FÁBIO VARONI PEREIRA

**Semiquantificação de RNAm para receptores de
gonadotrofinas em folículos de novilhas Nelore (*Bos taurus
indicus*)**

São Paulo
2003

FÁBIO VARONI PEREIRA

**Semiquantificação de RNAm para receptores de
gonadotrofinas em folículos de novilhas Nelore (*Bos taurus
indicus*)**

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. Dr. Guilherme de Paula Nogueira

São Paulo
2003

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1340 Pereira, Fábio Varoni
FMVZ Semiquantificação de RNAm para receptores de
gonadotrofinas em folículos de novilhas Nelore (*Bos taurus
indicus*) / Fábio Varoni Pereira. - São Paulo : F. V. Pereira,
2003.

92 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo.
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
Departamento de Reprodução Animal, 2003.

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

Orientador: Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira.

1. Fertilidade. 2. Novilhos. 3. Bovinos. 4. Gado
Nelore. I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: Fábio Varoni Pereira

Título: Semiquantificação de RNAm para receptores de gonadotrofinas em folículos de novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*)

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho à minha
noiva em agradecimento ao
apoio, carinho, amor e
dedicação.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira pela oportunidade, boas condições de trabalho, confiança e amizade.

Ao Prof. Dr. José Fernando Garcia por ter disponibilizado o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal; pela confiança, dedicação e amizade.

Ao Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabé pela oportunidade.

A Prof. Dra. Cáris Maroni Nunes pela colaboração, dedicação e amizade.

Ao Prof. Dr. José Buratini Júnior pela importante colaboração para o desenvolvimento desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Luís Lehman Coutinho por ter disponibilizado a infra-estrutura de seu laboratório; e a pós-graduanda Lílian pela paciência e consideração.

Aos amigos Rodrigo, Fabiano e Natali pelos esforços realizados durante o projeto e pela amizade.

Aos amigos Gustavo, Sérgio, Laércio, Fabiane, Lúcia, Elda, Karina, Pedro (tatu) pelo auxílio laboratorial durante o experimento, pela convivência e amizade.

Aos pós-graduandos e graduandos do laboratório, por todos os momentos de descontração e companheirismo durante o experimento.

Aos amigos pós-graduandos e funcionários do Departamento de Reprodução Animal pelo apoio durante as disciplinas, pela descontração e amizade.

Aos professores e funcionários do Curso de Medicina Veterinária (UNESP – Araçatuba) pela colaboração, convivência e amizade.

A agropecuária CFM-Fazenda São Francisco pelo empréstimo dos animais.

A FAPESP pelo auxílio financeiro prestado ao projeto.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desta dissertação.

MUITO OBRIGADO!!

*"Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada, querer.
(Amyr Klink) "*

RESUMO

PEREIRA, F. V. **Semiquantificação de RNAm para receptores de gonadotrofinas em folículos de novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*)**. [Semiquantification of mRNA for gonadotropins receptors in follicles of Nelore heifers (*Bos taurus indicus*)]. 2003. 92 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

A identificação de mecanismos moleculares é importante para entender os eventos fisiológicos que ocorrem durante o processo de maturação sexual. O objetivo deste trabalho foi semiquantificar o RNAm para os receptores de gonadotrofinas em células da granulosa de folículos dominantes em crescimento de novilhas Nelore pré-púberes, buscando associação com a fertilidade precoce. As novilhas foram separadas em Precoce (P, n=6) e Não Precoce (NP, n=16), de acordo com o diagnóstico positivo de gestação aos 15 meses de idade. Realizou-se exame ultra-sonográfico dos ovários durante 17 dias para a identificação da onda folicular, o folículo dominante com 8-9 mm foi aspirado via trans-vaginal. O RNA total foi extraído das amostras e convertido a DNA complementar que teve uma região amplificada para a expressão dos genes para os receptores de gonadotrofinas. A semiquantificação foi feita por análise digital onde levou-se em consideração a intensidade média das bandas (unidade arbitrária - UA) em gel de poliacrilamida (8%) corado com uma solução de TBE-brometo de etídio (0,02%). Foi utilizado o RNAm para o gene do GAPDH como controle interno para corrigir a expressão dos receptores de gonadotrofinas em função da quantidade de RNA em cada amostra. Não houve diferença entre P e NP na quantidade de RNAm para o receptor de FSH (FSHr, $1,14 \pm 0,07$ e $1,19 \pm 0,04$ UA) e de LH (LHr $0,79 \pm 0,12$ e $0,78 \pm 0,05$ UA, respectivamente). Foi detectada a presença de *splicing* alternativo do RNAm para o receptor de LH (LHrs), pelo aparecimento de banda com peso molecular diferente, em todos os animais do experimento, constatando-se através do sequenciamento que o material apresentava a deleção do exon 10. As novilhas P apresentaram maior percentagem de LHrs em relação ao LHr (LHrs/LHr) ($83,66 \pm 4,26\%$) quando comparadas a NP ($70,05 \pm 3,39\%$). A quantidade de RNAm para receptores de gonadotrofinas parece não estar relacionada com o aparecimento de

fertilidade precoce, mas a maior percentagem de deleção do exon 10 no RNAm para o LHr pode estar envolvida com a fertilidade precoce em novilhas Nelore.

Palavras-chave: Fertilidade. Novilhas. Gado Nelore. *Splicing alternativo*.

ABSTRACT

PEREIRA, F. V. **Semiquantification of mRNA for gonadotropins receptors in follicles of Nelore heifers (*Bos taurus indicus*)**. [Semiquantificação de RNAm para receptores de gonadotrofinas em folículos de novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*)]. 2003. 92 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Identification of molecular mechanisms is important to understand the physiological events occurring during the process of sexual maturation. The objective of this work was to semiquantify the mRNA for gonadotropins receptors from granulosa cells of developing dominant follicles in pre-pubertal Nelore heifers and associate the results to precocious fertility. The heifers were sorted in Precocious (P, n=6) and Non Precocious (NP, n=16), according to positive pregnancy at 15 months of age. Ovarian ultrasound examination was performed through 17 days for follicular wave identification, the growing dominant follicle was aspirated at 8-9 mm. Total mRNA was extracted from the granulosa cells samples, converted to complementary DNA and had a region amplified for gene expression for gonadotropins receptors. The semiquantification was performed by digital analysis of intensity average for the bands (arbitrary unit - AU) in poliacrilamida gel (8%) stained with etidio TBE-bromide solution (0,02%). mRNA for GAPDH gene was used as internal control to correct the expression of gonadotropins receptors to the amount of mRNA in each sample. There was no difference between P and NP in the amount of mRNA for FSH receptors (FSHr, $1,14 \pm 0,07$ and $1,19 \pm 0,04$ AU) and LH receptors (LHr $0,79 \pm 0,12$ and $0,78 \pm 0,05$ AU, respectively). Heifers presented alternative splicing of mRNA for LH receptors (LHrs) evidenced through sequencing, as the absence of exon 10. P heifers presented greater percentage of LHrs in relation to LHr (LHrs/LHr) ($83,66 \pm 4,26\%$) when compared the NP ($70,05 \pm 3,39\%$). The amount of mRNA for gonadotropins receptors was not related with precocious fertility, but the greater percentage of exon 10 deletion from mRNA for LHr was associate the precocious fertility in Nelore heifers.

Key words: Fertility. Heifers. Nelore cattle. Alternative splicing.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Gel apresentando a padronização do número de ciclos para o *multiplex* GAPDH (540pb) e FSHr (327pb), chamado de *multiplex* GF. Coluna 1= Sem DNA (controle negativo); coluna 2= peso molecular 50pb; coluna 3= GF com 26 ciclos de amplificação; coluna 4= GF com 28 ciclos de amplificação; coluna 5=GF com 30 ciclos de amplificação; coluna 6= GF com 32 ciclos de amplificação e coluna 7= GF com 34 ciclos de amplificação – Araçatuba, 200351
- Figura 2: Gel apresentando a padronização do o número de ciclos para o *multiplex* GAPDH (540pb) e LHr (232pb) chamado de *multiplex* GL. Coluna 1= peso molecular 50pb; coluna 2= GL com 26 ciclos de amplificação; coluna 3= GL com 28 ciclos de amplificação; coluna 4= GL com 30 ciclos de amplificação; coluna 5= GL com 32 ciclos de amplificação; coluna 6= GL com 34 ciclos de amplificação; coluna 7= GL com 36 ciclos de amplificação; coluna 8= GL com 40 ciclos de amplificação; coluna 9= GL com 38 ciclos de amplificação e coluna 10= GL com 42 ciclos de amplificação – Araçatuba, 200352
- Figura 3: Gel mostrando a variação na quantidade de amplificação de um fragmento do cDNA em função da variação na quantidade de RNA total para o gene GAPDH (540 pb) no *multiplex* GF com 28 ciclos de amplificação. Coluna 1: sem DNA (controle negativo); coluna 2: peso molecular (100 pb); coluna 3: síntese de cDNA com 0,5 µg de RNA total; coluna 4: síntese de cDNA com 1 µg de RNA total; coluna 5: síntese de cDNA com 2 µg de RNA total; coluna 6: síntese de cDNA com 3 µg de RNA total; coluna 7: síntese de cDNA com 4 µg de RNA total – Araçatuba, 200354
- Figura 4: Gel apresentando variação na quantidade de amplificação de um fragmento do cDNA em função da variação na quantidade de RNA total para o gene FSHr (327 pb) no *multiplex* GF com 32 ciclos de amplificação. Coluna 1: peso molecular (100 pb); coluna 2: síntese de cDNA com 0,5 µg de RNA total; coluna 3: sem DNA (controle negativo); coluna 4: síntese de cDNA com 1 µg de RNA total; coluna 5: síntese de cDNA com 2 µg de RNA total; coluna 6: síntese de cDNA com 3 µg de RNA total; coluna 7: síntese de cDNA com 4 µg de RNA total – Araçatuba, 200355
- Figura 5: Gel mostrando a variação na quantidade de amplificação de um fragmento do cDNA em função da variação da quantidade de RNA total para o gene GAPDH (540 pb) no *multiplex* GL com 28 ciclos. Coluna 1: sem DNA (controle negativo); coluna 2: peso molecular (100 pb); coluna 3: síntese de cDNA com 0,5 µg de RNA total; coluna 4: síntese de cDNA com 1 µg de RNA

total; coluna 5: síntese de cDNA com 2 µg de RNA total; coluna 6: síntese de cDNA com 3 µg de RNA total; coluna 7: síntese de cDNA com 4 µg de RNA total – Araçatuba, 200356

Figura 6: Gel mostrando variação na quantidade de amplificação de um fragmento do cDNA em função da variação na quantidade de RNA total para o gene LHr (232 pb) no *multiplex* GL com 38 ciclos. Coluna 1: sem DNA (controle negativo); coluna 2: peso molecular (100 pb); coluna 3: síntese de cDNA com 0,5 µg de RNA total; coluna 4: síntese de cDNA com 1 µg de RNA total; coluna 5: síntese de cDNA com 2 µg de RNA total; coluna 6: síntese de cDNA com 3 µg de RNA total; coluna 7: síntese de cDNA com 4 µg de RNA total – Araçatuba, 200357

Figura 7: Gel apresentando a variação na quantidade de amplificação de um fragmento do cDNA em 3 animais precoces para o *multiplex* GF. Coluna 1= peso molecular 50 pb; coluna 2= GF do animal 154 com 28 ciclos de amplificação; coluna 3= GF do animal 154 com 32 ciclos de amplificação; coluna 4= GF do animal 157 com 28 ciclos de amplificação; coluna 5= GF do animal 157 com 32 ciclos de amplificação; coluna 6= GF do animal 212 com 28 ciclos de amplificação e coluna 7= GF do animal 212 com 32 ciclos de amplificação – Araçatuba, 200363

Figura 8: Gel apresentando a variação na quantidade de amplificação de um fragmento do cDNA em 4 animais não precoces para o *multiplex* GF. Coluna 1= peso molecular 50pb; coluna 2= GF do animal 38 com 28 ciclos de amplificação; coluna 3= GF do animal 38 com 32 ciclos de amplificação; coluna 4= GF do animal 83 com 28 ciclos de amplificação; coluna 5= GF do animal 83 com 32 ciclos de amplificação; coluna 6= GF do animal 122 com 28 ciclos de amplificação; coluna 7= GF do animal 122 com 32 ciclos de amplificação; coluna 8= GF do animal 204 com 28 ciclos de amplificação e coluna 9= GF do animal 204 com 32 ciclos de amplificação – Araçatuba, 200364

Figura 9: Gel apresentando a variação na quantidade de amplificação de um fragmento de cDNA em 3 animais precoces para o *multiplex* GL. Coluna 1= peso molecular 50pb; coluna 2= GL do animal 154 com 28 ciclos de amplificação; coluna 3= GL do animal 154 com 38 ciclos de amplificação; coluna 4= GL do animal 157 com 28 ciclos de amplificação; coluna 5= GL do animal 157 com 38 ciclos de amplificação; coluna 6= GL do animal 212 com 28 ciclos de amplificação e coluna 7= GL do animal 212 com 38 ciclos de amplificação. Presença da banda contendo o *splicing* alternativo na posição de 150pb – Araçatuba, 200366

