrifugadas a 12.000 g a 4°C por 10 minutos, e em seguida o sobrenadante foi retirado por reversão do tubo. Foi adicionado etanol 75% em água tratada com DEPC (dietil pirocarbonato), os “pellets” foram eluídos utilizando-se um vórtex.

Em seguida as amostras foram centrifugadas a 7.500 g a 4°C por 5 minutos, e o sobrenadante foi retirado por inversão do tubo. Os tubos foram deixados para secagem à temperatura ambiente, por 10 minutos, tomando-se o cuidado de não permitir a secagem completa do pellet, que dificultaria a sua eluição a seguir.

Logo após este período para secagem do etanol, foi adicionado tampão TE (Tris-EDTA); os “pellets” foram dissolvidos com o auxílio breve de um vórtex, e as amostras foram colocadas em banho-maria a 56°C por 10 minutos, para total eluição do RNA total extraído.

Após 10 minutos, para garantir a remoção de qualquer resquício de DNA contaminante presente nas amostras, estas foram tratadas com DNase (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA), adicionando-se Dnase em cada amostra, que foi incubada em banho-maria a 37°C por 10 min.

Após o tratamento com Dnase, as amostras foram armazenadas em freezer a -80°C até o momento de quantificação do RNA total e síntese da fita de DNA complementar (cDNA) para análise da expressão dos genes desejados.

3.4 Quantificação do RNA total

Para utilização do RNA total nos experimentos de análise de expressão gênica, foi necessária a quantificação do RNA total extraído, para padronizar a concentração e a quantidade de RNA a ser utilizada. Para isso, utilizou-se um espectrofotômetro UV/VIS Spectrometer Lambda Bio 10, (Perkin Elmer, CT, EUA).

Foram adicionados 2 µL de cada amostra em 748 µL de água DEPC, em tubos de 1,5 mL que depois foram transferidos para a cubeta de leitura; as amostras foram lidas no espectrofotômetro, em programa específico para quantificação de RNA (onda de 260 nm de comprimento). A qualidade das amostras de RNA foi avaliada em gel de agarose desnaturante de formaldeído a 1% e por meio da análise

da razão espectrofotométrica DO_{260}/DO_{280} . O índice DO_{260}/DO_{280} foi considerado adequado quando esteve acima de 1,8, indicando tratar-se de boa extração sem a presença de contaminação por proteínas.

3.5 Síntese do DNA complementar

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi feita através da reação de transcriptase reversa utilizando-se o kit High-Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems, EUA), seguindo protocolo e reagentes recomendados pelo fabricante.

O processo de síntese do cDNA foi realizado em uma simples etapa, visando obter um volume final de 20 μ L para cada reação. Após a quantificação do RNA total, foi colocado 1 μ g de RNA em um tubo de 200 μ L e completou-se o volume para 10 μ L.

Foi preparada uma solução (chamada “mix”), com volume relativo ao número de amostras. Para cada amostra, foi preparado um mix com 2 μ L de 10X RT Buffer, 0,8 μ L de 25X dNTP mixture, 2 μ L de 10X Random Primers, 1 μ L da enzima MultiScribe RT (que corresponde a 5 unidades), e 4,2 μ L de água DEPC. Em seguida, 10 μ L deste “mix” são adicionados às amostras, que são então incubadas em duas etapas; a primeira, a 25°C por 10 minutos e a segunda, a 37°C por 2 horas, para síntese do cDNA.

Após a reação de síntese, as amostras foram estocadas a -20°C, em freezer, até o momento das reações de RT-PCR semiquantitativo.

As reações de síntese de cDNA foram repetidas 4 vezes a partir das amostras iniciais de RNA total para cada amostra de RNA total obtido de folículo dominante e hipófise de cada animal, sendo estas repetições chamadas de “rt-pcr”, por serem consideradas fontes de cDNA para as reações de Duplex-PCR descritas a seguir.

3.6 Amplificação do cDNA para análise semi-quantitativa da expressão gênica

Para a realização da análise semi-quantitativa da expressão gênica, foi necessária a amplificação do cDNA através de reação em cadeia pela polimerase (PCR) utilizando-se uma quantidade padronizada de material das amostras.

Foram desenhados três pares de oligonucleotídeos iniciadores, sendo um par para o *gapdh*, outro par para o gene *fshr* e outro par para o gene *lhr*. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram desenhados utilizando-se a sequência de nucleotídeos de bovinos (*Bos primigenius taurus*) depositada no GEN BANK, seguindo método descrito por Pereira, 2003. A sequência dos oligonucleotídeos, também chamados “primers”, esta descrita na Tabela 3.1.

A partir de cada produto de cDNA de cada animal, foram realizadas três reações de *duplex-PCR*, contendo oligonucleotídeos iniciadores para os genes alvo (*fshr* ou *lhr*) e o gene controle (*gapdh*), para avaliação dos produtos em eletroforese em gel de poliácridamida e avaliação da expressão relativa dos genes alvos.

O *gapdh* (gliceraldeído-fosfato desidrogenase) é um gene constitutivo, pertencente a uma classe de genes também chamados de “housekeeping genes”, que são expressos em quantidades iguais em praticamente todas as células do organismo. O *gapdh* já foi utilizado como referência em outros trabalhos (SMITH et al., 1996; ABDENNEBI et al., 2002), e por isso para cada gene em estudo foram adicionados na mesma reação de amplificação os oligonucleotídeos iniciadores para *gapdh*, aproveitando que tanto os oligonucleotídeos iniciadores para *fshr* como *lhr*, amplificavam nas mesmas condições de reação que o *gapdh*.

Tabela 3.1 – Seqüência dos pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para padronização do RT-PCR semi-quantitativo.

Gene	Exon	Seqüência	Fragmento
<i>gapdh</i>	4	5' AGTGGGGTGATGCTGGTGCTGAGTA 3'	540 pb
	7	5' ACGCCTGCTTCACCACCTTCTTGAT 3'	
<i>fshr</i>	9	5' GCTGCGGGCCAAGTCAACTTACCGC 3'	327 pb
	10	5' GCGTCTGGCTCAGGGGAGCAAGTCA 3'	
<i>lhr</i>	9	5' CCCAGCCACTGCTGTGCTTTTAGA 3'	232 pb
	11	5' GGGATTGAAAGCATCTGGTTCAGGA 3'	

Para cada reação, foram utilizados 2 µL de cDNA, para uma reação com volume final de 50 µL. Foram preparados soluções chamadas “mix”, contendo 5 µl de dNTP (1,25 mM de cada, Invitrogen Life Technologies, CA, USA), 5 µl de tampão

10X concentrado para Taq DNA polimerase (concentração final – 200mM Tris-HCl, 50mM KCl) (Invitrogen Life Technologies, CA, USA), 27,5 µl de água ultra-pura q.s.p., 2 µl de MgCl₂ (25mM), 2 µl dos oligonucleotídeos iniciadores para o exon 4 e 7 do *gapdh*, 2 µl dos oligonucleotídeos iniciadores para os exons 9 e 10 do *fshr* ou oligonucleotídeos iniciadores do exon 9 e exon 11 do gene *lhr* para os (sendo 10 pM a concentração de todos os oligonucleotídeos iniciadores) e 0,5 µl ou 2,5 unidades (U) de Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, CA, USA).

As condições de reação foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguido de 36 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 70°C por 30 s e extensão a 72°C por 2 min. Para a padronização do número de ciclos para os dois duplex (*gapdh-lhr* e *gapdh-fshr*) foram colocadas seis amostras no termociclador, e foi retirada uma amostra a cada 2 ciclos a partir do 26º ciclo até completar os 36 ciclos. Após o término dos ciclos, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%, 100 mA, por duas horas (Electrophoresis Power Supply Model 250 EX/Gibco BRL, MD, USA), sendo coradas com SYBR® Green logo a seguir, por 10 minutos.

