LUCIA HELENA SIDER

Análise da expressão diferencial de genes do folículo
ovariano de fêmeas pré-púberes e púberes *Bos
primigenius indicus* (Nelore) por meio da Análise Serial
de Expressão Gênica (SAGE)

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. José Fernando Garcia

São Paulo, 2005

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. 1471
FMVZ

Sider, Lucia Helena

Análise da expressão diferencial de genes do folículo ovariano de fêmeas pré-púberes e púberes *Bos primigenius indicus* (Nelore) por meio da Análise Serial de Expressão Gênica (SAGE) / Lucia Helena Sider. – São Paulo : L. H. Sider, 2005.
171 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2005.

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

Orientador: Prof. Dr. José Fernando Garcia.

1. Bovinos. 2. Puberdade. 3. SAGE. 4. Expressão gênica.
5. Folículo ovariano. I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: SIDER, Lúcia Helena

Título: Análise da expressão diferencial de genes do folículo ovariano de fêmeas pré-púberes e púberes *Bos primigenius indicus* (Nelore) por meio da Análise Serial de Expressão Gênica (SAGE)

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: 28 / 3 / 05

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Fernando Garcia Instituição: UNESP - Aracatuba

Assinatura: [assinatura] Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho Instituição: ESALQ - USP

Assinatura: [assinatura] Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Pietro S. B. B. B. B. Instituição: FMVZ - USP

Assinatura: [assinatura] Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. João A. A. A. Instituição: FMVZ USP

Assinatura: [assinatura] Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Anderson F. G. G. Instituição: UNICAMP

Assinatura: [assinatura] Julgamento: Aprovado

Este trabalho foi desenvolvido nas seguintes instituições:

- ✓ Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal da Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP) em Araçatuba.
- ✓ Laboratório de Biologia Molecular e Terapia Gênica do Hemocentro da Universidade de Campinas (UNICAMP) em Campinas.

Dedico este trabalho

Aos meus pais Haraldo e Aina,
Que me apoiaram incondicionalmente em todos os
passos desta trajetória

*“Ensina ao teu filho no caminho em que deve andar
e ainda quando for velho não se desviará dele”*

Provérbios de Salomão 22: 6

Ao meu orientador científico

Fernando,

Por sua excelência como pesquisador e orientador, por sua amizade,
crucial para o sucesso dessa empreitada.

“O homem é do tamanho do seu sonho”

Fernando Pessoa (1888-1935)

Ao meus amigos

Helena, Patrícia e Paulo

Por terem me adotado no meu momento de maior fraqueza. Suas presenças foram cruciais para que eu saísse de crise.

*“Na prosperidade nossos amigos nos conhecem;
na adversidade nós conhecemos nossos amigos”*

John Churton Collins (1888-1935)

AGRADECIMENTOS

- ✓ Ao Doutor Anderson Ferreira da Cunha por seu papel decisivo na realização da técnica SAGE e seqüenciamento subsequente; por sua amizade e apoio intelectual.
- ✓ Ao amigo e ex-estagiário André Ricardo Carvalho Marçon, por sua inestimável ajuda e companhia nos experimentos de SAGE realizados em Araçatuba, por sua colaboração na finalização da tese e por todo apoio logístico e emocional.
- ✓ Aos colegas e amigos Gustavo Arbex Avelar, Fabiane Siqueira, Sérgio Moraes Aoki, Laércio Porto Neto, Sílvia Crusco dos Santos e Maury Dorta de Souza Júnior por sua cooperação nas mais diversas etapas deste projeto, tanto na parte experimental como nas eventuais discussões e correções.
- ✓ Ao Tarcisio Souza Peres e Tiago Ferraz Machado por sua assistência em Bioinformática.
- ✓ Ao Doutor Fernando Costa por permitir que eu utilizasse as dependências de seu laboratório em Campinas.
- ✓ Ao Doutor Guilherme de Paula Nogueira por sua assistência na interpretação dos dados experimentais.
- ✓ À Helena Arantes do Amaral pela sua contribuição na compilação dos resultados.
- ✓ A Professora Doutora Cárís Maroni Nunes e ao Professor Doutor Luciano Freitas Felício por sua amizade e torcida.
- ✓ Aos doutores José Antônio Visintin e Rodrigo Martins Soares por sua contribuição na leitura e análise da tese por ocasião do exame de qualificação.
- ✓ Ao Professor Doutor Cláudio Alvarenga e aos funcionários da secretaria de pós graduação por toda assistência prestada durante este período.
- ✓ Aos colegas e amigos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal da UNESP em Araçatuba: Alexéia, Ariádne, Beto, Elda, Fábio, Giuliana, Henrique, Karina, Lígia, Patrícia, Rodrigo, Tatiana e Valéria.
- ✓ Ao técnico Pedro Luís Florindo, o “house-keeper”, por sua assistência em todo o projeto, e principalmente pelo café.