Figura 10: Gel apresentando a variação na quantidade de amplificação de um fragmento de cDNA em 4 animais não precoces para o *multiplex* GL. Coluna 1= peso molecular 50pb; coluna 2= GL do animal 38 com 28 ciclos de amplificação; coluna 3= GL do animal 38 com 38 ciclos de amplificação; coluna 4= GL do animal 83 com 28 ciclos de amplificação; coluna 5= GL do animal 83 com 38 ciclos de amplificação; coluna 6= GL do animal 122 com 28 ciclos de amplificação; coluna 7= GL do animal 122 com 38 ciclos de amplificação; coluna 8= GL do animal 204 com 28 ciclos de amplificação e coluna 9= GL do animal 204 com 38 ciclos de amplificação. Presença da banda contendo *splicing* alternativo na posição de 150pb – Araçatuba, 200367

Figura.11: Representação da sequência de nucleotídeos do fragmento do receptor para LH (parte do exon 9 até o início do exon 11). As letras na cor cinza representam os oligonucleotídeos iniciadores, as letras na cor azul representam o exon 9, as letras na cor vermelha representam o exon 10 e as letras na cor preta representam o exon 11 (sequência depositada no Gen Bank = U20504) – Araçatuba, 200370

Figura.12: Sequenciamento da banda do *splicing* alternativo, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores reverso para o exon 11 – Araçatuba, 200370

Figura.13: Sequenciamento da banda do *splicing* alternativo, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores para o exon 9 – Araçatuba, 200370

Figura 14. Alinhamento da banda sequenciada com a sequência depositada no Gen Bank utilizando os oligonucleotídeos iniciadores reverso para o exon 11 – Araçatuba, 200371

Figura 15. Alinhamento da banda sequenciada com a sequência depositada no Gen Bank utilizando os oligonucleotídeos iniciadores para o exon 09 – Araçatuba, 200372

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1: Representação gráfica dos resultados da intensidade média das bandas em função da variação do número de ciclos para o *multiplex* GF da Fig. 1 – Araçatuba, 200351
- Gráfico 2: Representação gráfica dos resultados da intensidade média das bandas em função da variação do número de ciclos para o *multiplex* GL da Fig. 2 – Araçatuba, 200352
- Gráfico 3: Representação gráfica da variação na quantidade de amplificação de um fragmento do cDNA em função da variação na quantidade de RNA total para o gene GAPDH no *multiplex* GF, utilizando como referência à intensidade média das bandas da Fig. 3 – Araçatuba, 200354
- Gráfico 4: Representação gráfica da variação na quantidade de amplificação de um fragmento do cDNA em função da variação de RNA total para o gene FSHr no *multiplex* GF, utilizando como referência à intensidade média das bandas da Fig. 4 – Araçatuba, 200355
- Gráfico 5: Representação gráfica da variação na quantidade de amplificação de um fragmento do cDNA em função da variação na quantidade de RNA total para a expressão do gene GAPDH no *multiplex* GL, utilizando como referência à intensidade média das bandas da Fig. 5 – Araçatuba, 2003 ...56
- Gráfico 6: Representação gráfica da variação na quantidade de amplificação de um fragmento do cDNA em função da variação na quantidade de RNA total para o gene LHr no *multiplex* GL, utilizando como referência à intensidade média das bandas da Fig. 6 – Araçatuba, 200357
- Gráfico 7- Comparação da intensidade média das bandas para a amplificação de um fragmento do cDNA para o receptor do hormônio folículo estimulante (FSHr) entre o grupo precoce (P, n=6) e o grupo não precoce (NP, n=16) de novilhas Nelore pré-púberes aos 12 meses de idade – Araçatuba, 2003 ...64
- Gráfico 8- Comparação da intensidade média das bandas para a amplificação de um fragmento do cDNA para o receptor do hormônio luteinizante (LHr) entre o

grupo precoce (P, n=6) e o grupo não precoce (NP, n=16) de novilhas Nelore pré-púberes aos 12 meses de idade – Araçatuba, 200367

Gráfico 9- Comparação da intensidade média das bandas para a amplificação de um fragmento do cDNA para o *splicing* alternativo do receptor do hormônio luteinizante (LHrs) entre o grupo precoce (P, n=6) e o grupo não precoce (NP, n=16) de novilhas Nelore pré-púberes aos 12 meses de idade – Araçatuba, 200368

Gráfico 10- Comparação da intensidade média das bandas para a amplificação de um fragmento do cDNA para o *splicing* alternativo do receptor do hormônio luteinizante (LHrs) dividido pela intensidade média das bandas do receptor do hormônio luteinizante (LHr) multiplicado por 100, entre o grupo precoce (P, n=6) e o grupo não precoce (NP, n=16) de novilhas Nelore pré-púberes aos 12 meses de idade. Barra assinalada (ϕ) indica diferença estatística – Araçatuba, 200368

TABELA

Tabela 1- Intensidade média (média±EPM) das bandas para o FSHr, para o LHR, para o LHrs corrigidas pelo GAPDH (controle interno) e para o LHrs dividido pela intensidade média das bandas do LHR, em células da granulosa de folículos em desenvolvimento de novilhas Nelore Precoce (n=6) e Não Precoce (n=16) – Araçatuba, 2003	69
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	adenina
AC	adenil ciclase
AMPC	adenosina monofosfato cíclico
bFSH	hormônio folículo estimulante bovino
bLH	hormônio luteinizante bovino
C	citossina
Ca ⁺²	cálcio
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
cm	centímetro
DEPC	dietil pirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	deoxiribonucleotídeos trifosfatados
DTT	DL-ditionitroreitol
EDTA	etilenodiaminotetra-acetato sódico
EPM	erro padrão da média
FSH	hormônio folículo estimulante
FSHr	receptor para hormônio folículo estimulante
g	gauge
G	guanina
GAPDH	gliceraldeído fosfato desidrogenase
GC	gonadotrofina coriônica
GDP	guanosina 5 difosfato

GF	GAPDH e receptor para FSH
GL	GAPDH e receptor para LH
Gs	proteína G estimulatória
GTP	guanosina 5 trifosfato
hCG	gonadotrofina coriônica humana
InsP ₃	inositol trifosfato
LH	hormônio luteinizante
LHr	receptor para hormônio luteinizante
LHrs	splicing 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
NP	não precoce
P	precoce
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da polimerase
pM	picomol
PKA	proteína kinase A
RNA	ácido ribonucléico

RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
s	segundo
T	timina
TBE	tris borato EDTA
U	unidade
UA	unidade arbitrária
x g	gravidade
°C	graus Celsius
µg	micrograma
µl	microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1 Raça Nelore	25
2.2 Puberdade em novilhas	26
2.3 Idade ao primeiro parto	28
2.4 Dinâmica folicular	30
2.5 Gonadotrofinas e a dinâmica folicular	32
2.6 Receptores de gonadotrofinas	33
2.6.1 Receptor para FSH	33
2.6.2 Receptor para LH	34
2.6.3 Expressão dos receptores de gonadotrofinas nas células da granulosa	36
3 OBJETIVOS E HIPÓTESE	38
3.1 Gerais	38
3.2 Específicos	38
3.3 Hipótese	39
4 MATERIAL E MÉTODO	40
4.1 Local e período de realização do experimento	40
4.2 Animais	40
4.3 Acompanhamento ultra-sonográfico e aspiração folicular	41
4.4 Inseminação dos animais	43
4.5 Semiquantificação de receptores para gonadotrofinas	43

4.5.1 Extração de RNA total	43
4.5.2 Quantificação de RNA total	45
4.5.3 Síntese de DNA complementar (primeira fita)	46
4.5.4 Construção dos oligonucleotídeos iniciadores	47
4.5.5 Padronização do número de ciclos e temperatura de anelamento	49
4.5.6 Padronização da quantidade de RNA total para síntese de cDNA	53
4.5.7 Justificativa do uso de <i>multiplex</i> e semiquantificação da expressão dos receptores de gonadotrofinas	58
4.5.8 Sequenciamento	59
4.6 Análise estatística	60
5 RESULTADOS	62
5.1 Inseminação artificial e fertilidade	62
5.2 Semiquantificação da expressão do gene FSHr	62
5.3 Semiquantificação da expressão do gene LHr	65
5.4 Análise do sequenciamento	69
6 DISCUSSÃO	73
6.1 Fertilidade precoce	73
6.2 Expressão para receptores de gonadotrofinas	75
6.3 <i>Splicing</i> alternativo para receptores de LH	78
7 CONCLUSÕES	82
REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

Toda atividade produtiva tem como objetivo a obtenção de lucro e como tal, a produção de gado de corte, para ter sucesso, deve gerir suas atividades de forma rentável e competitiva. Duas ferramentas podem ser trabalhadas quando se tenta tornar a produção animal mais eficiente, o manejo e a qualidade dos animais.

Uma das ferramentas citada acima a ser trabalhada é o recurso genético agregado aos animais, conquistado com o melhoramento animal que consiste na identificação dos objetivos de seleção, identificação dos indivíduos que produzirão a próxima geração, seleção efetiva na progênie e utilização do sistema de acasalamento adequado, conjunto de ações que definem a elaboração de um programa de melhoramento genético (BITENCOURT ; LÔBO, 2003).

A reprodução é um processo complexo e a seleção direta de algumas características ligadas à mesma é difícil de ser aplicada a campo, tornando-se necessário identificar características que sejam facilmente medidas, que apresentem variabilidade genética e que sejam geneticamente correlacionadas aos eventos reprodutivos desejáveis (BERGMANN, 1998).

A idade à puberdade relacionada com a idade ao primeiro parto é considerada um evento importante da vida reprodutiva de uma fêmea bovina, devendo ser incluído como critério de seleção dentro de um sistema de produção de bovinos de corte, principalmente por apresentar elevada confiabilidade quando se deseja mensurar e incrementar a eficiência reprodutiva do rebanho. A estimativas de herdabilidade para idade à puberdade é relativamente alta, em torno de 0,40 a 0,50, o que significa que

essa idade pode ser reduzida por meio de seleção genética permitindo a escolha de animais precoces (MARSON ; FERRAZ, 2001b).

Segundo Restle et al. (1999) a idade em que as bezerras da raça Nelore atingem a puberdade é de 754 dias. A puberdade precoce caracterizada pela presença de tecido luteínico antes de 300 dias de idade, foi observada em 25% de novilhas em desenvolvimento criadas para corte (WEHRMAN et al., 1996).

A idade à puberdade e a data da primeira fecundação da fêmea bovina são observações difíceis de serem feitas nos sistemas de criação extensiva, sendo que geralmente a informação reprodutiva disponível é a data do primeiro parto (BERGMANN, 1998).

O conhecimento dos mecanismos moleculares que controlam o sistema reprodutivo, bem como suas interações com outros sistemas, pode auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias para o processo de seleção genética.

O desenvolvimento biotecnológico e a aplicação deste à pecuária nacional pode trazer novas perspectivas e diminuir o tempo de seleção de animais geneticamente superiores, pois programas de melhoramento genético utilizando métodos convencionais de seleção, promovem progresso genético a longo prazo por meio de seleção da variabilidade genética (MARSON ; FERRAZ, 2001a).

Como resultado da seleção de animais de melhor desempenho para reprodutores, por meio de variações fenotípicas, aumenta-se a frequência de genes favoráveis que influenciam as características de interesse. Em função das características produtivas, serem freqüentemente controladas por vários genes, fica difícil o estabelecimento de um gene alvo específico. Contudo tem-se constatado recentemente, a inclusão cada

vez maior de marcadores moleculares, como elemento de seleção, junto aos programas tradicionais de melhoramento genético (MARSON ; FERRAZ, 2001a).

Os marcadores moleculares constituem-se de regiões genômicas específicas, relacionadas direta ou indiretamente com a manifestação de fenótipos de interesse (WOMACK, 1993).

Uma das formas de encontrar estes marcadores baseia-se na investigação da participação dos genes principais nos mecanismos fisiológicos envolvidos com a manifestação da característica desejada em questão, na tentativa de pesquisar variações em genes específicos entre indivíduos que apresentam fenótipos distintos (MILAZZOTO, 2001; CAMPAGNARI, 2002).

Sendo assim, o presente trabalho objetivou semiquantificar a expressão gênica para receptores de gonadotrofinas nas células da granulosa durante a maturação sexual de novilhas da raça Nelore separadas posteriormente em função de fertilidade precoce em precoces ou não. Estabelecemos que animais prenhes até 15 meses de idade foram considerados precoces e os demais foram considerados não precoces. Buscamos identificar variáveis moleculares quantitativas entre estes animais que possam servir ou colaborar para possíveis marcadores moleculares para precocidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Raça Nelore

A história da raça Ongole ou Nelore, como é conhecida no Brasil, começa mil anos antes da era cristã, quando os arianos levaram os animais para o continente indiano. Nelore é o nome de um distrito da antiga Província de Madras, Estado de Andra, situada na costa oriental da Índia, banhado pelo mar de Bengala, onde foram embarcados os primeiros animais que vieram para o Brasil. O primeiro registro de entrada do Nelore no Brasil aconteceu em 1868, com a chegada de um casal de animais em Salvador na Bahia. Passados mais dez anos, o suíço Manoel Ubelhal Lemgruber criador do Rio de Janeiro, depois de conhecer o Nelore no Jardim Zoológico de Hamburgo na Alemanha, encomendou um casal. Até 1883, Lemgruber fez mais duas importações dando início a uma linhagem bastante conhecida. A raça Nelore foi se expandindo aos poucos, primeiro no Rio de Janeiro e Bahia, depois Minas Gerais e por último em São Paulo. Em 1938, foi criado o Registro Genealógico e desta maneira começou a se definir as características raciais do Nelore. O Nelore é uma raça que foi melhorada geneticamente no Brasil e está voltada para a produção de carne, embora na sua origem indiana tenha sido utilizada para exploração leiteira (ACNB).