Um exemplo dos géis utilizados para a padronização do número de ciclos está representado na Figura 3.2.

Estes géis foram submetidos ao programa de análise digital (Kodak Digital Science, SP 700 Color Printer, Scientific Imaging Systems, NY, USA) onde foi avaliada a intensidade média (em pixels) de cada banda, e assim foi possível padronizar o 28º ciclo o duplex *gapdh-lhr*, e o 32º para o duplex *gapdh-fshr* para as amostras de folículos dominantes, pois nestes ciclos a intensidade das bandas apresenta uma curva ascendente de aumento da intensidade, demonstrada através de construção de gráficos, representados nos Gráficos 3.1 e 3.2.

Figura 3.2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%, corado com SYBR Green, para padronização do número de ciclos de amplificação para análise da expressão gênica nos Duplex-PCR *gapdh-fshr* e *gapdh-lhr*. PM: peso molecular ϕ X174 RF DNA/*Hae* III Fragments; LM: Low DNA Mass Ladder, 2 μ L (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA); 26 a 36: produto de duplex-PCR para *gapdh-fshr* e *gapdh-lhr*, indicando o número de ciclos de PCR utilizados; CN: controle negativo. Araçatuba, SP, 2005.

Com a quantidade de RNA e o número de ciclos padronizados, foram feitas as reações para comparar a expressão dos genes nos folículos dominantes entre os animais estudados. A partir de cada produto de síntese de cDNA foram feitas três reações (repetições) de duplex-PCR para os genes *fshr* e *lhr*. Cada reação resultou de produtos que foram utilizados para eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%, como demonstrado nas Figuras 3.3 e 3.4.

Gráfico 3.1 - Valores de intensidade média das bandas dos produtos de duplex-PCR dos genes *gapdh* e *lhr* em folículos dominantes por número de ciclos de amplificação.

Gráfico 3.2 - Valores de intensidade média das bandas dos produtos de duplex-PCR dos genes *gapdh* e *fshr* em folículos dominantes por número de ciclos de amplificação.

Os géis foram fotografados, e as intensidades médias das bandas (em pixels) foram obtidas. Para cada gel, três imagens foram armazenadas. A relação entre os genes (expressão gênica semi-quantitativa) foi retirada através da divisão dos valores de intensidade média das bandas correspondentes aos genes alvos (*lhr* e *fshr*) pela intensidade média da banda respectiva do gene controle (*gapdh*).

Durante a realização deste estudo, na análise dos géis de poliacrilamida para semi-quantificação da expressão do gene *lhr*, foi detectada a presença de uma terceira banda de DNA em cada amostra, que seguia os mesmos padrões para todos os animais e apresentavam comportamento e intensidade relacionados à banda do gene *lhr*. Foi feito o seqüenciamento deste fragmento de DNA e descobriu tratar-se de um “*splicing*” alternativo do próprio gene do *lhr*, decorrente de alteração do gene no momento da produção da simples fita de RNA mensageiro. Esta apresentação diferente deste gene, aqui chamada de *lhr-alt*, foi encontrada e descrita em estudo publicado anteriormente por Pereira (2003) em sua dissertação de mestrado intitulada “Semi-quantificação de RNAm para receptores de gonadotrofinas em folículos de novilhas Nelore (*Bos primigenius indicus*)”.

Neste estudo, o gene *lhr-alt* foi analisado para verificar seu comportamento em relação ao gene *lhr*, no que se refere à expressão gênica semi-quantitativa nos animais deste experimento, e foi analisado como um terceiro gene alvo destas análises, mas foi dada maior importância aos genes *lhr* e *fshr*, que fazem parte dos objetivos deste trabalho.

Figura 3.3 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% corado com SYBR® Green com produtos de duplex-PCR *gapdh-lhr* em folículos dominantes. PM: peso molecular ϕ X174 RF DNA/*Hae* III Fragments; LM: Low DNA Mass Ladder, 2 μ L (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA); N1, N2 e N3: bezerras da raça Nelore; M1, M2 e M3: bezerras da raça Marchigiana; P1 e P2: novilhas da raça Nelore; CN: controle negativo. Araçatuba, SP, 2005.

Figura 3.4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% corado com SYBR® Green com produtos de duplex-PCR *gapdh-fshr* em folículos dominantes. PM: peso molecular ϕ X174 RF DNA/*Hae* III Fragments; LM: Low DNA Mass Ladder, 2 μ L (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA); N1, N2 e N3: bezerras da raça Nelore; M1, M2 e M3: bezerras da raça Marchigiana; P1 e P2: novilhas da raça Nelore; CN: controle negativo. Araçatuba, SP, 2005.

Figura 3.5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% corado com SYBR® Green com produtos de duplex-PCR *gapdh-lhr* em amostras de tecido hipofisário. PM: peso molecular ϕ X174 RF DNA/*Hae* III Fragments; LM: Low DNA Mass Ladder, 2 μ L (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA); N1, N2 e N3: bezerras da raça Nelore; M1, M2 e M3: bezerras da raça Marchigiana; P1 e P2: novilhas da raça Nelore; CN: controle negativo. Araçatuba, SP, 2005.

Figura 3.6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% corado com SYBR® Green com produtos de duplex-PCR *gapdh-fshr* em amostras de tecido hipofisário. PM: peso molecular ϕ X174 RF DNA/*Hae* III Fragments; LM: Low DNA Mass Ladder, 2 μ L (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA); N1, N2 e N3: bezerras da raça Nelore; M1, M2 e M3: bezerras da raça Marchigiana; P1 e P2: novilhas da raça Nelore; CN: controle negativo. Araçatuba, SP, 2005.

3.7 Análise dos resultados

Para avaliação dos resultados, para cada amostra de folículo dominante, foi feita uma extração de RNA total, do qual foram feitas quatro reações de rt-pcr; a partir de cada produto de rt-pcr, foram realizadas três reações de Duplex-PCR, e a partir destes produtos, foi produzido um gel de poliacrilamida que continha uma amostra de cada animal. Cada gel foi fotografado três vezes para se obter o valor médio de intensidade das bandas de cDNA para cada amostra em cada gel.

Os resultados foram obtidos através da razão do valor de intensidade média da banda do gene alvo (*lhr*, *lhr-alt*, *fshr*) sobre o valor médio de intensidade da banda do gene controle (*gapdh*).

Com todos os resultados obtidos, os dados foram analisados com a utilização do programa de computador Minitab Statistical Software™ (Minitab, Inc., Release 14,0. Copyright© 2005, USA), onde foi possível obter-se:

1. Estatísticas descritivas das variáveis quantitativas
2. Teste t para comparação de amostras independentes
3. Estimativas de intervalo de confiança de 95%
4. Gráficos de valores individuais
5. Gráficos box-plot.

Resultados

4 RESULTADOS

Os resultados estatísticos que são apresentados a seguir referem-se na primeira parte à comparação entre raças (Nelore x Marchigiana). Na parte II são apresentados os resultados decorrentes da comparação entre idades (bezerra X novilha). Essas comparações são feitas tomando três variáveis de interesse, as quais são identificadas a seguir por *lhr*, *lhr-alt* e *fshr*, referentes à expressão dos respectivos genes em folículos dominantes.

Como características da amostra, destaque-se que foram utilizados no experimento três animais da raça Nelore e três da raça Marchigiana. Além disso, conforme descrição metodológica, quatro repetições de síntese de cDNA a partir das amostras de RNA total (rt-pcr) foram realizadas em três réplicas cada, quando foi analisado o *lhr*. Isto significa dizer que o total de amostras (n) é igual a 36, observações que foram consideradas em cada grupo identificado pela raça.

Apenas na análise do gene *fshr* o experimento foi realizado com três repetições de síntese de cDNA (rt-pcr), portanto, ao final foram consideradas n=27 observações.