- ✓ A Aida, Ângela, Bárbara, Camilas, Carolina, Dulcinéia, Flávias, Gustavo, Helena, Heloiza, Hélvia, Lúcia (Ucha), Lucianas, Manoela, Sheley, Tiago e aos demais colegas e amigos do Laboratório de Biologia Molecular e Terapia Gênica do Hemocentro da UNICAMP.
- ✓ A Lilka Kawasaki, da Invitrogen, por sua assistência quanto ao kit I-SAGE e pelos contatos fornecidos no início do projeto.
- ✓ Ao Tercílio Calsa Junior pelas longas e esclarecedoras conversas sobre SAGE.
- ✓ Aos meus irmãos Carlos e Sérgio, suas esposas e filhos pela hospedagem nas etapas em Campinas; pela torcida, principalmente da cunhada Regina; ao apoio e compreensão. Ao Eduardo e Léo, por seu apoio principalmente na mudança para Araçatuba. Ao Sérgio por todo o apoio informático. Ao meu tio Visvaldo por ajudar a tornar meu apartamento em um lugar habitável.
- ✓ Ao meu médico Hildeberto Tavares Junior e à ziprasidona por me proporcionarem qualidade de vida.
- ✓ Aos amigos de São Paulo, do resto do Brasil e do mundo: Adriana, Alberto, Basso, Beatriz, Benito, Cláudia, Édson, Elisabeth, Fabianas, Fábio, Francine, Fred, Gabriela, Joseli, Marcela, Maria Rita, Ricardo e Sandra.
- ✓ Aos amigos que se foram, pelos bons momentos deixados na memória.
- ✓ Aos novos amigos Luciana, Flávias, Alex e Fernando pelos bons momentos que já começaram.
- ✓ A Fazenda Santa Cecília – OMF, Araçatuba, pelo fornecimento dos animais.
- ✓ A Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

“Deus não joga dados com o Universo”

Albert Einstein (1879-1955)

*“Deus de fato joga dados. E o problema é que
muitas vezes Ele os lança em lugares que não
 enxergamos”*

Stephen Hawking (1942,-)

RESUMO

SIDER, L. H. **Análise da expressão diferencial de genes do folículo ovariano de fêmeas pré-púberes e púberes *Bos primigenius indicus* (Nelore) por meio da Análise Serial de Expressão Gênica (SAGE)** [Analysis of differential gene expression of ovarian follicle from prepubertal and pubertal *Bos primigenius indicus* (Nelore) females by Serial Analysis of Gene Expression (SAGE)] 2005. 171 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

A puberdade é o momento quando um mamífero, macho ou fêmea, se torna capaz de produzir gametas viáveis e exibir comportamento sexual completo. Trata-se do resultado do ajuste gradativo entre o aumento da atividade gonadotrófica e a habilidade das gônadas em assumir simultaneamente a esteroidogênese e a gametogênese. Um dos principais fatores que influenciam o início à puberdade é o genético. A puberdade é uma característica fisiológica originada por muitos fatores (orgânicos e ambientais), que relacionam-se com a expressão de diversos genes, muitos dos quais ainda com funções desconhecidas. Metodologias para a análise da expressão gênica diferencial em tecidos, em particular a Análise Serial de Expressão Gênica (SAGE), incluem ferramentas que permitem a análise global e simultânea de vários transcritos de um determinado tecido, sejam eles conhecidos ou não, fornecendo informações sobre o padrão de expressão gênica de um determinado tipo celular de maneira qualitativa e semi-quantitativa. O objetivo do presente projeto foi analisar, por meio da técnica de SAGE, a expressão gênica diferencial no folículo ovariano de fêmeas bovinas da raça Nelore púberes e pré-púberes, segundo o critério da apresentação ou não de ondas de crescimento folicular que culminavam com a ovulação.. Um total de 14.531 e 14.285 tags tiveram sua sequência de DNA determinada, revelando a existência de 6.840 e 6.386 genes únicos (biblioteca das novilhas pré-púberes e púberes respectivamente). A comparação entre as duas bibliotecas revelou um total de 127 tags diferencialmente expressos ($P < 0,05$). Os folículos ovarianos de novilhas púberes apresentaram expressão mais elevada de algumas enzimas esteroidogênicas (CYP11A1 e