A raça Nelore, predomina atualmente no cenário pecuário brasileiro. Por estimativas não ortodoxas pode-se inferir que a raça Nelore represente 80% da produção da indústria da carne no país (ABCZ; ROMANO, 1997). Aliás, as

características da raça como produtora de carne vêm apresentando índices de desempenho econômicos notáveis. Seguramente, mesmo naqueles nichos de mercado em que os cruzamentos têm apresentado bom crescimento, a raça Nelore tem papel fundamental como matrizes, e constitui por excelência, em grande e inestimável patrimônio genético para a bovinocultura (ABCZ).

Poucos estudos têm sido publicados sobre maturação sexual e o desenvolvimento da puberdade em animais das raças zebuínas, principalmente na raça Nelore que é a principal raça criada no Brasil (FIGUEIREDO et al., 1997).

2.2 Puberdade em novilhas

Puberdade pode ser identificada como o primeiro estro acompanhado pelo desenvolvimento de um corpo lúteo capaz de se manter durante um ciclo estral completo (KINDER et al., 1987).

A teoria gonadostática, proposta por Ramirez e McCann (1963), sugere que o aumento na secreção de LH na pré-puberdade é resultado do declínio da retoralimentação negativa causada pelo estradiol sobre a região hipotalâmica que controla a secreção de LH. A retroalimentação negativa do estradiol sobre a secreção de LH declina com a aproximação da puberdade em novilhas, e permite um aumento na frequência de pulsos de LH. Para tentar explicar este declínio da retroalimentação negativa causada pelo estradiol, existe uma hipótese, onde alguns autores (DAY et al., 1984; DAY et al., 1987; RODRIGUES et al.; 2002) relatam a ocorrência de um declínio

no número de receptores para estradiol na região hipotalâmica basal medial com a aproximação da puberdade.

O controle da reprodução pelo sistema nervoso central é exercido principalmente através do FSH e LH (MORAN et al., 1989). O estradiol 17β e a progesterona são os dois esteróides mais importantes para a reprodução em fêmeas bovinas. Em novilhas pré-púberes, as concentrações de ambos os hormônios permanecem muito baixas, em relação aos padrões de fêmeas adultas, até a primeira ovulação ser iminente. Isto implica que, apesar de possuírem um papel importante no início da puberdade, nenhum dos esteróides desencadeia o processo (KINDER et al., 1987).

Entre 3 e 4 meses de idade ocorre um aumento na secreção de gonadotrofinas em novilhas pré-púberes, associado com um aumento no número de grandes folículos ovarianos e no diâmetro do maior folículo (EVANS et al., 1992; EVANS ; RAWLINGS, 1995).

A castração de novilhas pré-púberes resultou no aumento de secreção de gonadotrofinas, as quais são suprimidas pela administração de estradiol exógeno (WOLFE et al, 1989; WOLFE et al, 1991), comprovando o efeito negativo deste esteróide; assim como tratamentos com estradiol falharam em induzir puberdade precoce em novilhas (RODRIGUES et al., 1999). No entanto, a castração em diferentes idades permitiu observar uma elevação mais lenta na concentração de gonadotrofinas em bezerras de 2 semanas, se comparada a bezerras ovariectomizadas com 6 ou 12 semanas; sugerindo que o mecanismo inibitório de origem ovariana, bloqueando a secreção de gonadotrofinas, deve se desenvolver entre 2 e 12 semanas de idade na novilha (DODSON et al., 1989).

O tratamento de novilhas pré-púberes com bLH e bFSH entre 8 e 12 semanas de idade, prejudicou a foliculogênese (diminuiu o número de folículos antrais e também diminuiu o tamanho máximo do maior folículo), enfatizando a importância de um padrão correto na secreção de gonadotrofinas para a progressão da maturidade sexual em novilhas (EVANS ; RAWLINGS, 1995).

Em um estudo realizado com novilhas Nelore pré-púberes, observou-se maior diâmetro do folículo dominante após o 11^o de idade, em novilhas precoces quando comparadas a novilhas não precoces, embora não tenha sido observada diferença nas concentrações séricas de LH, sugerindo algum fator gonadal relacionado as diferentes respostas ao mesmo estímulo (NOGUEIRA et al., 2003) e em outro estudo Perry et al. (1991) relataram uma relação entre o diâmetro folicular aos 11 meses de idade e a puberdade em novilhas cruzadas.

2.3 Idade ao primeiro parto

A idade a puberdade é refletida na idade ao primeiro parto (PEREIRA et al., 2002). O aspecto nutricional é determinante, pois as novilhas que recebem níveis nutricionais adequados e entre aquelas com o maior potencial genético de ganho de peso pós-desmama, provavelmente serão aquelas fêmeas de maior precocidade sexual e que em consequência terão uma idade mais baixa ao primeiro parto. A idade ao primeiro parto em *Bos taurus indicus* é a característica reprodutiva mensurável de maior herdabilidade e assim aquela que mais responderá à seleção genética. Esta

herdabilidade é alta porque na raça Nelore (*Bos taurus indicus*), não existe ainda uma seleção intensiva para precocidade, portanto a variabilidade genética parece ser muito grande (ELER et al., 2002). Em condições precárias de alimentação, não é possível uma pressão de seleção sobre este parâmetro (PINEDA, 2002).

Muitos estudos estão sendo realizados para encontrar indicadores confiáveis de fertilidade e vários métodos de seleção têm sido utilizados nos programas de melhoramento genético animal, como por exemplo circunferência escrotal nos machos, intervalo entre partos, idade ao primeiro parto nas fêmeas (ELER et al., 2002), sendo este último muito importante quando consideramos dados do rebanho nacional, principalmente em condições extensivas, pois a idade a puberdade esbarra na dificuldade de identificar este parâmetro a campo (PEREIRA, et al., 2002).

A idade do primeiro parto de novilhas Nelore aos dois anos (“sistema um ano”), decorre de um conjunto de práticas de alimentação e manejo dentro de um rebanho de cria associado à genética animal para puberdade precoce (ROCHA ; LOBATO, 2002).

A maturidade sexual da fêmea Nelore é reconhecidamente mais tardia que as raças européias. O ideal da fêmea de corte em reprodução deve ser o início da reprodução aos 14 meses de idade (após o 2º cio), permitindo primeiro parto aos 2 anos de idade. Desta forma, a eficiência de produção é muito maior, permitindo um acréscimo considerável na taxa de desfrute do rebanho (PEREIRA et al., 2002).

A utilização de idade ao primeiro parto como critério de seleção pode apresentar maior resposta em populações nas quais as fêmeas são colocadas na presença do touro em torno de 14 meses de idade (PEREIRA et al., 2002).

Na Agropecuária CFM, as novilhas da raça Nelore são colocadas com reprodutores a partir dos 10 meses de idade, quando o acasalamento ocorre entre 14 e 15 meses.

2.4 Dinâmica folicular

O processo contínuo de crescimento e regressão dos folículos, que leva ao desenvolvimento do folículo pré-ovulatório é conhecido como dinâmica folicular caracterizada por um padrão de crescimento e atresia de um grupo de folículos ovarianos é denominado onda de crescimento folicular (LUCY et al., 1992).

Nos bovinos as ondas de crescimento folicular ocorrem desde o período pré-puberal e continuam durante os ciclos estrais acontecendo mesmo durante a gestação. Durante o período pré-puberal, apesar da novilha não ovular, a mesma apresenta variação na população de folículos, com ondas de crescimento folicular, semelhante às vacas adultas (EVANS et al., 1994).

Cada onda folicular é caracterizada pelo recrutamento de um grupo de folículos. Deste grupo um folículo é selecionado, continua seu crescimento e se torna dominante inibindo o crescimento dos outros folículos recrutados. Havendo meio hormonal favorável, o folículo dominante atinge a maturação final e a ovulação acontece. Se houver pouca gonadotrofina circulante durante a fase de crescimento dos folículos, estes entram em atresia após atingir um determinado diâmetro (HODGEN, 1982;

IRELAND ; ROCHE, 1987; GINTHER et al., 1989; SIROIS ; FORTUNE, 1990; BEG et al., 2001; MANNIKKAM et al., 2001).

Ginther et al. (1997), utilizaram o termo desvio ou divergência folicular para definir o momento em que se nota pela primeira vez uma diferença significativa na taxa de crescimento entre os dois maiores folículos ovarianos (fase de seleção), quando ocorre o crescimento contínuo do futuro folículo dominante e redução ou parada de crescimento do segundo maior folículo.

Existem algumas diferenças na dinâmica folicular entre raças zebuínas (*Bos taurus indicus*) e raças européias (*Bos taurus taurus*), principalmente quanto ao diâmetro máximo do folículo dominante, onde as raças zebuínas apresentam de 10 a 12 mm de diâmetro, observado em novilhas Nelore (FIGUEIREDO et al., 1997) e as raças européias apresentam de 14 a 20 mm (SÁVIO et al., 1988), de 13 a 18 mm (GINTHER et al., 1989) e de 14 a 16 mm de diâmetro (ADAMS et al, 1993). Outra importante diferença foi 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 com aproximadamente 1,6 mm/dia (SIROIS ; FORTUNE, 1988). Bó et al. (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 este fato se deve à baixa secreção de LH das raças zebuínas.

2.5 Gonadotrofinas e a dinâmica folicular

Hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) são glicoproteínas primariamente extragonadais necessárias para a foliculogênese. As diferenças nas secreções de gonadotrofinas em vários estágios do crescimento folicular são associadas com o início e crescimento contínuo dos folículos para a ovulação ou atresia.

O início do crescimento de cada onda folicular é precedido por um aumento transitório de FSH (BODENSTEINER et al., 1996; EVANS ; FORTUNE, 1997; BAO ; GARVERICK, 1998), 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 (BODENSTEINER et al., 1996; BAO ; GARVERICK, 1998).

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 frequência de pulsos aumentando as concentrações basais (BAO ; GARVERICK, 1998).

Uma evidência que o aumento da frequência 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 frequência de pulsos de LH.

Além disso, as gonadotrofinas têm uma 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).

2.6 Receptores de gonadotrofinas

2.6.1 Receptor para FSH

O gene do receptor para FSH (FSHr) é constituído por dez exons e nove introns, sendo que os primeiros nove exons codificam o extenso domínio extracelular (amino-terminal) do receptor, enquanto o último exon codifica as sete regiões transmembrânicas, a região C terminal do domínio extracelular e os domínios citoplasmáticos ou intracelulares (HECKERT et al., 1992).

A ação do FSH é mediada por receptores de membrana específicos. Simoni et al. (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 (Gs α). 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.

De acordo com Simoni et al. (1997), a homologia do gene FSHr entre diferentes espécies de mamíferos é geralmente alta, atingindo 90% no domínio transmembrânico e 80% no domínio extracelular e na região da cauda carboxi-terminal.

2.6.2 Receptor para LH

O gene do receptor para LH (LHr) humano possui estrutura semelhante ao do FSHr, com 11 exons separados por 10 introns (TSAI-MORRIS et al., 1991). O LHr é composto por um domínio extracelular (N-terminal), por sete domínios transmembrânicos e por um domínio intracelular (C-terminal), onde os 10 primeiros exons e parte inicial do exon 11, codificam o domínio extracelular e o exon 11 codifica o restante do receptor (FU-PING et al., 1997).

Sua ação intracelular 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 (STRADER et al., 1994; JIA et al., 1991). 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 (InsP_3), 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 et al., 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).

2.6.3 Expressão dos receptores de gonadotrofinas nas células da granulosa

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; MINEGISHI et al., 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 a ovulação (BAO et al., 1997; EVANS ; FORTUNE, 1997; BAO ; GARVERICK, 1998; ABDENNEBI et al., 1999).

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).

A expressão de receptores para LH nas células da granulosa foi detectada em folículo saudável, maior ou igual a 8 mm de diâmetro, após 36 horas do início da onda folicular (BAO et al., 1997; BAO ; GARVERICK, 1998; BEG et al., 2001). Já segundo Xu et al. (1995) a expressão de receptores para LH nas células da granulosa ocorre em folículos saudáveis maiores que 9 mm de diâmetro e a concentração deste receptor aumenta com o tamanho do folículo.

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).

Todos os trabalhos citados sobre biologia molecular, referentes à expressão de receptores para gonadotrofinas, utilizaram como modelos experimentais bovinos europeus (*Bos taurus taurus*), e a maioria destes trabalhos tiveram como enfoque o momento da divergência folicular, ou seja, o momento da seleção do folículo dominante durante a onda folicular, portanto não há na literatura estudos sobre expressão de receptores para gonadotrofinas associados à maturação sexual de novilhas pré-púberes.

3 OBJETIVOS E HIPÓTESE

3.1 Gerais

Comparar a quantidade de RNAm para receptores de gonadotrofinas nas células da granulosa, no período pré-puberal, entre novilhas Nelore precoces ou não precoces (considerando precoces as novilhas que apresentarem prenhez aos 15 meses de idade).

3.2 Específicos

- I. Identificar a fertilidade precoce em novilhas Nelore.
- II. Semiquantificar o RNAm para receptores de LH e FSH nas células da granulosa de folículos dominantes em crescimento de 8 a 9 mm de diâmetro de novilhas Nelore pré-púberes.
- III. Estabelecer associação entre as variáveis observadas no período pré puberal e a fertilidade precoce de novilhas Nelore.