4.1 Comparação entre bezerras e novilhas da raça Nelore

As tabelas que vêm a seguir (Tabelas 4.1 e 4.2) buscam apontar possíveis relações entre a idade dos animais da raça Nelore e o comportamento dos genes *lhr* e *fshr*.

Na Tabela 4.1, é possível verificar que os valores de expressão semi-quantitativa do gene *lhr* são mais próximos, independente do produto (rt-pcr), quando o animal é mais jovem (bezerras). Note no gráfico de valores individuais (Gráfico 4.1) que os pontos estão agrupados de forma mais compacta e que a amplitude do intervalo de confiança (IC(95%)) é menor. Este aspecto observado nas bezerras está refletido nos valores de desvio padrão e amplitude, os quais são menores nas bezerras. Enquanto os valores de *lhr* variam de 0,71 a 1,68 ($s = 0,29$) nas bezerras, nas novilhas a razão da intensidade da banda varia de 1,57 a 7,22 ($s = 1,81$). As novilhas apresentam também medidas de posição mais altas do que as bezerras ($\bar{x} = 3,33$ e mediana de 2,58 contra $\bar{x} = 1,15$ e mediana de 1,11). Essa diferença está refletida também no gráfico box plot mostrado no Gráfico 4.2.

A Tabela 4.2 traz os resultados decorrentes da aplicação do teste t bilateral para comparação de amostras independentes. Pelos resultados apontados na referida tabela, há evidências de diferença estatisticamente significativa nas médias de bezerra e novilha referente ao gene *lhr* ($P = 0,0001$), e que as novilhas tem maiores valores de expressão gênica relativa que as bezerras da raça Nelore.

Resultados semelhantes foram encontrados para o “alternative *splicing*” do gene *lhr*. Pelos cálculos expostos nas Tabelas 4.1 e 4.2 a dispersão dos valores de *lhr-alt* é menor para bezerras do que para novilhas (vide Gráficos 4.3 e 4.4). Além

disso, há evidências de que as médias sejam diferentes ($P = 0,0001$). Estes pontos tornam as bezerras um grupo de animais mais “previsível” quanto à expressão do gene *lhr*, e do seu derivado, *lhr-alt*. No caso das novilhas, a dispersão compromete a precisão das estimativas nestes genes.

Os resultados apurados para o gene *fshr* revelam que a idade não é um fator de influência na estimação da razão da intensidade da banda ($P = 0,109$). Os cálculos mostrados nas Tabelas 4.1 e 4.2 sugerem que a intensidade da banda para o gene receptor é estatisticamente a mesma que para o gene controle, o que reflete numa razão média próxima de 1 ($\bar{x} = 1,13$ para bezerra e $\bar{x} = 1,04$ para novilha). Com relação à dispersão, vale observar a presença de três *outliers* (vide Gráficos 4.5 e 4.6) nas medidas de *fshr* para bezerras, os quais contribuíram para um leve aumento da dispersão do grupo.

Tabela 4.1 – Estatísticas descritivas associadas à expressão relativa dos genes *lhr*, *lhr-alt* e *fshr*, em folículos dominantes, de bezerras e novilhas da raça Nelore – tamanho da amostra (n); média ($\bar{x}$), desvio padrão (s), mediana e valores extremos (mínimo e máximo). Araçatuba, SP, 2005.

Gene	Grupo	n	$\bar{x} \pm s$	Mediana	mínimo	máximo
<i>lhr</i>	Bezerra	36	1,15±0,29	1,11	0,71	1,68
	Novilha	24	3,33±1,81	2,58	1,57	7,22
<i>lhr-alt</i>	Bezerra	36	0,60±0,37	0,93	0,17	1,68
	Novilha	24	1,78±0,95	2,14	0,71	7,22
<i>fshr</i>	Bezerra	36	1,13±0,20	1,13	0,71	1,64
	Novilha	24	1,04±0,20	1,00	0,72	1,36

Tabela 4.2 – Estatísticas descritivas associadas à expressão relativa dos genes *lhr*, *lhr-alt* e *fshr*, em folículos dominantes, de bezerras e novilhas da raça Nelore – estatística de teste de comparação de amostras independentes e valor P correspondente ao teste de comparação de médias (teste-t). Araçatuba, SP, 2005.

Genes	Grupo	n	$\bar{x} \pm s$	Estatística t	Valor P
<i>lhr</i>	Bezerra	36	1,15±0,29	-5,84	0,0001
	Novilha	24	3,33±1,81		
<i>lhr-alt</i>	Bezerra	36	0,60±0,37	-5,82	0,0001
	Novilha	24	1,78±0,95		
<i>fshr</i>	Bezerra	33	1,11±0,15	1,63	0,109
	Novilha	24	1,04±0,20

Gráfico 4.1 – Gráfico de valores individuais e IC(95%) para a média relativos à expressão semi-quantitativa do gene do receptor do hormônio luteinizante em folículos dominantes de bezerras e novilhas da raça Nelore. Araçatuba, SP, 2005.

Gráfico 4.2 – Gráfico box plot para média de expressão relativa do gene do receptor do hormônio luteinizante em folículos dominantes de bezerras e novilhas da raça Nelore. Araçatuba, SP, 2005.

Gráfico 4.3 – Gráfico de valores individuais e IC(95%) para a média relativos à expressão semi-quantitativa do *splicing* alternativo do gene do receptor do hormônio luteinizante em folículos dominantes de bezerras e novilhas da raça Nelore. Araçatuba, SP, 2005.

Gráfico 4.4 – Gráfico box plot para média de expressão relativa do *splicing* alternativo do gene do receptor do hormônio luteinizante em folículos dominantes de bezerras e novilhas da raça Nelore. Araçatuba, SP, 2005.

Gráfico 4.5 – Gráfico de valores individuais e IC(95%) para a média relativos à expressão semi-quantitativa do gene do receptor do hormônio folículo estimulante em folículos dominantes de bezerras e novilhas da raça Nelore. Araçatuba, SP, 2005.

Gráfico 4.6 – Gráfico box plot para média de expressão relativa do gene do receptor do hormônio folículo estimulante em folículos dominantes de bezerras e novilhas da raça Nelore. Araçatuba, SP, 2005.

4.2 Comparação entre bezerras das raças Nelore e Marchigiana

Conforme mencionado, neste estudo foram consideradas amostras de animais das raças Marchigiana e Nelore, sendo três animais de cada raça. A razão entre a intensidade das bandas definida a partir do gene *lhr*, *lhr-alt*, e a razão definida a partir do gene receptor FSH (*fshr*), comparadas com a intensidade da banda do gene controle, compõem o conjunto de dados envolvidos na análise estatística.

Os resultados mostrados na Tabela 4.3 descrevem quantitativamente características das amostras estudadas segundo cada raça.

Sobre o gene *lhr*, as estatísticas descritivas dão indicativos de que, em média, na raça Marchigiana a expressão deste gene é superior à média estimada para a raça Nelore ($\bar{x} = 1,65$ e $s = 0,53$, para Marchigiana, contra $\bar{x} = 1,15$ e $s = 0,29$, para Nelore). Esta característica foi observada tanto nos valores das médias como de medianas mostradas na Tabela 4.3. Além disso, a dispersão é um outro aspecto importante de se observar. Note na diferença entre os valores extremos (mínimo e máximo) e no desvio padrão que a dispersão é menor na raça Nelore. Esta propriedade pode ser verificada também nos Gráficos 4.7 e 4.8.

Ainda com relação aos resultados apontados na Tabela 4.3, é possível verificar que para o gene *lhr-alt* a situação é um pouco semelhante a do *lhr*, ou seja, também são encontrados valores mais altos de média e mediana para a raça Marchigiana do que para a Nelore. Entretanto, em termos de dispersão, percebe-se que, no caso da Nelore, as medidas de dispersão são maiores. Enquanto para Nelore o desvio padrão foi de 0,37, para Marchigiana, o desvio padrão foi de 0,28.