CYP19) e do transportador de colesterol para a mitocôndria (StAR) indicando intensa atividade esteroidogênia (produção de estrógeno) quando comparada ao folículo das bezerras pré-púberes. Além disso, o CTGF (fator de crescimento do tecido conectivo) e o TIMP2 (inibidor tecidual de metaloproteinases) foram mais abundantes nos folículos dos animais púberes, indicando que os mesmos já iniciaram o processo de luteinização, sem entretanto iniciar o processo de ruptura da matriz extracelular que ocorre na ovulação. A maior expressão de genes relacionados ao metabolismo da matriz extracelular e do citoesqueleto (como por exemplo a osteonectina, a actina e proteínas relacionadas à actina) sugere que os folículos dos animais púberes estão se preparando para a remodelação tecidual. A maior expressão de conexina 43 (gap junction protein) nos folículos dos animais púberes sugere uma intensa comunicação das células da granulosa entre si e com o oócito quando comparadas aos folículos das bezerras pré-púberes. Dentre os genes diferencialmente expressos e mais abundantes no folículo das bezerras pré-púberes, destacou-se o gene da proopiomelanocortina (POMC), que codifica vários fatores hipofisários. Os conhecimentos gerados por este trabalho poderão ser úteis para a identificação de marcadores genéticos para aplicação em programas de seleção assistida por marcadores.

Palavras-chave: Bovinos, Puberdade, SAGE, Expressão Gênica, Folículo Ovariano.

ABSTRACT

SIDER, L. H. **Analysis of differential gene expression of ovarian follicle from prepubertal and pubertal *Bos primigenius indicus* (Nelore) females by Serial Analysis of Gene Expression (SAGE)** [Análise da expressão diferencial de genes do folículo ovariano de fêmeas pré-púberes e púberes *Bos primigenius indicus* (Nelore) por meio da Análise Serial de Expressão Gênica (SAGE)] 2005. 171 f. Tese (doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

Puberty is the stage where any mammal, male or female, becomes able to produce viable gametes and manifest complete sexual behavior. These are results from the gradative adjustment between the increase in gonadotrophic activity and the ability of gonads in undergoing simultaneously both steroidogenesis and gametogenesis. One of the major factors interfering with puberty initiation is the genetics. Puberty is a physiological process controlled by several factors (organic and environmental) related with the expression of several genes, most of them with unknown function. Differential gene expression approaches, in particular the Serial Analysis of Gene Expression (SAGE), include tools that allow the global and simultaneous analysis of several transcripts from a given tissue, being known or unknown, providing qualitative and semi-quantitative information about the genetic profiles of any cellular type of interest. Using the SAGE approach, the aim of the present study was to analyse the differential gene expression profiles of ovarian follicles from pubertal and pre-pubertal Nelore breed females, observed for the presence or not of follicular growth waves ending in an ovulation. A total of 14,531 and 14,285 tags had their DNA sequences determined, revealing the existence of 6,840 and 6,386 unique tags (pre-pubertal and pubertal follicle libraries respectively). Comparison between the two SAGE libraries revealed 127 differentially expressed genes ($P < 0,05$). Follicles from pubertal heifers showed increased expression of some steroidogenic enzymes (CYP11A1 and CYP19) and StAR, the mitochondrial cholesterol transporter, which together indicates a marked steroidogenic

activity (oestrogen production), when compared with follicles from pre-pubertal heifers. Furthermore, connective tissue growth factor (CTGF) and TIMP2 (tissue inhibitor of metalloproteinases 2) were shown to be increased in pubertal follicles, indicating the starting of luteinization process, without however initiating the rupture of extracellular matrix, which takes place in ovulation. Higher levels of expression presented by extracellular matrix and cytoskeletal related genes (as examples osteonectin, actin and actin-related proteins) also indicate that the follicle from pubertal heifers is at the verge of tissue remodeling. The higher expression of connexin 43 (gap junction protein) indicated that this follicle shows a more intense communication among granulosa cells and between these and the oocyte, as compared to the pre-pubertal calves follicle. Among the differentially expressed genes more abundant in the pre-pubertal follicle is the proopiomelanocortin gene (POMC), which codifies to some hypothalamic factors. The knowledge generated by this study may contribute to the identification of genetic markers to be used in marker assisted selection programmes.