3.3 Hipótese

Existe diferença na quantidade de RNAm para receptores de LH e FSH nas células da granulosa de folículos em desenvolvimento no período pré-púbere entre novilhas Nelore consideradas com fertilidade precoce, e novilhas não precoces.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Local e período de realização do experimento

O experimento foi desenvolvido nas dependências do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista – UNESP localizado no município de Araçatuba, região Noroeste do estado de São Paulo, distante 530 Km da capital, a 50° 26' longitude Oeste, e 21° 12' latitude Sul, com 398 metros de altitude. O protocolo experimental foi dividido em duas fases, sendo que a primeira (fase de campo) foi iniciada em setembro de 2000 e terminou em janeiro de 2001 e a segunda (fase laboratorial) começou em fevereiro de 2002 e terminou em setembro de 2003.

4.2 Animais

Foram utilizadas 37 novilhas da raça Nelore oriundas da Fazenda São Francisco – Agropecuária CFM Ltda., localizada no município de Magda Paulista na região noroeste do estado de São Paulo. A Agropecuária CFM Ltda é uma empresa que faz seleção genética de seus animais quanto à precocidade reprodutiva há 7 anos e possui um rebanho que apresenta aproximadamente 25% de fertilidade precoce nas fêmeas

(considerando prenhez aos 15 meses de idade) criadas a pasto. Devido a esta seleção optou-se por utilizar os animais deste rebanho que foram emprestados para o experimento, e devolvidos após o término do mesmo. As novilhas com idade média de 12 meses no início do experimento, possuíam um intervalo de 35 dias entre os nascimentos. Os grupos foram formados à medida que as novilhas apresentaram prenhez até os 15 meses de idade diferindo em precoce (P) e não precoce (NP).

4.3 Acompanhamento ultra-sonográfico e aspiração folicular

Foi utilizado um aparelho de ultra-sonografia GE (General Electric TM α-100 CE 0459; GE Medical System, Milwaukee, USA) equipado com um transdutor linear de 5 MHz para uso trans-retal (utilizado para acompanhar a dinâmica folicular) e um transdutor microconvexo de 6,5 MHz para uso trans-vaginal (utilizado para realizar a aspiração de folículos).

O exame dos ovários foi conduzido por 17 dias consecutivos durante o 12º mês de idade permitindo o acompanhamento da emergência de duas ondas foliculares consecutivas (Evans *et al.*, 1994) para caracterizar o início da onda folicular e acompanhar o momento da divergência (seleção do folículo dominante) e o diâmetro do maior folículo (em crescimento) até que o mesmo apresentasse entre 8 e 9 mm de diâmetro, quando então foi individualmente aspirado.

Para a aspiração folicular foi utilizada agulha de 18 g de diâmetro com 58,67 cm de comprimento da RAM IVF Supply (Madison,WI, USA), um tubo de silicone da Medicone

de 1,02 mm de diâmetro interno e 2,16 mm de diâmetro externo, e uma agulha descartável da BD de 40 x 12 mm conectada a uma seringa descartável de 10 ml também da BD e um adaptador artesanalmente feito para transdutor microconvexo.

Os animais foram contidos em um tronco e foi feita assepsia da região posterior com água e sabão neutro, após a assepsia, a região foi secada com papel toalha e foi realizada a anestesia peridural onde foram injetados 3 ml de lidocaína (Lidovet, Laboratório Bravet Ltda, SP, Brasil) para analgesia durante a aspiração.

Os procedimentos descritos por Bols et al. (1995) foram adotados na aspiração de folículos, via trans-vaginal. A guia de biópsia, contendo a sonda setorial e a haste de fixação da agulha de sucção, foi introduzida na vagina até encostar-se ao fundo vaginal, e a partir de manipulação via retal, os ovários foram tracionados para próximo da parede vaginal abdominal. Através de vácuo, produzido por uma seringa estéril de 10 ml conectada ao tubo de silicone e orientação através da ultra-sonografia de imagem e o líquido folicular foi aspirado.

O material aspirado foi colocado em um tubo de plástico de 1,5 ml com tampa de rosca (USA Scientific, Inc.®, FL, USA) e centrifugado (centrífuga Qualitron, Inc, KOREA) por 5 min a 1700 x g e o sobrenadante (líquido folicular), foi retirado e armazenado no freezer a -20°C. Ao precipitado de células, foram adicionados 100 µl de Trizol Reagent® (Invitrogen-Life Technologies, CA, USA), e logo em seguida foi preservado no nitrogênio líquido (-196°C) para posterior processamento.

4.4 Inseminação dos animais

Assim que as novilhas apresentaram um folículo pré-ovulatório com sinais de estro identificados por um rufião, realizou-se a inseminação artificial.

A inseminação foi conduzida através da contenção do animal, retirada de fezes do reto, lavagem e secagem com papel toalha da região perianal e vaginal. O sêmen foi retirado do botijão (Taylor-Wharton modelo 20 XT), com auxílio de uma pinça e descongelado a 37°C. Após o descongelamento a palheta de sêmen foi cortada e o aplicador universal foi montado com a bainha (IMV®) e foi realizada a inseminação transcervical.

Como os animais faziam parte do programa de seleção genética da fazenda, o sêmen utilizado foi doado pela própria fazenda com uma especificação previamente determinada entre touro/novilha, compondo o cruzamento direcionado para a seleção. A qualidade do sêmen foi certificada pela Agropecuária CFM.

4.5 Semiquantificação de receptores para gonadotrofinas

4.5.1 Extração de RNA total

Foi feita a extração de RNA total de 4 amostras por vez, para evitar erros durante a manipulação do material e a degradação do RNA durante o descongelamento das amostras.

Para a extração de RNA total foi utilizado o método de isotiocianato de guanidina (CHAMCZYNSKI; SACCHI, 1987), onde são utilizados os seguintes reagentes: Trizol, clorofórmio, isopropanol, etanol 75% e água dietil pirocarbonato (DEPC).

Conforme protocolo adotado, foi adicionado 1 ml de trizol para cada 100 mg de amostra, as amostras foram pesadas (balança PG 503-S, Mettler Toledo, Greifensee, Suíça) e a maioria pesou aproximadamente 100 mg e portanto foram colocados 900 µl de trizol por amostra, já que haviam sido adicionados 100 µl ao precipitado de células como comentado anteriormente totalizando 1ml de trizol por amostra.

Após a adição do Trizol, as amostras foram homogeneizadas com a própria pipeta (Pipet Lite, Rainin, USA) e incubadas à temperatura ambiente por 5 min (para que ocorresse a dissociação das nucleoproteínas), logo em seguida foram adicionados 200 µl de clorofórmio (para separação das fases orgânicas, proteínas/DNA/RNA), o tubo contendo a amostra foi homogeneizado vigorosamente com as mãos por 15 s e incubados por 2 min à temperatura ambiente.

Os tubos contendo as amostras foram centrifugados (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a 14000 x g por 10 min a 4°C e a fase aquosa foi transferida para um tubo de 1,5 ml (USA Scientific, Inc.®, FL, USA), onde foram adicionados 500 µl de isopropanol (para precipitação do RNA total) e então as amostras foram incubadas por 10 min no gelo. As amostras foram novamente centrifugadas a 14000 x g por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi retirado de forma brusca (invertendo o tubo), restando somente o sedimento no fundo do tubo. Ao sedimento foi adicionado 1 ml de etanol 75% (para lavagem do RNA total) e logo em seguida foi homogeneizado utilizando agitador de tubo (Maxi-Mix Plus™, Thermolyne, Iwoa, USA). Na sequência,

as amostras foram centrifugadas novamente a 7500 x g por 5 min a 4°C e o sobrenadante foi retirado novamente vertendo o tubo de boca para baixo. Os tubos contendo os sedimentos foram secados a vácuo por 8 min (Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

Após a secagem dos sedimentos, aos mesmos foram adicionados 15 µl de água DEPC e dissolvidos no banho-maria (Modelo 146 - FANEM® São Paulo-Brasil) a 56°C por 10 min.

Antes de estocar o RNA total no freezer -86°C (ULT freezer, Thermo Forma, OH, USA), as amostras foram tratadas com DNase (DNase I, FPLC pure™, 10.000 u/ml, Amersham) para evitar alguma contaminação por DNA, seguindo o protocolo: foi colocado 1 µl de Dnase (correspondente a 10 unidades) em cada amostra, e logo em seguida foi incubada no banho-maria a 37°C por 10 min.

4.5.2 Quantificação de RNA total

A quantificação de RNA total foi realizada utilizando uma programação de leitura de RNA (a 260 nm) em um espectrofotômetro (UV/VIS Spectrometer Lambda Bio 10, Perkin Elmer, CT, USA). Foram pipetados 2 µl de cada amostra em tubos de 1,5 ml e nestes foram colocados 748 µl de água DEPC perfazendo um total de 750 µl por tubo (este procedimento foi realizado para atingir a altura mínima de leitura na cubeta do espectrofotômetro).

O espectrofotômetro foi zerado com água DEPC (pois o RNA total foi ressuspensionado em água DEPC), para excluir qualquer interferência da água no momento da leitura das amostras.

Cada amostra foi homogeneizada com a própria pipeta, antes de ser colocada na cubeta do espectrofotômetro, a concentração de RNA total por amostra ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) foi medida três vezes, sendo considerada a média das três aferições.

4.5.3 Síntese de DNA complementar (primeira fita)

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi feita através da reação de transcriptase reversa utilizando-se o sistema Super Script™ First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen-Life Technologies, CA, USA).

O protocolo para a síntese do cDNA foi dividido em quatro fases; sendo a primeira a fase de desnaturação, onde 3 μg de RNA total foram colocados em tubos de 200 μl (USA Scientific, Inc.®, FL, USA), adicionou-se a estes 1 μl de Oligo deoxirribonucleotídeo T e completou-se o volume com água DEPC até atingir 12 μl . Os tubos foram colocados no termociclador (PTC-100™ Programmable Thermal Controller, MJ RESEARCH, Inc., MA, USA) utilizando um programa de 70°C por 10 min e incubados no gelo por 1 min.

Para a segunda fase, chamada fase de anelamento, foi preparado um volume de uma solução ("mix") em função do número de amostras. Por amostra esta solução foi feita com 2 μl tampão PCR 10X + 2 μl MgCl_2 (25mM) + 1 μl dNTP (10mM) + 2 μl DTT (0,1M), para cada amostra foram adicionados 7 μl da solução. Após a adição da solução, as amostras foram levadas ao termociclador utilizando um programa de 42°C por 5 min; após o qual os tubos foram retirados e adicionado a cada amostra 1 μl da enzima SUPER SCRIPT II RT. Após a adição da enzima, os tubos foram

homogeneizados levemente e novamente colocados no termociclador utilizando um programa de 42°C por 50 min acabando a fase de anelamento.

Na fase terminal o programa no termociclador foi mudado para 70°C por 15 min e os tubos foram colocados no gelo por 1 min e centrifugados rapidamente (~10 s). A última fase foi à remoção do RNA com 1 µl de RNase H por amostra e estas foram colocadas no termociclador a 37°C por 20 min. Passados os 20 min completou-se o protocolo de síntese de cDNA primeira fita e as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C.

4.5.4 Construção dos oligonucleotídeos iniciadores

Foram desenhados 3 pares de oligonucleotídeos iniciadores, sendo um par para o GAPDH, outro par para o gene FSHr e outro par para o gene LHr.

O par de oligonucleotídeos iniciadores para GAPDH foi construído utilizando a sequência de nucleotídeos de bovinos (*Bos taurus taurus*) depositada no GEN BANK (U85042), foi feito um alinhamento (BLAST 2 SEQUENCE) do GAPDH bovino com o GAPDH humano (GEN BANK – J04038), sendo este último com delimitação dos exons, conseguindo desta maneira estimar os exons do GAPDH bovino e com isto os oligonucleotídeos foram desenhados para o exon 4, sendo sua sequência 5' AGTGGGGTGATGCTGGTGCTGAGTA 3', e os oligonucleotídeos iniciadores reverso foi desenhado para o exon 7, sendo sua sequência 5' ACGCCTGCTTCACCACCTTCTTGAT 3', amplificando assim um fragmento com 540 pb.

Os oligonucleotídeos iniciadores para FSHr foram desenhados utilizando a sequência de nucleotídeos de bovinos (*Bos taurus taurus*) depositada no GEN BANK (L22319), e também foi feito o alinhamento deste gene com os exons de FSHr humano (GEN BANK - X91738, X91739, X91740, 91741, X91742, X91743, X91744, X91745, X91746 e X91747; referentes aos exons 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 respectivamente). Com isto, foram estimados os exons do FSHr bovino e foram desenhados os oligonucleotídeos iniciadores para o exon 9, com a seguinte sequência, 5' GCTGCGGGCCAAGTCAACTTACCGC 3', e os oligonucleotídeos iniciadores reverso foram desenhados no exon 10, sendo 5' GCGTCTGGCTCAGGGGAGCAAGTCA 3', amplificando um fragmento de 327 pb.

Os oligonucleotídeos iniciadores para LHr foram desenhados utilizando a sequência de nucleotídeos de bovinos (*Bos taurus taurus*) depositada no GEN BANK (U20504). Para a localização dos exons foi consultada a tese de mestrado de Millazoto (2001), e assim os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados para o exon 9, com a seguinte sequência, 5' CCCCAGCCACTGCTGTGCTTTTAGA 3', e os oligonucleotídeos iniciadores reverso foram desenhados para o exon 11 com esta sequência 5' GGGATTGAAAGCATCTGGTTCAGGA 3', amplificando um fragmento de 232 pb.