O gráfico dos valores individuais que é apresentado no Gráfico 4.9 mostra que um animal Nelore comportou-se de maneira um pouco diferente dos demais de mesma raça. Este fato, ilustrado também no Gráfico 4.10, acabou provocando o aumento na dispersão deste grupo de animais.

Quanto ao gene *fshr*, os resultados sugerem que a diferença encontrada nas estatísticas descritivas é pouco significativa. Tanto no Gráfico 4.11 como no Gráfico 4.12 é possível visualizar a semelhança entre as raças no que se refere ao gene *fshr*. Cabe destacar que uma réplica de cada raça se mostrou destoante das demais. Por este motivo, elas aparecem de forma mais isolada nos Gráficos 4.11 e 4.12, e foram chamadas de *outliers*.

A Tabela 4.4 que vem abaixo traz os resultados obtidos nos testes estatísticos (testes de hipóteses). Esses resultados dão evidências de que para os genes *lhr* e *lhr-alt* as diferenças são estatisticamente significantes ($P = 0,001$ e $P = 0,001$ respectivamente). Então, dependendo da raça do animal, pode-se obter uma expressão gênica maior ou menor. O mesmo não ocorre com o gene *fshr*, onde não há evidências de que o comportamento deste gene seja afetado pela raça ($P = 0,077$). Note no Gráfico 4.12 a presença de valores *outliers*, os quais foram excluídos para efeito de cálculos na Tabela 4.4.

Tabela 4.3 – Estatísticas descritivas associadas à expressão relativa dos genes *lhr*, *lhr-alt* e *fshr*, em folículos dominantes, para bezerras das raças Marchigiana e Nelore – tamanho da amostra (n); média ($\bar{x}$), desvio padrão (s), mediana e valores extremos (mínimo e máximo). Araçatuba, SP – 2005

Genes	Raça	n	$\bar{x} \pm s$	Mediana	Mínimo	Máximo
<i>lhr</i>	Marchigiana	36	1,65±0,53	1,51	1,03	2,92
	Nelore	36	1,15±0,29	1,11	0,71	1,68
<i>lhr-alt</i>	Marchigiana	36	0,91±0,28	0,91	0,48	1,54
	Nelore	36	0,60±0,37	0,45	0,17	1,22
<i>fshr</i>	Marchigiana	27	1,15±0,20	1,12	0,80	1,74
	Nelore	27	1,07±0,17	1,08	0,71	1,55

Tabela 4.4 – Estatísticas descritivas associadas à expressão relativa dos genes *lhr*, *lhr-alt* e *fshr*, em folículos dominantes, para bezerras das raças Marchigiana e Nelore, estatística de teste de comparação de amostras independentes e valor P correspondente ao teste de comparação de médias (teste-t). Araçatuba, SP – 2005

Genes	Raça	n	$\bar{x} \pm s$	Estatística t	Valor P
<i>lhr</i>	Marchigiana	36	1,65±0,53	4,97	0,0001
	Nelore	36	1,15±0,29		
<i>lhr-alt</i>	Marchigiana	36	0,91±0,28	3,99	0,0001
	Nelore	36	0,60±0,37		
<i>fshr</i> *	Marchigiana	26	1,13±0,16	1,80	0,077
	Nelore	26	1,05±0,14		

* os cálculos do teste não incluíram os *outliers*.

Gráfico 4.7 – Gráfico de valores individuais e IC(95%) para a média relativos à expressão semi-quantitativa do gene do receptor do hormônio luteinizante em folículos dominantes de bezerras da raça Nelore e Marchigiana. Araçatuba, SP, 2005.

Gráfico 4.8 – Gráfico box plot para média de expressão relativa do gene do receptor do hormônio luteinizante em folículos dominantes de bezerras das raças Nelore e Marchigiana. Araçatuba, SP, 2005.

Gráfico 4.9 – Gráfico de valores individuais e IC(95%) para a média relativos à expressão semi-quantitativa do *splicing* alternativo do gene do receptor do hormônio luteinizante em folículos dominantes de bezerras da raça Nelore e Marchigiana. Araçatuba, SP, 2005.

Gráfico 4.10 – Gráfico box plot para média de expressão relativa do *splicing* alternativo do gene do receptor do hormônio luteinizante em folículos dominantes de bezerras das raças Nelore e Marchigiana. Araçatuba, SP, 2005.

Gráfico 4.11 – Gráfico de valores individuais e IC(95%) para a média relativos à expressão semi-quantitativa do gene do receptor do hormônio folículo estimulante em folículos dominantes de bezerras da raça Nelore e Marchigiana. Araçatuba, SP, 2005.

Gráfico 4.12 – Gráfico box plot para média de expressão relativa do gene do receptor do hormônio folículo estimulante em folículos dominantes de bezerras das raças Nelore e Marchigiana. Araçatuba, SP, 2005.

4.3 Expressão gênica dos receptores de gonadotrofinas em tecido hipofisário

Durante a realização da padronização da quantidade de RNA e do número de ciclos para a realização do duplex-PCR com os produtos de síntese de cDNA produzido a partir de RNA total extraído do tecido hipofisário, não foram encontrados, nas condições descritas neste projeto, produtos de amplificação para os genes alvo, que fossem detectados nos géis de poliacrilamida a 8%. Apesar de terem sido utilizados os mesmos oligonucleotídeos iniciadores, as mesmas condições de reação de PCR-duplex, de síntese de cDNA e de extração de RNA, não foi possível detectar a presença de transcritos para os genes alvos nestes tecidos, somente foi encontrada a presença de transcritos para o gene controle, *gapdh*. O resultado das análises para a expressão gênica em tecido hipofisário está representado nas Figuras 3.5 e 3.6.

Discussão

5 DISCUSSÃO

Este é apenas um primeiro trabalho, resultado de um projeto de pesquisa delimitado em um trabalho de pesquisa muito maior, envolvendo mais e maiores aspectos da fisiologia de animais pré-púberes, realizado por um grupo de jovens pesquisadores. Um dos objetivos deste trabalho é dar indicativos, direções, novos rumos, para estudos mais aprofundados acerca dos processos fisiológicos envolvidos no desenvolvimento folicular e potencial de oócitos dos animais reprodutivamente jovens.

Foi utilizado um número pequeno de animais, que propiciou uma pequena amostragem para fins estatísticos relevantes, mas os indícios de diferenças entre os animais pré e pós-púberes podem ser aproveitados para estudos mais amplos futuros. Estes animais, de grupos fisicamente bem distintos, criados sob as mesmas condições, propiciaram quantidade relevante de informação, e os resultados obtidos sobre a expressão gênica dos receptores de gonadotrofinas, principalmente no que se refere aos folículos dominantes, estão discutidos a seguir, buscando novas alternativas para novas perguntas que ainda precisam de resposta.

Neste estudo, foram encontradas médias de expressão gênica semi-quantitativa maiores para o gene do hormônio luteinizante em novilhas, cuja média da razão entre a intensidade das bandas do *lhr* e do *gapdh* é igual a 3,33, que em bezerras, com média igual a 1,15, ambas da raça Nelore.

Para as bezerras, houve uma menor dispersão dos valores médios de expressão relativa (que variou de 0,71 a 1,68), comparando-se com a expressão apresentada por este gene nas novilhas (variação entre 1,57 e 7,22). Isto indica que

há uma menor variação nos valores de expressão deste gene nas bezerras, que se apresenta em menores níveis do que em novilhas púberes.

Esta menor expressão do receptor de LH nas bezerras é coeso com a maioria dos estudos publicados que visavam estudar o potencial para desenvolvimento dos oócitos após fertilização *in vitro* (ARMSTRONG, 2001; DAMIANI et al., 1996; DUBY et al., 1996; PAZ et al., 2001; SALAMONE et al., 2001; TERVIT et al., 1997), nos quais é referido que a idade das bezerras interfere na onda folicular e no desenvolvimento de embriões *in vitro*. Os oócitos de animais de quatro semanas de idade mostram menor competência para desenvolvimento de embriões transferíveis que oócitos de animais púberes, e um dos prováveis motivos para esta deficiência na competência de oócitos de bezerras é a incapacidade de se obter a completa maturação do citoplasma (ooplasma), que gera deficiências para a sobrevivência dos zigotos pós-fertilização e para a divisão celular.

No desenvolvimento folicular, o FSH se mantém importante até o início do crescimento do folículo antral, um pouco antes da divergência (seleção do folículo dominante), sendo que após este evento o FSH volta a concentrações basais na circulação (BAO; GARVERICK, 1998; BODENSTEINER et al., 1996). Após a seleção folicular, o destino do folículo dominante depende da prevalência do padrão dos pulsos de LH, e da capacidade deste de responder ao freqüentes estímulos de LH (MIHM et al., 2002).

Nos folículos dominantes das bezerras, essa menor expressão gênica de receptores de LH pode influenciar no desenvolvimento destes folículos, que apresentam uma menor capacidade de resposta aos estímulos hormonais que os folículos dominantes de animais púberes. Isso porque toda a cadeia de ações em resposta ao estímulo hormonal pode acontecer em menor intensidade, e o papel

fundamental desenvolvido pelo LH na maturação dos folículos, e conseqüentemente dos oócitos, após a seleção folicular pode estar comprometido.

Durante o período pré-púbere em fêmeas bovinas, o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal é regulado por feedback negativo do estradiol, cuja produção está intimamente relacionada à resposta dos folículos aos pulsos de LH (DAY et al, 1984; DAY et al., 1987; RODRIGUES et al., 2002). Qualquer alteração na capacidade gonadal em responder as gonadotrofinas refletir-se-á na secreção de estradiol, por isso houve a preocupação em estudar a responsividade das gônadas às gonadotrofinas.

Da mesma maneira, foi encontrada menor expressão do gene do receptor do hormônio luteinizante em bezerras da raça Nelore quando comparadas a bezerras da raça Marchigiana, cujas médias, respectivamente, são 1,15 e 1,65. Nas novilhas pré-púberes marchigiana a dispersão dos valores médios de expressão relativa deste gene foi muito maior que nas bezerras da raça Nelore, fato que influenciou para haver diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos.

A dominância folicular é semelhante em bovinos de origem taurina e zebuína, mas o diâmetro dos folículos dominantes é menor em zebuínos, e este fato foi relacionado à baixa secreção de LH nestes animais (BÓ; BARUSELLI; MARTINEZ, 2003). As taxas de crescimento dos folículos dominantes também são diferentes, sendo menor em animais de origem zebuína que em taurinos (FIGUEIREDO et al., 1997; SIROIS; FORTUNE, 1988).

Estas diferenças podem se refletir no potencial de desenvolvimento de oócitos colhidos de folículos em desenvolvimento nestes animais, sendo que os animais taurinos podem apresentar um maior potencial para desenvolvimento pós-fertilização. Mas não foi encontrado na literatura um estudo comparando o potencial

de desenvolvimento de oócitos de animais pré-púberes taurinos e zebuínos, em mesmas condições de maturação, fertilização e desenvolvimento e, portanto este fato dificulta a discussão destes resultados mais profundamente.

No presente estudo foi identificado e analisado o *splicing* alternativo para receptor de LH, onde foi constatada através de seqüenciamento que a banda inesperada apresentou deleção do exon 10 deste gene, descrito anteriormente por Pereira, em 2004, em sua Dissertação de Mestrado, como citado anteriormente. Essa alteração da expressão do gene do LHr apresentou um comportamento semelhante ao gene do LHR, e apresentou uma maior expressão em células de folículos dominantes de novilhas púberes que de novilhas pré-púberes (bezerras) da raça Nelore.

A Bezerra da raça Nelore denominada N2 apresentou maiores taxas de expressão relativa deste *splicing* alternativo que as demais bezerras da raça Nelore neste estudo, o que pode ser observado na Figura 4.3., onde os valores médios para expressão gênica relativa encontram-se agrupados um pouco acima da média das demais bezerras do grupo. Esta maior expressão gênica pode ser uma característica individual do animal, mas não interferiu significativamente nos valores médios de expressão deste gene nas bezerras Nelore. Da mesma maneira, a Novilha da raça Nelore identificada como P2 apresentou valores médios de expressão deste *splicing* alternativo com valores mais dispersos, que também interferiram significativamente na expressão deste gene nas novilhas Nelore, e pode ser um indicativo que a expressão deste *splicing* alternativo pode sofrer grandes variações de acordo com as características de cada animal.

O comportamento deste *splicing* alternativo do *lhr* também apresentou diferença quando comparada a raça dos animais pré-púberes. As bezerras da raça

Marchigiana apresentaram níveis mais altos de expressão relativa média que as bezerras da raça Nelore, sendo os valores, respectivamente, 0,91 e 0,60. Os valores médios, apesar de significativamente diferentes, apresentaram valores relativamente próximos, principalmente devido ao comportamento da expressão gênica relativa da Bezerra da raça Nelore N2, que apresentou valores de expressão relativa mais elevados, com comportamento diferente das demais bezerras da raça, mais próximos dos valores encontrados para a expressão deste *splicing* alternativo do LHr em novilhas pré-púberes Marchigiana.

Por se tratar de resultado não esperado neste estudo, não foi estudada a presença de uma maior ou menor expressão deste *splicing* alternativo em relação à expressão gênica do LHr, que pudesse estar ligada ou não ao potencial de desenvolvimento destes folículos e oócitos para a fertilização *in vitro*, relacionada à idade dos animais. Um estudo mais detalhado se faz necessário para verificar a proporção de expressão do gene normal em relação ao seu *splicing* alternativo e possível relação com a idade e a raça dos animais, relacionando sua abundância relativa com as fases do desenvolvimento folicular e o potencial dos oócitos para desenvolvimento após fecundação *in vitro*.

Neste estudo não foi detectada diferença significativa na expressão do gene do hormônio folículo estimulante em células de folículos dominantes de bezerras e novilhas da raça Nelore, e também não houve diferença entre bezerras das raças Nelore e Marchigiana. Isso pode ser explicado pelo fato que depois da divergência folicular, o FSH perde importância para os pulsos de LH no desenvolvimento do folículos até o momento da ovulação ou atresia folicular (BAO; GARVERICK, 1998; BODENSTEINER et al., 1996). Por este motivo, a expressão do receptor de FSH baixa a níveis basais, tanto em bezerras quanto em novilhas, não

importando a raça, neste estudo, não sendo possível encontrar diferença estatisticamente significativa.

Devido à importância do FSH nos estágios iniciais do desenvolvimento folicular, se alguma diferença na expressão deste gene pode ser encontrada em grupos de animais como os deste experimento, deve ser durante o primeiro e o segundo estágio de desenvolvimento, conhecidas com fase de crescimento e fase estática, respectivamente (BAO; GARVERICK, 1998; BODENSTEINER et al., 1996; SILCOX; POWELL; KISER, 1993). Nestas fases do desenvolvimento, a responsividade dos folículos ao estímulo do FSH é importante para o desenvolvimento em folículos antrais até a divergência, onde o folículo dominante, por ação parácrina, desencadeia nestes o processo de atresia nos demais folículos recrutados. A secreção de estradiol e inibina, pelo folículo dominante causa redução na concentração plasmática de FSH, até níveis insuficientes para o crescimento e manutenção dos folículos subordinados (MIHM et al., 2002).