Os 3 pares de oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados sem a ajuda de "sites" indicados para elaboração de oligonucleotídeos iniciadores. O critério adotado foi que os oligonucleotídeos iniciadores deveriam apresentar uma alta porcentagem de guanina (G) e citosina (C) o que teoricamente tornaria os mesmos bem específicos, pois a temperatura de anelamento seria alta (INNIS ; GELFAND, 1990).

4.5.5 Padronização do número de ciclos e temperatura de anelamento

Para a padronização do número de ciclos e temperatura de anelamento, foram utilizados folículos de 8 a 9 mm aspirados de ovários coletados em frigorífico, dos quais foram aspirados folículos de 8 a 9 mm de diâmetro. Foram realizadas a extração de RNA total e a síntese de cDNA destas amostras.

Reações com volume final de 50 µl foram preparadas para o *multiplex* GAPDH e FSHr (GF) contendo: 2 µl de cDNA, 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 (Ph 8,0), 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 (sendo 10 pM a concentração de todos os oligonucleotídeos iniciadores) e 0,5 µl ou 2,5 unidades (U) de Taq DNA polimerase.

As condições de reação foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguido de 34 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 70°C por 30 s e extensão a 72°C por 2 min, e após o término dos ciclos, não houve extensão final. Para a padronização do número de ciclos para o *multiplex* GF foram colocadas 5 amostras no termociclador e foi retirada uma amostra a cada 2 ciclos a partir do 26º ciclo até completar os 34 ciclos. Após o término dos ciclos, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% a 100 mA por uma hora e cinquenta minutos (Electrophoresis Power Supply Model 250 EX/Gibco BRL, MD, USA) coradas com brometo de etídio (Fig.1). As bandas deste gel foram submetidas a um programa de

análise digital (Kodak Digital Science, SP 700 Color Printer, Scientific Imaging Systems, NY, USA) onde foi avaliada a intensidade média de cada banda (Graf. 1), e assim foi possível padronizar o 28^o ciclo para GAPDH e o 32^o ciclo para o FSHr, pois nestes ciclos o GAPDH e o FSHr apresentaram um aumento linear na intensidade média de suas bandas.

O mesmo procedimento foi realizado para o gene LHr, onde foi colocado o par de oligonucleotídeos iniciadores para LHr. Foi feito um programa no termociclador com 42 ciclos para a padronização do número de ciclos deste *multiplex* (GL). Foram colocadas 9 amostras no termociclador e foi retirada uma amostra a cada 2 ciclos começando no 26^o ciclo até completar o 42^o ciclo. Logo em seguida, as amostras foram visualizadas em gel de poliacrilamida a 8% coradas com brometo de etídio (Fig.2). As bandas deste gel passaram pela mesma análise do gel anterior (Graf. 2) e então padronizou-se 28 ciclos para GAPDH e 38 ciclos para LHr.

Com relação à temperatura de anelamento, foi utilizada a seguinte fórmula para padronização: $2X(A+T) + 4X(G+C)$, o que resultou em 82°C para os oligonucleotídeos iniciadores do gene FSHr, 78°C e 74°C para oligonucleotídeos iniciadores do exon 9 e exon 11 do gene LHr respectivamente e 78°C e 76°C para oligonucleotídeos iniciadores do exon 4 e exon 7 do gene GAPDH respectivamente. Com o uso desta fórmula, as temperaturas ficaram muito altas; por isso para a padronização, a temperatura de anelamento foi diminuída para aumentar a chance de anelamento com pouco DNA, ficando padronizado 70°C de anelamento para os oligonucleotídeos iniciadores, pois nesta, após uma execução prévia as bandas ficaram bem visíveis nos géis.

Figura 1: Gel apresentando a padronização do número de ciclos para o *multiplex* GAPDH (540pb) e FSHr (327pb), chamado de *multiplex* GF. Coluna 1= Sem DNA (controle negativo); coluna 2= peso molecular 50pb; coluna 3= GF com 26 ciclos de amplificação; coluna 4= GF com 28 ciclos de amplificação; coluna 5=GF com 30 ciclos de amplificação; coluna 6= GF com 32 ciclos de amplificação e coluna 7= GF com 34 ciclos de amplificação – Araçatuba, 2003.

Gráfico 1: Representação gráfica dos resultados da intensidade média das bandas em função da variação do número de ciclos para o *multiplex* GF da Fig. 1 – Araçatuba, 2003.

Figura 2: Gel apresentando a padronização do o número de ciclos para o *multiplex* GAPDH (540pb) e LHr (232pb) chamado de *multiplex* GL. Coluna 1= peso molecular 50pb; coluna 2= GL com 26 ciclos de amplificação; coluna 3= GL com 28 ciclos de amplificação; coluna 4= GL com 30 ciclos de amplificação; coluna 5= GL com 32 ciclos de amplificação; coluna 6= GL com 34 ciclos de amplificação; coluna 7= GL com 36 ciclos de amplificação; coluna 8= GL com 40 ciclos de amplificação; coluna 9= GL com 38 ciclos de amplificação e coluna 10= GL com 42 ciclos de amplificação – Araçatuba, 2003.

Gráfico 2: Representação gráfica dos resultados da intensidade média das bandas em função da variação do número de ciclos para o *multiplex* GL da Fig. 2 – Araçatuba, 2003.

4.5.6 Padronização da quantidade de RNA total para síntese de cDNA

Foi feita a síntese de cDNA a partir de diferentes quantidades de RNA total para os dois *multiplex* (GF e GL) para verificar se a quantidade de cDNA aumenta em função da quantidade de RNA total. Como o número de ciclos já havia sido padronizado, foi realizada a síntese de cDNA com de 0,5 µg, 1 µg, 2 µg, 3 µg e 4 µg de RNA total para os *multiplex* GF e GL, onde em ambos a amplificação para GAPDH foi com 28 ciclos (Figs.3 e 5 e Grafs. 3 e 5), para o FSHr com 32 ciclos (Fig. 4 e Graf. 4) e para o LHr com 38 ciclos (Fig. 6 e Graf. 6). A partir dos resultados foram estabelecidos 3 µg de RNA total como o ideal para a síntese de cDNA e conseqüente semiquantificação da expressão dos genes em estudo.

Figura 3: Gel mostrando a variação na quantidade de amplificação de um fragmento do cDNA em função da variação na quantidade de RNA total para o gene GAPDH (540 pb) no *multiplex* GF com 28 ciclos de amplificação. Coluna 1: sem DNA (controle negativo); coluna 2: peso molecular (100 pb); coluna 3: síntese de cDNA com 0,5 µg de RNA total; coluna 4: síntese de cDNA com 1 µg de RNA total; coluna 5: síntese de cDNA com 2 µg de RNA total; coluna 6: síntese de cDNA com 3 µg de RNA total; coluna 7: síntese de cDNA com 4 µg de RNA total – Araçatuba, 2003.

Gráfico 3: Representação gráfica da variação na quantidade de amplificação de um fragmento do cDNA em função da variação na quantidade de RNA total para o gene GAPDH no *multiplex* GF, utilizando como referência à intensidade média das bandas da Fig. 3 – Araçatuba, 2003.

Figura 4: Gel apresentando variação na quantidade de amplificação de um fragmento do cDNA em função da variação na quantidade de RNA total para o gene FSHr (327 pb) no *multiplex* GF com 32 ciclos de amplificação. Coluna 1: peso molecular (100 pb); coluna 2: síntese de cDNA com 0,5 µg de RNA total; coluna 3: sem DNA (controle negativo); coluna 4: síntese de cDNA com 1 µg de RNA total; coluna 5: síntese de cDNA com 2 µg de RNA total; coluna 6: síntese de cDNA com 3 µg de RNA total; coluna 7: síntese de cDNA com 4 µg de RNA total – Araçatuba, 2003.

Gráfico 4: Representação gráfica da variação na quantidade de amplificação de um fragmento do cDNA em função da variação de RNA total para o gene FSHr no *multiplex* GF, utilizando como referência à intensidade média das bandas da Fig. 4 – Araçatuba, 2003.

Figura 5: Gel mostrando a variação na quantidade de amplificação de um fragmento do cDNA em função da variação da quantidade de RNA total para o gene GAPDH (540 pb) no *multiplex* GL com 28 ciclos. Coluna 1: sem DNA (controle negativo); coluna 2: peso molecular (100 pb); coluna 3: síntese de cDNA com 0,5 µg de RNA total; coluna 4: síntese de cDNA com 1 µg de RNA total; coluna 5: síntese de cDNA com 2 µg de RNA total; coluna 6: síntese de cDNA com 3 µg de RNA total; coluna 7: síntese de cDNA com 4 µg de RNA total – Araçatuba, 2003.

Gráfico 5: Representação gráfica da variação na quantidade de amplificação de um fragmento do cDNA em função da variação na quantidade de RNA total para a expressão do gene GAPDH no *multiplex* GL, utilizando como referência à intensidade média das bandas da Fig. 5 – Araçatuba, 2003.

Figura 6: Gel mostrando variação na quantidade de amplificação de um fragmento do cDNA em função da variação na quantidade de RNA total para o gene LHr (232 pb) no *multiplex* GL com 38 ciclos. Coluna 1: sem DNA (controle negativo); coluna 2: peso molecular (100 pb); coluna 3: síntese de cDNA com 0,5 µg de RNA total; coluna 4: síntese de cDNA com 1 µg de RNA total; coluna 5: síntese de cDNA com 2 µg de RNA total; coluna 6: síntese de cDNA com 3 µg de RNA total; coluna 7: síntese de cDNA com 4 µg de RNA total – Araçatuba, 2003.

Gráfico 6: Representação gráfica da variação na quantidade de amplificação de um fragmento do cDNA em função da variação na quantidade de RNA total para o gene LHr no *multiplex* GL, utilizando como referência a intensidade média das bandas da Fig. 6 – Araçatuba, 2003.

4.5.7 Justificativa para o uso de *multiplex* e semiquantificação da expressão dos receptores de gonadotrofinas

Foi realizado *multiplex* (amplificação de mais de um gene por reação) devido à metodologia de trabalho adotada, onde foi utilizado um controle interno (GAPDH) para corrigir alguma variação na quantidade de material de amostra para amostra (THELLIN et al., 1999). Foi escolhido o GAPDH, por ser um gene estrutural nas células da granulosa e por já ter sido 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.

Cada *multiplex* foi feito a partir de 2 µl de cDNA por tubo totalizando 4 µl de cDNA para o *multiplex* GF e 4 µl de cDNA para o *multiplex* GL por amostra, em função de ter sido usado 2 números de ciclos diferentes por *multiplex* (sendo 28 ciclos para o GAPDH, 32 ciclos para o FSHr e 38 ciclos para o LHr).

A semiquantificação da expressão dos receptores de gonadotrofinas foi obtida utilizando um programa, de análise digital para a leitura de intensidade média da coloração da fotografia das bandas nos géis. Todas as amostras foram visualizadas em géis de poliacrilamida a 8% coradas em uma solução de, 0,02% de TBE/brometo de etídio (Invitrogen-Life Technologies, CA, USA).

Os valores obtidos pela intensidade média das bandas dos genes em estudo foram normalizados pelo controle interno GAPDH (ABDENNEBI, et al., 2002), que foi realizado da seguinte maneira: tanto para o gene FSHr como LHr, o valor da intensidade média da banda do receptor de gonadotrofina foi dividido pelo valor da

intensidade média da banda do GAPDH com 28 ciclos de amplificação referente à amostra de cDNA do mesmo animal, este procedimento foi realizado para cada amostra.

4.5.8 Sequenciamento

Foi realizado o sequenciamento de uma banda que apareceu a mais, no *multiplex* GL (com aproximadamente 150 pb).

O sequenciamento foi realizado no laboratório de Biotecnologia Animal do professor doutor Luís Lehman Coutinho, localizado na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz” da Universidade de São Paulo, em Piracicaba-SP.

Para o sequenciamento desta banda foi utilizado o kit para purificação de DNA em gel (PREP-A-GENE® DNA Purification Systems, Bio-Rad, CA, USA), com o seguinte protocolo: as amostras foram recortadas do gel de agarose a 2% (*low melting*) e colocadas em tubos de plástico de 1,5 ml. Cada fragmento foi pesado em balança de precisão. O peso de cada fragmento foi multiplicado por 3 para ser convertido em µl de tampão de ligação, os quais foram adicionados às amostras. O material foi homogeneizado utilizando-se um agitador de tubos e colocado no banho-maria por 10 min a 50°C. Logo em seguida foram colocados 5 µl de matriz por amostra e deixado à temperatura ambiente por 10 min, sendo homogeneizado a cada 3 min. O material foi centrifugado a 14000 x g por 2 min e o sobrenadante foi retirado invertendo o tubo, na sequência foram colocados 125 µl de tampão de ligação e novamente foi centrifugado a 14000 x g por 2 min. O sobrenadante foi retirado como descrito anteriormente e foram colocados 125 µl de tampão de lavagem e mais uma vez o material foi centrifugado a 14000 x g por 2 min. O sobrenadante foi retirado e os tubos foram

deixados abertos para a total secagem do material. Após a secagem foram colocados 50 µl de tampão de eluição e as amostras foram colocadas no banho-maria a 50°C por 15 min para que o DNA se desprendesse da matriz. O sobrenadante com o DNA foi retirado utilizando-se uma pipeta, foi colocado em tubos de 200 µl e estocados a -20°C para posterior sequenciamento.