A tentativa de localização da expressão dos receptores de gonadotrofinas em células do tecido hipofisário ainda precisa de estudos mais aprofundados, pois não foi detectada, nas condições de realização deste experimento, presença de RNAm codificando para estes receptores. Não há descrição na literatura da localização destes receptores no tecido da hipófise, e este foi um dos motivos que levou à idealização desta hipótese neste estudo. A presença de receptores para gonadotrofinas em tecido hipofisário poderia acrescentar novos questionamentos ao funcionamento do eixo hormonal reprodutivo. A hipófise tem altas concentrações de receptores para estradiol, importante para manutenção da função do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal em bovinos, pois o feedback positivo para secreção de pulsos de LH é importante para o desenvolvimento do folículo

dominante após a divergência folicular em novilhas após a puberdade e em vacas adultas, enquanto o feedback negativo é responsável pela ausência de ovulação antes da puberdade em bovinos (ARMSTRONG, 2001).

Com estes resultados, foi possível observar a maior importância do LH, relacionada aqui com a expressão gênica relativa do seu receptor nas células de folículos dominantes, nas fases finais de desenvolvimento dos folículos ovarianos para a competência dos oócitos, relacionado principalmente à idade dos animais. Devido à importância do FSH nas fases iniciais do desenvolvimento folicular, não foi constatada diferença na expressão do receptor para este hormônio entre os grupos analisados no momento em que os folículos encontram-se em fase considerada pré-ovulatória.

Estudos mais aprofundados ainda são necessários, comparando a presença de uma maior ou menor expressão dos genes para os receptores de gonadotrofinas em células foliculares, tanto células da granulosa, células da teca e oócitos, individualmente ou em conjunto, relacionadas ao potencial de desenvolvimento de oócitos colhidos de animais pré e pós-púberes após fertilização *in vitro*, para compreensão de toda a extensão da relação entre o desenvolvimento folicular em animais pré-púberes e a presença dos receptores, em cada fase do desenvolvimento, para que a utilização destes animais em programas de melhoramento genético em maior escala se torne cada vez mais uma realidade.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

A raça é um fator de influência na expressão gênica semi-quantitativa do receptor de hormônio luteinizante em células de folículos dominantes. As novilhas pré-púberes (bezerras) da raça Marchigiana apresentam maiores valores de expressão gênica relativa para *lhr* que as novilhas pré-púberes da raça Nelore.

A idade dos animais interfere na expressão gênica relativa do receptor hormônio luteinizante em células de folículos dominantes de animais da raça Nelore. Novilhas púberes apresentam maior expressão relativa para este receptor que novilhas pré-púberes (bezerras).

O “*splicing* alternativo” do gene do receptor do hormônio luteinizante (*lhr-alt*) acompanha a expressão gênica relativa do gene do LH em células de folículos dominantes, e tem maior expressão em novilhas púberes da raça Nelore e em novilhas pré-púberes da raça Marchigiana que em novilhas pré-púberes da raça Nelore.

Não foi encontrada diferença significativa na expressão gênica para o gene do receptor do hormônio folículo estimulante em células de folículos dominantes entre os grupos de animais analisados neste estudo, tanto no que se refere à idade quanto à raça dos animais.

Não foi encontrada expressão gênica para os receptores dos hormônios folículo estimulante e luteinizante em células de tecido hipofisário, nas condições em que foi realizado este experimento.

Referências

7 REFERÊNCIAS

- ABDENNEBI, L.; MONGET, P.; PISSET, C.; REMY, J. J.; SALESSE, R.; MONNIAUX, D. Comparative expression of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptors in ovarian follicles from high and low prolific sheep breeds. **Biology of Reproduction**, vol. 60, p845-854, 1999.
- ADAMS, G. P.; KOT, K.; SMITH, C. A.; GINTHER, O. J. Effect of the dominant follicle on regression of its subordinates in heifers. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 73, p. 267-275, 1993.
- AITTOMAKI, K.; LUCENA, J. L. D.; PAKARINEN, P.; SISTONEN, P.; TAPANAINEN, J.; GROMMOL, J.; KASKIKARI, R.; SANKILA, E.; LEHVÄSLAIHO, H.; ENGEL, A. R.; NIESCHLAG, E.; HUHTANIEMI, I.; CHAPELLE, A. Mutation in follicle stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. **Cell**, v. 82, p. 959-968, 1995.
- ARMSTRONG D.T. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1303-1322, 2001.
- ARMSTRONG D.T.; HOLM P.; IRVINE B.; PETERSEN, A.; STUBBINGS, R. B.; MCLEAN, D.; STEVENS, G.; SEAMARK, R. F. Pregnancies and live birth from *in vitro* fertilization of calf oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration. **Theriogenology**, v. 38, p. 667-678, 1992.
- ARMSTRONG D.T.; IRVINE B.; EARL C.R.; MCLEAN, D.; SEAMARK, R. F. Gonadotropin stimulation regimens for follicular aspiration and *in vitro* embryo production from calf oocytes. **Theriogenology**, v. 42, p. 1227-1236, 1994.
- ARMSTRONG, D. T.; KOTARAS, P. J.; EARL, C. R. Advances in production of embryos *in vitro* from juvenile and prepubertal oocytes from the calf and lamb. **Reproduction Fertility and Development**, v. 9, n. 3, p. 333-339, 1997.
- BAO, B.; GARVERICK, H. A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptors genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 1903-1921, 1998.

BAO, B.; GARVERICK, H. A.; SMITH, G. W.; SMITH, M. F.; SALFEN, B. E.; YOUNGQUIST, R. F. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 1158-1168, 1997.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTÍNEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 307-326, 2003.

BODENSTEINER, K. J.; WILTBANK, M. C.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Alterations in follicular estradiol and gonadotropin receptors during development of bovine antral follicles. **Theriogenology**, v. 45, p. 499-512, 1996.

BORDIGNON, V.; MORIN, N.; DUROCHER, J.; BOUSQUET, D.; SMITH, L. C. GnRH improves the recovery rate and the *in vitro* developmental competence of oocytes obtained by transvaginal follicular aspiration from superstimulated heifers. **Theriogenology**, v. 48, p. 291-298, 1997.

BRACKET, B. G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M. L.; DONAWICK, W. J.; EVANS, J. F.; DRESSEL, M. A. Normal development following *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 28, p. 717-725, 1982.

BROGLIATTI G. M.; SALAMONE D. F.; MAPLETOFT R. J.; ADAMS, G. P. Superstimulation response and oocyte collection in calves. **Theriogenology**, v. 47, p. 166, 1997.

CRAN, D. G. Qualitative and quantitative structural changes during pig oocyte maturation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 74, p. 237-245, 1985.

CRAN, D. G.; CHENG W. T. K. Changes in cortical granules during porcine oocyte maturation. **Gamete Research**, v. 11, p. 311-319, 1986.

DAMIANI, P.; FISSORE, R. A.; CIBELLI, J. B.; LONG, C. R.; BALISE, J. J.; ROBL, J. M.; DUBY, R. T. Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, p. 521-534, 1996.

DAY M.L.; IMAKAWA K.; GARCIA-WINDER M.; ZALESKY D.D.; SCHANBACHER B.D.; KITTOCK R.J.; KINDER J.E. Endocrine mechanisms of puberty in heifers: estradiol negative feedback regulation of luteinizing hormone secretion. **Biology of Reproduction**, v. 31, n. 2, p. 332-41, 1984.

DAY, M.L.; IMAKAWA, K.; WOLFE, P.L.; KITTOCK, R.J.; KINDER, J.E. Endocrine mechanisms of puberty in heifers. Role of hypothalamo-pituitary estradiol receptors in the negative feedback of estradiol on luteinizing hormone secretion. **Biology of Reproduction**, v. 37, p. 1054-1065, 1987.

DE PAZ, P.; SÁNCHEZ, A. J.; DE LA FUENTE, J.; CHAMORRO, C. A.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; ANEL, L. Ultrastructural and cytochemical comparison between calf and cow oocytes. **Theriogenology**, vol. 55, p. 1107-1116, 2001.

DEKKERS, J. C. Structure of breeding programs to capitalize on reproductive technology for genetic improvement. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 10, p. 2880-2891, 1992.

DRIANCOURT, M. A.; REYNALD, K.; SMITZ, J. Differences in follicular function of 3-month-old calves and mature cows. **Reproduction**, v. 121, p. 463-474, 2001.

DUBY, R. T.; DAMIANI, P.; LOONEY, C. R.; FISSORE, R. A.; ROBL, J. M. Prepuberal calves as oocytes donors: promises and problems. **Theriogenology**, v. 45, p. 121-130, 1996.

DUFAU, M.L. The luteinizing hormone receptor. **Annual Reviews Physiological**, v. 60, p. 461-496, 1998.

EARL, C. R.; FRY, R. C.; MACLELLAN, L. J.; KELLY, J. M.; ARMSTRONG, D. T. In vitro fertilization and developmental potential of prepubertal calf oocytes. Lauria AM (ed), **Gametes: Development and Function**. Rome: Serono Symposia, p. 115-137, 1998.

ELZO, M.A.; OLSON, T. A.; BUTTS, W. T.; KOGER, M.; ADAMS, E. L. Direct and maternal genetic effects due to the introduction of Bos taurus alleles into Brahman cattle in Florida: II. Preweaning growth traits. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 324-329, 1990a.

ELZO, M. A.; OLSON, T. A.; KOGER, M.; BUTTS, W. T.; MANRIQUE, C.; ADAMS, E. L. Direct and maternal genetic effects due to the introduction of Bos taurus alleles into Brahman cattle in Florida: III. Preweaning growth traits. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 1588-1594, 1990b.

EVANS, A. C.; ADAMS, G. P.; RAWLINGS, N. C. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 102, p. 463-470, 1994.

EVANS, A. C.; CURRIE, W. D.; RAWLINGS, N. A. Effect of naloxone on circulating gonadotropins in prepubertal heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 96, p. 847-855, 1992.

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

EVANS A. C.; RAWLINGS N. C. Effects of treatment with LH and FSH between 8 and 12 weeks of age on ovarian follicular development and puberty in heifers. **Theriogenology**, vol. 44, p. 725-740, 1995.

FARIN, P. W.; CROSIER, A. E.; FARIN, C. E. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology**, v. 55, n. 1, p. 151-170, 2001.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L.; SOLER, J. M. P. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 1489-1505, 1997.

FIRST, N. L.; SIMS, M. M.; PARK, S. P.; KENT-FIRST, M. J. Systems for production of calves from cultured bovine embryonic cells. **Reproduction Fertility and Development**, v. 6, n. 5, p. 553-563, 1994.

FU-PING ZHANG; RANNIKKO, A. S.; MANNA P. R.; FRASER H. M.; HUHTANIEMI, T. Cloning and functional expression of the luteinizing hormone receptor complementary deoxyribonucleic acid from marmoset monkey testis: absence of sequences encoding exon 10 in other species. **Endocrinology**, v. 138, p. 2481-2490, 1997.

GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, C.; TURINI, P.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1341-1357, 2001.

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v. 59, n. 2, p. 599-616, 2003.

GANDOLFI, F.; MILANESI, E.; POCAR, P.; LUCIANO, A. M.; BREVINI, T. A.; ACOCELLA, F.; LAURIA, A.; ARMSTRONG, D. T. Comparative analysis of calf and cow oocytes during *in vitro* maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 49, p. 168-175, 1998.

GARDNER, D. K. Development of serum-free culture systems for the ruminant embryo and subsequent assessment of embryo viability. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 54, p. 461-475, 1999.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; DONADEU, F. X.; KOT, K. Follicle selection in monovular species. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 638-647, 2001.

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

GREVE, T.; MADISON, V. In vitro fertilization in cattle: a review. **Reproductive Nutrition and Development**, v. 31, n. 2, p. 147-157, 1991.

GUDERMANN, T.; BIRNBAUMER, M.; BIRNBAUMER, L. Evidence for dual coupling of the murine luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phosphoinositide breakdown and Ca^{2+} mobilization: Studies with the cloned murine luteinizing hormone receptor expressed in L cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 4479-4488, 1992.

HECKERT, L. L.; DALEY, I. J.; GRISWOLD, M. D. Structural organization of the follicle-stimulating hormone receptor gene. **Molecular Endocrinology**, v. 6, p. 70-80, 1992.

HETZEL, D. J. S. Comparative productivity of the Brahman and some indigenous Sanga and *Bos indicus* breeds of east and southern Africa. **Animal Breeding Abstracts**, v. 56, p. 243-255, 1987.

HOISHI, H. *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. **Theriogenology**, v. 59, n. 2, p. 675-685, 2003.

HOUDE, A.; LAMBERT, A.; SAUMANDE, J.; SILVERSIDES, D. W.; LUSSIER, J. G. Structure of the bovine follicle-stimulating hormone receptor complementary DNA and expression in bovine tissues. **Molecular Reproduction and Development**, v. 39, p. 127-135, 1994.

JIA, X. C.; OIKAWA, M.; BO, M.; TANAKA, T.; NY, T.; BOIME, I.; HSUEH, A. J. W. Expression of human luteinizing hormone (LH) receptor: interaction with LH an chorionic gonadotropin from human but not equine, rat and ovine species. **Molecular Endocrinology**, v. 5, p. 759-765, 1991.

KAJIHARA, Y.; BLAKEWOOD, E. G.; MYERS, M. W.; KOMETANI, N.; GOTO, K.; GODKE, R. A. In vitro maturation and fertilization of follicular oocytes obtained from calves. **Theriogenology**, v. 35, p. 220, 1991.

KASTELIC, J. P.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. **Theriogenology**, v. 33, p. 1269–1278, 1990.

KASTROP, P. M. M.; BEVERS, M. M.; DESTREE O. H. J.; KRUIP, T. A. M. Analysis of protein synthesis in morphologically classified bovine follicular oocytes before and after maturation *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 26, p. 222–226, 1990.

KASTROP, P. M. M.; BEVERS, M. M.; DESTREE O. H. J.; KRUIP, T. A. M. Changes in protein synthesis and phosphorylation patterns during bovine oocyte maturation *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, p. 305–310, 1990.

KHATIR, H.; LONERGAN, P.; CAROLAN, C.; MERMILLOD, P. Prepubertal bovine oocyte: a negative model for studying oocyte development competence. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, p. 231–239, 1996.

KHATIR, H.; LONERGAN, P.; MERMILLOD, P. Kinetics of nuclear maturation and protein profiles of oocytes from prepubertal and dult cattle during *in vitro* maturation. **Theriogenology**, v. 50, p. 917–929, 1998.

LE GAL, F.; GALL, L.; DE SMEDT, V. Changes in protein synthesis patterns during *in vitro* maturation of goat oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 32, p. 1–8, 1992.

LÉVESQUE, J. T.; SIRARD, M. A. Proteins in oocytes from calves and adult cows before maturation: relationship with their development capacity. **Reproduction and Nutritional Development**, vol. 34, p133–139, 1994.

LOHUIS M. M. Potential benefits of bovine embryo manipulation technologies to genetic improvement programs. **Theriogenology**, v. 43, p. 51–60, 1995.

MERMILLOD, P.; MASSIP, A.; DESSY, F. In vitro production of cattle embryos: review and Belgian results. **International Journal of Developmental Biology**, v. 36, n. 1, p. 185–195, 1992.