O sequenciamento foi realizado no seqüenciador ABI 3100 (Applied Biosystems, CA, USA) e a reação para cada amostra foi: 2 µl de kit Big Dye V.3 (Applied Biosystems, CA, USA), 2 µl de tampão (MgCl₂ e EDTA), 1 µl de oligonucleotídeos iniciadores a 5 pM/µl e 5 µl de DNA.

Estes reagentes foram submetidos a um programa de 96°C por 2 min (desnaturação inicial), seguindo de 24 ciclos de 96°C por 45 s, 70°C por 30 s e 60°C por 4 min.

A reação foi purificada com isopropanol e etanol para retirar o excesso de deoxinucleotídeos, oligonucleotídeos iniciadores e enzima aplicada no sequenciador.

4.6 Análise estatística

Para análise comparativa da expressão para receptores de FSH e LH entre P e NP, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, uma vez para a comparação dos valores provenientes de frações (expressão do gene receptor de gonadotrofina dividido pela expressão do gene de controle interno), recomenda-se um

teste não-paramétrico, apesar dos valores passarem no teste de normalidade (teste Kolmogorov-Smirnov).

As amostras que não apareceram nos géis não foram utilizadas na análise estatística.

Os programas GraphPad InStat e GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software, Inc. 5755 Oberlin Drive, #110 San Diego, CA 921221 USA) foram utilizados para teste estatístico e para a construção dos gráficos.

Foi considerado um nível de significância de 5% e em todos os gráficos e tabela e os valores são apresentados como média $\pm$ EPM.

5 RESULTADOS

5.1 Inseminação artificial e fertilidade

Das 37 novilhas acompanhadas, 13 ficaram prenhes até o final do experimento e foram classificadas como P e as 24 não prenhes foram classificadas como NP. Durante os procedimentos para a aspiração folicular e armazenamento das amostras, 15 animais foram excluídos do estudo, sendo 7 por perda do material na aspiração folicular e 8 por degradação do RNA, pois não foi possível a visualização das bandas no gel de poliacrilamida após a extração, síntese de DNA complementar e amplificação dos genes em estudo. Portanto os dados serão apresentados para 22 animais, dos quais 6 foram P e 16 foram NP, levando-se em consideração prenhez aos 15 meses de idade.

5.2 Semiquantificação da expressão do gene FSHr

Nas células da granulosa de um folículo em crescimento com 8-9 mm em 22 novilhas Nelore aos 12 meses de idade, encontramos $1,17 \pm 0,03$ UA resultado da análise digital da semiquantificação da expressão do gene para o FSHr. Não encontramos diferença entre P e NP (Tab. 1). Nas Figs. 7 e 8 são apresentados dois

géis representativos dos animais P e NP respectivamente; enquanto que no gráfico 7 são apresentadas as médias dos grupos P e NP.

Figura 7: Gel apresentando a variação na quantidade de amplificação de um fragmento do cDNA em 3 animais precoces para o *multiplex* GF. Coluna 1= peso molecular 50 pb; coluna 2= GF do animal 154 com 28 ciclos de amplificação; coluna 3= GF do animal 154 com 32 ciclos de amplificação; coluna 4= GF do animal 157 com 28 ciclos de amplificação; coluna 5= GF do animal 157 com 32 ciclos de amplificação; coluna 6= GF do animal 212 com 28 ciclos de amplificação e coluna 7= GF do animal 212 com 32 ciclos de amplificação – Araçatuba, 2003.

Figura 8: Gel apresentando a variação na quantidade de amplificação de um fragmento do cDNA em 4 animais não precoces para o *multiplex* GF. Coluna 1= peso molecular 50pb; coluna 2= GF do animal 38 com 28 ciclos de amplificação; coluna 3= GF do animal 38 com 32 ciclos de amplificação; coluna 4= GF do animal 83 com 28 ciclos de amplificação; coluna 5= GF do animal 83 com 32 ciclos de amplificação; coluna 6= GF do animal 122 com 28 ciclos de amplificação; coluna 7= GF do animal 122 com 32 ciclos de amplificação; coluna 8= GF do animal 204 com 28 ciclos de amplificação e coluna 9= GF do animal 204 com 32 ciclos de amplificação – Araçatuba, 2003.

Gráfico 7- Comparação da intensidade média das bandas para a amplificação de um fragmento do cDNA para o receptor do hormônio folículo estimulante (FSHr) entre o grupo precoce (P, n=6) e o grupo não precoce (NP, n=16) de novilhas Nelore pré-púberes aos 12 meses de idade – Araçatuba, 2003.

5.3 Semiquantificação da expressão do gene LHr

Nas células da granulosa de um folículo em crescimento com 8-9 mm em novilhas Nelore aos 12 meses de idade, encontramos $0,78 \pm 0,05$ UA resultado da análise digital da semiquantificação da expressão do gene LHr. Neste experimento, não houve diferença entre P e NP, resultados apresentados na tab. 1. Nas Figs 9 e 10 são apresentados dois géis ilustrativos dos animais P e NP, respectivamente; enquanto que no Graf. 8 são apresentadas às médias dos grupos P e NP.

Nas Figs 9 e 10 também pode-se verificar a ocorrência de *splicing* alternativo para o receptor do LH, onde foi constatado o aparecimento de uma banda em torno de 150 pb.

A semiquantificação do *splicing* alternativo do receptor do hormônio luteinizante (LHrs) para todos os animais foi $0,57 \pm 0,04$ UA, sendo que não houve diferença entre a expressão de RNAm para LHrs entre o grupo P e o grupo NP em novilhas Nelore aos 12 meses de idade, estes resultados são apresentados no Graf. 9 e Tab. 1.

Foi feita uma comparação entre a percentagem da expressão de LHrs em relação à expressão de LHr, sendo que LHrs foi sempre colocado como numerador e LHr foi sempre colocado como denominador (LHrs/LHr) e este valor foi multiplicado por 100 para obtermos o resultado em percentagem; este procedimento foi realizado para todos os animais. A proporção entre LHrs e LHr para todos os animais foi de $73,76 \pm 2,98\%$, sendo que houve uma diferença entre o grupo P e o grupo NP, onde as novilhas P apresentaram uma maior proporção de *splicing* alternativo em relação ao receptor

normal quando comparadas com novilhas NP; estes resultados são apresentados no Graf. 10 e na Tab. 1, são apresentadas às médias do grupo P e NP e a proporção entre LHrs e LHr.

Figura 9: Gel apresentando a variação na quantidade de amplificação de um fragmento de cDNA em 3 animais precoces para o *multiplex* GL. Coluna 1= peso molecular 50pb; coluna 2= GL do animal 154 com 28 ciclos de amplificação; coluna 3= GL do animal 154 com 38 ciclos de amplificação; coluna 4= GL do animal 157 com 28 ciclos de amplificação; coluna 5= GL do animal 157 com 38 ciclos de amplificação; coluna 6= GL do animal 212 com 28 ciclos de amplificação e coluna 7= GL do animal 212 com 38 ciclos de amplificação. Presença da banda contendo o *splicing* alternativo na posição de 150pb – Araçatuba, 2003.

Figura 10: Gel apresentando a variação na quantidade de amplificação de um fragmento de cDNA em 4 animais não precoces para o *multiplex* GL. Coluna 1= peso molecular 50pb; coluna 2= GL do animal 38 com 28 ciclos de amplificação; coluna 3= GL do animal 38 com 38 ciclos de amplificação; coluna 4= GL do animal 83 com 28 ciclos de amplificação; coluna 5= GL do animal 83 com 38 ciclos de amplificação; coluna 6= GL do animal 122 com 28 ciclos de amplificação; coluna 7= GL do animal 122 com 38 ciclos de amplificação; coluna 8= GL do animal 204 com 28 ciclos de amplificação e coluna 9= GL do animal 204 com 38 ciclos de amplificação. Presença da banda contendo *splicing* alternativo na posição de 150pb – Araçatuba, 2003.

Gráfico 8- Comparação da intensidade média das bandas para a amplificação de um fragmento do cDNA para o receptor do hormônio luteinizante (LHr) entre o grupo precoce (P, n=6) e o grupo não precoce (NP, n=16) de novilhas Nelore pré-púberes aos 12 meses de idade – Araçatuba, 2003.

Gráfico 9- Comparação da intensidade média das bandas para a amplificação de um fragmento do cDNA para o *splicing* alternativo do receptor do hormônio luteinizante (LHrs) entre o grupo precoce (P, n=6) e o grupo não precoce (NP, n=16) de novilhas Nelore pré-púberes aos 12 meses de idade – Araçatuba, 2003.

Gráfico 10- Comparação da intensidade média das bandas para a amplificação de um fragmento do cDNA para o *splicing* alternativo do receptor do hormônio luteinizante (LHrs) dividido pela intensidade média das bandas do receptor do hormônio luteinizante (LHr) multiplicado por 100, entre o grupo precoce (P, n=6) e o grupo não precoce (NP, n=16) de novilhas Nelore pré-púberes aos 12 meses de idade. Barra assinalada (*) indica diferença estatística – Araçatuba, 2003.

Tabela 1- Intensidade média (média±EPM) das bandas para o FSHr, para o LHr, para o LHrs corrigidas pelo GAPDH (controle interno) e para o LHrs dividido pela intensidade média das bandas do LHr, em células da granulosa de folículos em desenvolvimento de novilhas Nelore Precoce (n=6) e Não Precoce (n=16) – Araçatuba, 2003.

Animais	FSHr (UA)	LHr (UA)	LHrs (UA)	LHrs/LHr (%)
Novilhas P	1,14±0,07	0,79±0,12	0,66±0,11	83,66±4,26 (*)
Novilhas NP	1,19±0,04	0,78±0,05	0,54±0,04	70,05±3,39 (*)
Novilhas P+NP**	1,17±0,03	0,78±0,05	0,57±0,04	73,77±2,98

(*) Diferenças significativas ($p>0,05$) na coluna.

(**) Não participou da análise estatística.

5.4 Análise do sequenciamento

Foi realizado o sequenciamento das bandas provenientes de RNA total de 3 animais, embora esta banda tenha aparecido em todos os animais do experimento, sugerindo que todos os animais apresentaram deleção do exon 10 para o gene LHr.

Na Fig. 11 é apresentada a seqüência de pares de base depositada no Gen Bank para a região do LHr amplificada pelos oligonucleotídeos iniciadores para o exon 9 e 11. Nas Figs. 12 e 13 são mostrados os resultados dos sequenciamentos da banda que apareceu devido ao *splicing* alternativo utilizando os oligonucleotídeos iniciadores para

o exon 11 e 9, respectivamente. E nas Figs. 14 e 15 são mostrados o resultado do alinhamento (BLAST 2 Sequence) da banda seqüenciada com a seqüência depositada no Gen Bank utilizando os oligonucleotídeos iniciadores reverso para o exon 11 e para o exon 9, respectivamente.

```

01  cccagccac tgctgtgctt ttagaaactt gccacaaac gagcaaaatt tttcattttc 60
61  cattttttaa aactttttcca aacaatgtga aagcacagca aggagaccaa ataatgaaac 120
121 actttattct gccatctttg ctgagagtga actgagtggc tgggattatg actatgggtt 180
181 ctgcttacc aagacactcc agtgtgtctc tgaaccagat gctttcaatc cc 232

```

Figura.11: Representação da seqüência de nucleotídeos do fragmento do receptor para LH (parte do exon 9 até o início do exon 11). As letras na cor cinza representam os oligonucleotídeos iniciadores, as letras na cor azul representam o exon 9, as letras na cor vermelha representam o exon 10 e as letras na cor preta representam o exon 11 (seqüência depositada no Gen Bank = U20504) – Araçatuba, 2003.

```

01  cagccnctca gttntctctc agcaaagatg gcagaataat cgtttggttg caagtttcta 60
61  aaagcacagc actggctggg g 81

```

Figura.12: Sequenciamento da banda do *splicing* alternativo, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores reverso para o exon 11 – Araçatuba, 2003.

```

01  tgagagtgaa ctgagtggct gggattatga ctatgggttc tgcttacc aagacactcca 60
61  gtgtgtctct gaaccagatg ctttcaatcc c 91

```

Figura.13: Sequenciamento da banda do *splicing* alternativo, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores para o exon 9 – Araçatuba, 2003.

Figura 14. Alinhamento da banda seqüenciada com a seqüência depositada no Gen Bank utilizando os oligonucleotídeos iniciadores reverse para o exon 11 – Araçatuba, 2003.

Banda seqüenciada : 40 tcgtttggttggaagtttctaaaagcacagcactggctgggg 81
 Seqüência Gen Bank : 42 tcgtttggttggaagtttctaaaagcacagcactggctgggg 1

Banda seqüenciada : 1 cagccnctcagttntctctcagcaaagatggcagaataa 39
 Seqüência Gen Bank: 162 cagccactcagttcactctcagcaaagatggcagaataa 124

6 DISCUSSÃO

6.1 Fertilidade precoce

Durante o experimento observamos que 35% (13 de 37) das novilhas ficaram prenhes aos 15 meses de idade.