MERMILLOD, P.; PEYNOT, N.; LONERGAN, P.; KHATIR, H.; DRIANCOURT, M. A.; RENARD, J. P.; HEYMAN, Y. Developmental potential of oocytes collected from 8–15 day old unstimulated or FSH treated calves. **Theriogenology**, v. 47, p. 294, 1997.

MIHM, M.; CROWE, M. A.; KNIGHT, P. G.; AUSTIN, E. J. Follicle wave growth in cattle. **Reproduction Domestic Animal**, v. 37, p. 191-200, 2002a.

MILAZZOTO, M. P. Mutações no gene do receptor do hormônio luteinizante (LHR) bovino e associação com precocidade sexual em fêmeas *Bos primigenius indicus* (Nelore). **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – campus de Botucatu, 2001.

MINEGISHI, T.; TANO, M.; KISHI, H.; KAMEDA, T.; MIYAMOTO, K. Follicle-stimulating hormone regulation on its receptor messenger ribonucleic acid levels in cultured rat granulosa cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1359, p. 165-173, 1997.

MINEGISHI, T.; KISHI, H.; TANO, M.; KAMEDA, T.; HIRAKAWA, T.; MIYAMOTO, K. Control of FSH receptor mRNA expression in rat granulosa cells by 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate, activin, and follistatin. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 149, p. 71-77, 1999.

MOCHIZUK H.; FUKUI Y.; ONO H. Effect of the number of granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization and development of bovine oocytes. **Theriogenology**, vol. 36, p. 973-986, 1991.

MOOR, R. M.; CROSBY, I. M. Protein requirements for germinal vesicle breakdown in bovine oocytes. **Journal of Embryology Experimental and Morphology**, v. 94, p. 207-220, 1986.

NUTTINCK F.; CHARPIGNY G.; MERMILLOD P.; LOOSFELT, H.; MEDURI, G.; FRERET, S.; GRISMARD, B.; HEYMAN, Y. Expression of components of the insulin-like growth factor system and gonadotropin receptors in bovine cumulus-oocyte complexes during oocyte maturation. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 27, p. 179-195, 2004.

OROPEZA A.; WRENZYCKI C.; HERRMANN D.; HADELER, K. J. NIEMANN, H. Improvement of the developmental capacity of oocytes from prepubertal cattle by intraovarian insulin-like growth factor-1 application. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 1634-1643, 2004.

PALMA, G. A.; CLEMENT-SENGEWALD, A.; KREFFT, H. In vitro production of embryos from calf oocytes. **Theriogenology**, v. 39, p. 278, 1993.

PALMA, G. A.; TORTONESE, D. J.; SINOWATZ, F. Developmental capacity *in vitro* of prepubertal oocytes. **Anatomy, Histology and Embriology**, v. 30, p. 295-300, 2001.

PEREIRA, F. V. Semi-quantificação de RNAm para receptores de gonadotrofinas em folículos de novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*). **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

PIETERSE, M. C.; VOS, P. L. A. M.; KRUIP, A. M.; WURTH, Y. A.; VAN BENEDEN, T. H.; WILLEMSE, A. H.; TAVERNE, M. A. M. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 35, p. 19-24, 1991.

RANDEL, R. D. Seasonal effects on female reproductive functions in the bovine (Indian breeds). **Theriogenology**, v. 21, p. 170–185, 1984.

REVEL, F.; MERMILLOD, P.; PEYNOT, N.; RENARD, J. P.; HEIMAN, Y. Low developmental capacity of *in vitro* matured and fertilized oocytes from calves compared with that cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 103, p. 115-120, 1995.

RHODES, F. M.; DE'ATH, G.; ENTWISTLE, K. W. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 38, p. 265–277, 1995.

RODRIGUES, H.D., KINDER, J.E., FITZPATRICK, L.A. Estradiol regulation of luteinizing hormone secretion in heifers of two breed types that reach puberty at different ages. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 603-609, 2002.

SALAMONE, D. F.; DAMIANI, P.; FISSORE, R. A.; ROBL, J. M.; DUBY, R. T. Biochemical and developmental evidence taht ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is compromised. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 6, p. 1761-1768, 2001.

SEIDEL, G. E.; LARSON, C. H.; SPILMAN, C. H.; HAHN, J.; FOOTE, R. I. I. Culture and transfer of calf ova. **Journal of Dairy Science**, v. 54, p. 923-926, 1971.

SILCOX, R. W.; POWELL, K. L.; KISER, T. E. Ability of dominant follicles to respond to exogenous GnRH administration is dependent on their stage of development. **Journal of Animal Science**, v. 71, suppl. 1, p. 219, 1993.

SIMONI, M.; GROMOLL, J.; NIESCHLAG, E. The follicle stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. **Endocrine Reviews**, v. 18, n. 6, p. 739-773, 1997.

SIROIS, J.; FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by Real-Time Ultrasonography. **Biology of Reproduction**, v. 39, p. 308-317, 1988.

SIROIS, J.; FORTUNE, J.E. Lengthening of the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. **Endocrinology**, v. 127, p. 916-925, 1990.

STEEVES, T. E.; GARDNER, D. K. Metabolism of glucose, pyruvate and glutamine during the maturation of oocytes derived from pre-pubertal and adult cows. **Molecular Reproduction and Development**, v. 54, p. 92-101, 1999.

STEEVES, T. E.; GARDNER, D. K.; ZUELKE, K. A.; SQUIRES, T. S.; FRY, R. C. *In vitro* development and nutrient uptake by embryos derived from oocytes of pre-pubertal and adult cows. **Molecular Reproduction and Development**, v. 54, p. 49-56, 1999.

STRADER, C. D.; FONG, T. M.; TOTA, M. R.; UNDERWOOD, D.; DIXON, R. A. Structure and function of G protein-coupled receptors. **Annual Review of Biochemistry**, v. 63, p. 101-132, 1994.

TANEJA, M.; BOLS, P. E.; VAN DE VELDE, A.; JU J. C.; SCHREIBER, D.; TRIPP, M. W.; LEVINE, H.; ECHELARD, Y.; RIESEN, J.; YANG, X. Developmental competence of juvenile calf oocytes *in vitro* and *in vivo*: influences of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 206-213, 2000.

TERVIT, H. R.; MCMILLAN, W. H.; MCGOWAN, L. T.; SMITH, J. F.; HALL, D. R. H.; DONNISON, M. J. Effect of juvenile calf age on follicular dynamics and *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, vol. 47, p. 300, 1997.

THATCHER, W. W.; MOREIRA, F.; SANTOS, J. E.; MATTOS, R. C.; LOPES, F. L.; PANCARCI, S. M.; RISCO, C. A. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. **Theriogenology**, v. 55, n. 1, p. 75-89, 2001.

TSAI-MORRIS, C.H.; BUEZKO, E.; WANG, W.; XIE, X.; DUFAU, M.L. Structural organization of the rat luteinizing hormone (LH) receptor gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 11355-11359, 1991.

VAN DE LEEMPUT, E. E.; VOS P. L. A. M.; ZEINSTRA, E. C.; BEVERS, M. M.; VAN DER WEIJDEN, C. C.; DIELEMAN, S. J. Improved *in vitro* embryo development using *in vivo* matured oocytes from heifers superovulated with a controlled preovulatory LH surge. **Theriogenology**, v. 52, p. 335-349, 1999.

XU, Z.; GARVERICK, H.A.; SMITH, G.W.; SMITH, M.F.; HAMILTON, S.A.; YOUNGQUIST, R.S. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 951-957, 1995.

WU, B.; IGNOTZ, G. G.; CURRIE, B.; YANG, X. Temporal distinctions in the synthesis and accumulation of proteins by oocytes and cumulus cells during maturation *in vitro* of bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, p. 560-565, 1996.