A idade a puberdade representa um evento importante na vida reprodutiva da fêmea bovina, sendo caracterizada pela idade na qual o animal ovula pela primeira vez com manifestação de estro. Considerando que existe diferença de expressão desse fenótipo, cuja herdabilidade é alta (0,40 a 0,50), há a possibilidade do envolvimento de genes que possam ser identificados (MARSON ; FERRAZ, 2001b; ELER et al., 2002).

Neste experimento consideramos fertilidade precoce (diagnóstico de gestação positivo até 15 meses de idade) tendo como referência às fêmeas de raças européias que geralmente apresentam o primeiro parto aos 24 meses de idade. Alguns autores denominam esse critério como “sistema um ano” (ROCHA; LOBATO, 2002).

A idade ao primeiro parto pode ser utilizada como característica indicadora do início da atividade reprodutiva das fêmeas, pois sua caracterização é facilitada considerando a realidade da pecuária brasileira. A detecção do primeiro estro envolve mão de obra e a utilização de rufiões com marcadores, por longos períodos, dificultando a aplicabilidade da identificação desse evento (BERGMANN, 1998).

O objetivo na identificação de genes para características específicas, por marcadores moleculares, consiste na seleção de animais que apresentam fenótipos

superiores ligados a regiões cromossômicas que afetam as características de interesse acarretando uma maior velocidade e precisão no melhoramento genético. Outra contribuição direta dos marcadores genéticos na seleção é que eles utilizam características completamente herdáveis, que podem ser mensuradas em qualquer idade ou sexo e que sobretudo, são potencialmente correlacionadas com características de valor econômico (MARSON ; FERRAZ, 2001a).

O uso de marcadores moleculares maximiza as taxas de ganho genético, por aumento na acurácia da seleção e redução do intervalo de gerações, viabilizando a seleção de características desejáveis em animais jovens, ou mesmo em embriões, assim como em animais cujo sexo não permite a expressão da característica desejada, ou ainda para aquelas que dependem do abate do animal para serem mensuradas, convergindo para a tomada precoce de decisões de seleção que conseqüentemente afetarão o material genético de toda a população (BISHOP et al., 1995; BEUZEN et al., 2000).

Algumas mutações são encontradas em genes envolvidos no desenvolvimento sexual e na função do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. Entre estes genes, foram encontradas mutações nos genes receptores de gonadotrofinas mutações que resultam em ativação e inativação, sendo que algumas destas estão relacionadas à maturação sexual (HUHTANIEMI, 2002).

6.2 Expressão para receptores de gonadotrofinas

Neste estudo, encontramos dificuldades em colher material para trabalhar com expressão gênica, pois os animais foram emprestados de uma fazenda agropecuária e por isso não foi possível a castração dos mesmos para a colheita das células da granulosa, como descrito na maioria dos trabalhos publicados (XU et al., 1995; RAJAPAKSHA et al., 1996; BAO et al., 1997; EVANS; FORTUNE, 1997). Além disso o delineamento experimental envolvia a colheita de material de um único folículo (individualizado) por animal o que proporcionou a perda de amostras (15) e resultou em quantidade reduzida de material (células da granulosa), pois na aspiração folicular via trans-vaginal a quantidade de células da granulosa recuperada de um único folículo aspirado é inferior a conseguida quando se diseca o folículo após a castração.

A expressão do FSHr é regulada pelo próprio FSH e pelo estradiol que podem ter uma ação sinérgica. Tem sido observado que esta combinação também pode estimular a formação de receptores para LH nas células da granulosa (pós-seleção), existindo uma correlação entre concentração de estradiol no líquido folicular e a quantidade de receptores de LH nas células da granulosa (RAJAPAKSHA et al., 1996; EVANS ; FORTUNE, 1997).

A expressão de receptores para LH nas células da granulosa foi detectada em folículo saudável, maior ou igual a 8 mm de diâmetro, após 36 horas do início da onda folicular (BAO et al., 1997; BAO ; GARVERICK, 1998; BEG et al., 2001). O desenvolvimento de receptores para LH nas células da granulosa torna o folículo dominante menos dependente do FSH. Contudo, em ruminantes os folículos

dominantes precisam de um suporte de concentração basal de FSH (BAO ; GARVERICK, 1998).

Como a expressão do LHr foi detectada nas células da granulosa somente após o desvio, decidimos trabalhar com folículos entre 8 e 9 mm de diâmetro (considerando que nesta medida já tenha ocorrido a seleção do folículo dominante em *Bos taurus indicus*) e como após a seleção, os ruminantes necessitam de um suporte de FSH, resolvemos estudar também a expressão para FSHr, com a possibilidade de encontrarmos variáveis moleculares quantitativas que possam colaborar para possíveis marcadores moleculares para precocidade sexual em bovinos.

Como apresentado nos resultados, não houve diferença na quantidade da expressão de receptores de gonadotrofinas entre novilhas Nelore P e NP aos 12 meses de idade (Tab. 1).

Este resultado frustrou as expectativas de que poderia haver uma diferença semiquantitativa na expressão dos receptores de gonadotrofinas principalmente para o LH nas células da granulosa dos folículos dominantes, neste estágio estes são quase totalmente dependentes de LH (GINTHER et al., 1997). Foi observada diferença no diâmetro do folículo dominante aos 12 e 14 meses de idade entre novilhas Nelore P e NP, porém não foi encontrada diferença nas concentrações séricas de LH (NOGUEIRA et al., 2003). Como a síntese e liberação de gonadotrofinas são controladas pelo hipotálamo, esperávamos uma diferença entre P e NP no padrão de secreção das gonadotrofinas, principalmente na liberação do LH.

Maiores folículos com a mesma quantidade de LH sugere uma diferente resposta gonadal entre P e NP o que poderia ser consequência da diferença na quantidade de expressão dos receptores para gonadotrofinas.

Na literatura não existem trabalhos relacionando à fertilidade precoce em bovinos com variação na expressão de receptores para gonadotrofinas nas gônadas, o que dificultou a discussão dos resultados encontrados neste experimento, pois os trabalhos encontrados na literatura sobre expressão de receptores para gonadotrofinas em bovinos tiveram como objetivo caracterizar alterações moleculares que ocorrem no momento da seleção do folículo dominante durante a onda folicular.

Durante o período pré-púbere em fêmeas bovinas, o eixo hipotálamo-hipófise gonadal é regulado por retroalimentação negativa do estradiol. A mudança na resposta do hipotálamo ao estradiol, de retroalimentação negativa para positiva está relacionada a uma diminuição na sensibilidade do hipotálamo, envolvendo diminuição nos receptores para estradiol (DAY et al, 1984; DAY et al., 1987; RODRIGUES et al., 2002).

Apesar da inibição da secreção de gonadotrofinas no período pré-puberal envolver o excesso de receptores de estradiol no hipotálamo, a participação das gônadas através da produção para estradiol exerce um importante efeito modulatório da maturidade sexual. 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 as gonadotrofinas.

6.3 *Splicing* alternativo para receptores de LH

No presente estudo foi identificado *splicing* alternativo (Figs. 10 e 11) para receptor de LH onde foi constatada através de sequenciamento que a banda inesperada apresentou deleção do exon 10 deste gene. Esta ocorrência já foi citada na literatura para outros tecidos em humanos (GROMOLL et al., 2000); em macacos (FU-PING et al., 1997; GROMOLL et al., 2003), em ovinos (BACICH et al., 1994; BACICH et al., 1999; ABDENNEBI et al., 2002) e em bovinos (KAWATE ; OKUDA, 1998).

Com a deleção total do exon 10, são perdidos 81 pares de base ou 27 aminoácidos e ainda um aminoácido é substituído, pois o último nucleotídeo do último codon do exon 9 está localizado no exon 10, com o *splicing* será utilizado o primeiro nucleotídeo do exon 11, não alterando a funcionalidade do receptor (GROMOLL et al., 2000) e no experimento foi observado uma substituição de um glutamato (**gag**) por um aspartato (**gat**).

Em humanos, Fu-Ping et al. (1998) descreveram que a falta da expressão do exon 10 no receptor de LH não é importante para a afinidade da ligação hormônio-receptor e para a transdução do sinal, mas é de grande importância para a exteriorização do receptor protéico para a superfície da membrana plasmática da célula. Já Müller et al. (2003) relataram que receptores para LH apresentando deleção do exon 10 são normalmente exteriorizados na superfície celular e que há uma diminuição na produção de AMPc quando estes receptores mutantes são estimulados com LH enquanto que a produção de AMPc ocorre normalmente quando a estimulação é feita com hCG,

sugerindo que a mudança conformacional do receptor mutante parece ser inadequada para estabilizar o mesmo na conformação ativa, quando ocorre a ligação LH-receptor.

Já em macacos calitriquídeos do Novo Mundo, a deleção do exon 10 do LHr ocorre em todos os cDNAs transcritos, apesar de apresentarem o exon 10 no DNA genômico. Este fator não afeta a atividade reprodutiva desta espécie, o que indica que o exon 10 não é essencial para o funcionamento do LHr (FU-PING et al., 1997).

Nesta espécie ocorre a produção de uma gonadotrofina semelhante a coriônica (GC) pela hipófise que pode ser um candidato para a ação luteotrópica nos macacos desta espécie, considerando que foi encontrada alta expressão deste gene na hipófise de machos e fêmeas. O gene da subunidade β da GC é derivado de uma duplicação do gene da subunidade β LH na região não traduzida 3' que foi incorporada para dentro da região traduzida, aumentando 24 aminoácidos na extensão carboxi-terminal (GROMOLL et al., 2003).

Em um trabalho com ratos neonatos foi observada uma mudança de produção de receptores da forma incompleta (*splicing* alternativo) para a forma completa 7 dias após o nascimento (SOKKA et al., 1992).

Bacich et al. (1994) e Bacich et al. (1999) relataram a presença de *splicing* alternativo com deleção do exon 10 do gene LHr de tecido ovariano de ovinos, denominando este tipo de *splicing* de forma F, o que teoricamente traduziria uma proteína similar à proteína do receptor normal, mas faltando alguns aminoácidos do domínio extracelular, o que não impediria a ligação do LH com alta afinidade. Abdennebi et al. (2002) demonstraram que a variação na expressão de receptores de LH com diferentes tipos de *splicing* alternativos, durante a foliculogênese em ovinos

indica que o desenvolvimento folicular pode ser um modelo relevante para o estudo da função dos eventos pós-transcricionais na reprodução.

Em um único trabalho encontrado na literatura relatando *splicing* alternativo em bovinos, Kawate ; Okuda (1998) estudaram o aparecimento deste fenômeno durante o desenvolvimento do corpo lúteo e relataram 3 formas de *splicing* (forma F, B e G, sendo caracterizados pela deleção do exon 10, perda de parte inicial do exon 11 e deleção do exon 10 mais perda da parte inicial do exon 11, respectivamente) coincidindo com as variantes encontradas em ovários de ovinos por Bacich et al. (1994).

Neste experimento foi encontrada a deleção do exon 10 na expressão do gene LHr em todos os animais estudados, sendo que houve uma diferença na porcentagem da expressão do receptor com *splicing* em relação à expressão do receptor normal, quando comparado os animais P e NP, como apresentado nos resultados (Tab. 1 e Graf. 10).

Em função destes resultados é possível que a maior quantidade de expressão de receptores com deleção do exon 10 em novilhas pré-púberes da raça Nelore com 12 meses de idade, melhore de alguma forma a ação do LH, o que contradiz com o encontrado na literatura, como descrito anteriormente por Fu-Ping et al. (1998) e Müller et al. (2003). Há relatos também que expressão adicional de *splicing* alternativo para o gene LHr aumenta a atividade do receptor normal em ovinos (BACICH et al., 1999).

A outra possibilidade seria a hipótese de Gromoll et al. (2003) descrita para calitriquídeos, onde a “gonadotrofina coriônica hipofisária” poderia interagir com estes receptores mutantes, aumentando a produção de AMPc e conseqüentemente melhorando a resposta reprodutiva dos animais precoces. Mais uma possibilidade que

não pode ser descartada é que durante a maturação sexual pode haver uma alteração no padrão de *splicing* alternativo que altere a atividade do receptor de LH, como descrito por Sokka et al. (1992).

Como este estudo foi delineado utilizando somente oligonucleotídeos iniciadores para os exons 9 e 11 para o gene LHr, é preciso estudos para o restante do receptor, pois há relatos na literatura, principalmente em ratos (AATSINKI et al., 1992), da presença de *splicing* alternativo nos exons que codificam o restante do domínio extracelular, o que teoricamente levaria a alteração na afinidade hormônio-receptor e na transmissão do sinal para o interior da célula alvo.

Existem poucos trabalhos na literatura sobre *splicing* alternativo em receptores de LH em bovinos. Recentemente Abdennebi et al. (2002) demonstraram uma mudança no padrão de *splicing* alternativo em ovinos durante a sazonalidade, o que pode sugerir que ocorra o mesmo com bovinos durante a maturação sexual e durante as diferentes fases do ciclo estral, pois bovinos e ovinos apresentam 92% de similaridade em seu receptor protéico para o gene LHr.

A abundância de transcritos difere de uma espécie para outra entre tecidos e podem ser derivados de *splicing* alternativos, diferentes locais no início da transcrição e de diferentes sinais de poliadenilação (FU-PING et al., 1997), portanto são necessários mais estudos sobre a expressão do gene LHr em bovinos, pois a maioria dos trabalhos foi realizada em outras espécies.

7 CONCLUSÕES

Não houve diferença na quantidade relativa da expressão de RNAm para receptores de LH e FSH na célula da granulosa de folículos em desenvolvimento entre novilhas Nelore pré-púberes classificadas posteriormente em P e NP em função da fertilidade precoce.

Foi detectado o aparecimento de *splicing* alternativo do RNAm (com deleção do exon 10) para o receptor de LH em todos os animais do experimento, e este fato pode estar relacionado à fertilidade precoce em novilhas Nelore.

Comparando P com NP houve diferença na percentagem da expressão do receptor com *splicing* alternativo em relação ao receptor normal para LH, onde os animais P apresentaram maior percentagem de expressão do receptor com *splicing* alternativo em relação ao receptor normal.

Foi rejeitada a hipótese da existência de diferença na quantidade da expressão de receptores para LH e FSH em folículos em desenvolvimento entre novilhas Nelore que ficam prenhes aos 15 meses de idade (P) e as que não ficam (NP).

REFERÊNCIAS

AATSINKI, J.T.; PIETILA, E.M.; LAKKAKORPI, J.T.; RAJANIEMI, H.J. Expression of the LH/CG receptor gene in rat ovarian tissue is regulated by an extensive alternative splicing of the primary transcript. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 84; p. 127-135, 1992.

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.

ABDENNEBI, L.; MONGET, P.; PISSET, C.; REMMY, 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**, v.60, p. 845-854, 1999.

ABDENNEBI, L.; LESPORT, A.S.; REMY, J.J.; GREBERT, D.; PISSELET, C.; MONNIAUX, D.; SALESSE, R. Differences in splicing of mRNA encoding LH receptor in theca cells according to breeding season in ewes. **Reproduction**, v. 123, p. 819-826, 2002.

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 Animal Science**, v. 73, p. 267-275, 1993.

Associação Brasileira dos Criadores de Zebu (ABCZ). O Nelore e o Nelore Mocho. (Eletronic Publication). Disponível em <http://www.abcz.org.br/racas/nel.htm>. Acesso em 29 de setembro de 2003.

Associação dos Criadores de Nelore do Brasil (ACNB). Histórico da Raça Nelore. (Eletronic Publication). Disponível em <http://www.nelore.org.br/default3.asp>. Acesso em 29 de setembro de 2003.

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.S. 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.

BACICH, D.J.; EARL, C.D.; O'KEEFE, D.S.; NORMAN, R.J.; RODGERS, R.J. Characterization of the translated products of the alternatively spliced luteinizing hormone receptor in the ovine ovary throughout the oestrous cycle. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 147, p. 113-124, 1999.

BACICH, D.J.; ROHAN, R.M.; NORMAN, R.J.; RODGERS, R.J. Characterization and relative abundance of alternatively spliced luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid in the ovine ovary. **Endocrinology**, v. 135 (2), p. 735-744, 1994.

BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; KOT, K.; WILTBANK, M.C.; GINTHER, O.J. Follicular fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 432-441, 2001.

BERGMANN, J.A.G. Indicadores de Precocidade Sexual em Bovinos de Corte. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DAS RAÇAS ZEBUÍNAS, **Anais**. Uberaba, **Associação Brasileira dos Criadores de Zebu**, p. 145-155, 1998.

BEUZEN, N.D.; STEAR, M.J.; CHANG, K.C. Molecular markers and their use in animal breeding. **Vet. J.**, v.160, p.42-52, 2000.

BISHOP, M.D.; HAWKINS, G.A.; KEEFER, C.L. Use of DNA markers animal selection. **Theriogenology**, v.43, p.61-70, 1995.

BITTENCOURT, T.C.C.; LÔBO, R.B. Objetivos de seleção e ponderadores econômicos na produção de bovinos de corte. São Paulo, Agripoint Ltda, 2003. (Eletronic Publication). Disponível em <http://www.beefpoint.com.br/bn/radarestecnicos/artigo.asp>. Acesso em 10 de setembro de 2003.

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

BODENSTEINER, K.J.; KOT, K.; 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.

BOLS, P.E.J.; VADENHEEDE, J.M.M.; VAN SOOM, A. A transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. **Theriogenology**, v. 43, p. 677-687, 1995.

CAMPAGNARI, F. Novas variantes moleculares dos genes dos receptores do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRHR) e do hormônio folículo estimulante (FSHR) em fêmeas *Bos primigenius indicus* (Nelore). **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – campus de Botucatu, 2002.

CHAMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step methods of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 162, p. 156-159, 1987.

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(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.

DODSON, S.E.; MCLEOD, B.J.; HARESIGN, W.; PETERS, A.R.; LAMMING, G.E.; DAS, D. Ovarian control of gonadotrophin secretion in the prepubertal heifer. **Animal Reproduction Science**, v. 21, p. 1-10, 1989.

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

ELER, J.P.; SILVA, J.A.IV.; FERRAZ, J.B.S.; DIAS, F.; OLIVEIRA, H.N.; EVANS, J.L.; GOLDEN, B.L. Genetic evaluation of the probability of pregnancy at 14 months for Nelore heifers. **Journal Animal Science**, v. 80, p. 951-954, 2002.

EVANS, A.C.O.; 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.O.; 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.O.; 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**, v. 44, p. 725-740, 1995.

EVANS, A.C.O.; 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.

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.

FU-PING ZHANG; KERO, J.; HUHTANIEMI, I. The unique exon 10 of the human luteinizing hormone receptor is necessary for expression of the receptor protein at the plasma membrane in the human luteinizing hormone receptor, but deleterious when inserted into the human follicle-stimulating hormone receptor. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 142, p. 165-174, 1998.

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.

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.; KNOFF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, p. 223-230, 1989.

GINTHER, O.J.; KOT, K.; KULICK, L.J.; WILTBANK, M.C. Emergence and deviation of follicle during the development of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v. 48, p. 75-87, 1997.

GROMOLL, J.; EIHOLZER, U.; NIESCHLAG, E.; SIMONI, M. Male hypogonadism caused by homozygous deletion of exon 10 of the luteinizing hormone (LH) receptor: differential action of human chorionic gonadotropin and LH. **The journal of Clinical Endocrinology ; Metabolism**, v. 85, p. 2281-2286, 2000.

GROMOLL, J.; WISTUBA, J.; TERWORT, N.; GODMANN, M.; MÜLLER, T.; SIMONI, M. A new subclass of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor lacking exon 10 messenger RNA in the new world monkey (*Platyrrhini*) lineage. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 75-80, 2003.

GUDERMANN, T.; BIRNBAUMER M.; and 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.

HODGEN, G.D. The dominant ovarian follicle. **Fertility ; Sterility**, v. 38, p. 281-300, 1982.

HUHTANIEMI, I.T. LH and FSH receptor mutations and their effects on puberty. **Hormone Research**, v. 57(2), p. 35-38, 2002.

INNIS, M.A.; GELFAND, D.H. Optimization of PCRs. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, c. 1; p. 3-12, 1990.

IRELAND, J.J.; ROCHE, J.F. Hypotheses regarding development of dominant follicles during a bovine estrous cycle. In: Roche J.F., O'Callaghan, D. (Eds) **Follicular growth and ovulation rate in farm animals**. Boston: Martinus Nijhoff Publishers, MA, p. 1-18, 1987.

JIA, X.; 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.

KAWATE, N.; OKUDA, K. Coordinated expression of splice variants for luteinizing hormone receptor messenger RNA during the development of bovine corpora lutea. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51 (1), p. 66-75, 1998.

KINDER J.E., DAY M.L., KITTOCK R.J. Endocrine regulation of puberty in cows and ewes. **Journal of Reproduction and Fertility Suppl.**, v. 34, p. 167-186, 1987.

LUCY, M.C.; SAVIO J.D., BADINGA, L.; DE LA SOTA, R.L.; THATCHER, W.W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal Animal Science**, v. 70, p. 3615-3626, 1992.

MANIKKAM, M.; CALDER, M.D.; SALFEN, B.E.; YOUNGQUIST, R.S.; GARVERICK, H.A. Concentrations of steroids and expression of messenger RNA for steroidogenic enzymes and gonadotropin receptors in bovine ovarian follicles of first and second waves and changes in second wave follicles after pulsatile LH infusion. **Animal Reproduction Science**, v. 67, p. 189-203, 2001.

MARSON, E.P.; FERRAZ, J.B.S. Avaliação da contribuição da genética molecular nos programas de melhoramento genético. São Paulo, Agripoint Ltda, 2001a. (Eletronic Publication). Disponível em <http://www.beefpoint.com.br/bn/radarestecnicos/artigo.asp>. Acesso em 08 de setembro de 2003.

MARSON, E.P.; FERRAZ, J.B.S. Fatores genéticos relacionados à idade à puberdade em novilhas de corte. São Paulo, Agripoint Ltda, 2001b. (Eletronic Publication). Disponível em <http://www.beefpoint.com.br/bn/radarestecnicos/artigo.asp>. Acesso em 10 de setembro de 2003.

MORAN, C.; QUIRKE, J.F.; ROCHE, J.F. Puberty in heifers: a review. **Animal Reproduction Science**, v. 18, p. 167-182, 1989.

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.

MÜLLER, T.; GROMOLL, J.; SIMONI, M. Absence of exon 10 of the human luteinizing hormone (LH) receptor impairs LH, but not human chorionic gonadotropin action. **The Journal of Clinical Endocrinology ; Metabolism**, v. 88 (5), p. 2242-2249, 2003.

NOGUEIRA, G.P.; DE LUCIA, R.F.S.; PEREIRA, F.V.; CIRILO, P.D.R. Precocious fertility in Nelore heifers. **Biology of Reproduction (Supplement 1)**, v. 68, p. 382, 2003.

PEREIRA, E.; ELER, J.P.; FERRAZ, J.B.S. Análise genética de características reprodutivas da raça Nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 37(5), p. 703-708, 2002.

PERRY, R.C.; CORAH, L.R.; COCHRAN, R.C.; BRETHOUR, J.R.; OLSON, K.C.; HIGGINS, J.F. Effect of hay quality breed and ovarian development on onset of puberty and reproductive performance of beef heifers. **Journal of Production Agriculture**, v. 4(1), p. 13-18, 1991.

PINEDA, N.R. Pensemos em seleção funcional. **Revista ABCZ**, ano 2, n. 7, março-abril, 2002.

RAMIREZ, D.V.; McCANN, S.M. Comparison of the regulation of luteinizing hormone secretion in immature and adult rats. **Endocrinology**, v. 72, p. 452-464, 1963.

RAJAPAKSHA, W.R.A.K.J.S.; ROBERTSON, L.; O'SHAUGHNESSY, P.J. Expression of follicle-stimulating hormone-receptor mRNA alternate transcripts in bovine granulosa cells during luteinization in vivo and in vitro. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 120, p. 25-30, 1996.

RESTLE, J.; POLLI, V.A.; DE SENNA, D.B. Breed and heterosis effect on age and weight at puberty and reproductive performance of beef heifers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, p. 701-707, 1999.

ROCHA, M.G.; LOBATO, J.F.P. Avaliação do desempenho reprodutivo de novilhas de corte primíparas aos dois anos de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia (Suppl)**, v. 31(3), p. 1388-1395, 2002.

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.

RODRIGUES, H.D.; KINDER, J.E.; FITZPATRICK, L.A. Treatment with 17 β -estradiol does not influence age and weight at puberty in *Bos indicus* heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 56, p. 1-10, 1999.

ROMANO, M.A. Efeito do nível nutricional sobre a antecipação da idade à puberdade e caracterização da dinâmica folicular nos períodos pré e pós-púbere em novilhas Nelore. **Dissertação de Doutorado**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

SAVIO, J.D.; KEENAN, L.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F.. Pattern of growth of dominant follicles during the estrous cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, p. 663-671, 1988.

SIMONI, M.; GROMOLL, J.; NIESCHLAG, E. The follicle stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. **Endocrine Reviews**, v. 18(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.

SMITH, G.W.; GENTRY, P.C.; ROBERTS, R.M.; SMITH, M.F. Ontogeny and regulation of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid within the ovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 76-83, 1996.

SOKKA, T.; HÄMÄIÄINEN, T.; HUHTANIEMI, I. Functional LH receptor appears in the neonatal rat ovary after changes in the alternative splicing pattern of the LH receptor mRNA. **Endocrinology**, v. 130 (3), p. 1738-1740, 1992.

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.

THELLIN, O.; ZORZI, W.; LAKAYE, B.; DE BORMAM, B.; COUMANS, B.; HENNEN, G.; GRISAR, T.; IGOUT, A.; HEINEN, E. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. **Journal of Biotechnology**, v. 75, p. 291-295, 1999.

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. 11355-9, 1991.

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.

WEHRMAN, M.E.; KOJIMA, F.M.; SANCHES, T.; MARISCAL, D.V.; KINDER, J.E. Incidence of precocious puberty in developing beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 2462-2467, 1996.

WOLFE, M.W.; STUMPF, T.T.; ROBERSON, M.S.; WOLFE, P.L.; KITTOCK, R.J.; KINDER, J.E. Estradiol influences on pattern of gonadotropin secretion in bovine males during the period of changed responses to estradiol feedback in age-matched females. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 626-634, 1989.

WOLFE, M.W.; STUMPF, T.T.; ROBERSON, M.S.; KITTOCK, R.J.; KINDER, J.E. Opioid and 17 β -estradiol regulation of LH and FSH secretion during sexual maturation in heifers. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 8(4), p. 491-498, 1991.

WOMACK, J.E. The goals and status of the bovine gene map. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 219-226, 1993.