Key words: Cattle, Puberty, SAGE, Gene Expression, Follicle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema das interações fisiológicas do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal em fêmeas pré-púberes (A) e no início da puberdade (B).	23
Figura 2	Vias da biossíntese de esteroides no ovário	28
Figura 3	Esquema representando as etapas envolvidas na construção de biblioteca do tipo SAGE (Análise Serial de Expressão Gênica). 1 a 12: referências ao texto do corpo da tese.	42
Figura 4	Organograma representando o delineamento experimental	56
Figura 5	Bezerras da sub-espécie <i>Bos primigenius indicus</i> (Nelore) pré-púberes.	58
Figura 6	Novilhas da sub-espécie <i>Bos primigenius indicus</i> (Nelore) púberes.	58
Figura 7	Exame ultrassonográfico em bezerra utilizando o transdutor adaptado.	62
Figura 8	Abertura da cavidade pélvica para a exposição e retirada dos ovários. A seta indica o ovário direito dentro da cavidade pélvica.	62
Figura 9	Dissecando o folículo dominante em placa gelada.	63
Figura 10	Acompanhamento das ondas foliculares (folículos dominantes) por ultra-sonografia transretal de um animal Nelore pré-púbere (A) e púbere (B).	91
Figura 11	Amostras de RNA total extraídas a partir do folículo dominante de bezerras pré-púberes (A) e novilhas púberes (B).	93
Figura 12	Verificação da síntese de cDNA. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. 1: padrão de peso molecular em escada de 100 pb. 2: cDNA amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores para o gene GAPDH (banda de 540 pb). 3: cDNA amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores para o gene Elongation Factor (EF) (banda de 275 pb).	96

- Figura 13 Verificação da digestão pela *Nla* III. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. 1: padrão de peso molecular em escada de 100 pb. 2: cDNA amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores de GAPDH. 3: cDNA amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores de EF. 96
- Figura 14 Verificação da eficiência de ligação dos adaptadores aos cDNAs. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. 1: cDNA ligado ao adaptador A e amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores EF antisense e DTP1. 2: cDNA ligado ao adaptador B e amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores EF antisense e DTP1. 3: cDNA ligado ao adaptador A e amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores EF antisense e DTP2. 4: cDNA ligado ao adaptador B e amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores EF antisense e DTP2. 5: marcador ϕ X174 RF DNA/*Hae* III. 99
- Figura 15 Verificação da eficiência da clivagem com *Bsm* FI. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. 1: cDNA ligado ao adaptador A e amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores EF antisense e DTP1. 2: cDNA ligado ao adaptador B e amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores EF antisense e DTP2. 3: partículas magnéticas amplificadas com os oligonucleotídeos iniciadores EF antisense e DTP1. 4: partículas magnéticas amplificadas com os oligonucleotídeos iniciadores EF antisense e DTP2. 5: marcador ϕ X174 RF DNA/*Hae* III. 99
- Figura 16 Otimização da amplificação dos ditags por PCR. Gel de poliacrilamida 12% corado com nitrato de prata. 1: No template. 2: No ligase. 3: padrão de peso molecular em escada de 100 pb. 4: amostra (ditags) diluição 1/20. 5: amostra (ditags) diluição 1/40. 6: amostra (ditags) diluição 1/80. 7: I-SAGE control template. Todas as amostras foram amplificadas empregando os oligonucleotídeos iniciadores DTP1 e DTP2. 100
- Figura 17 Gel de poliacrilamida 12% corado com brometo de etídio. 1: padrão de peso molecular em escada de 100 pb.. 2-11: amostras (ditags de 100 pb) amplificados com os oligonucleotídeos iniciadores DTP1 e DTP2. 101
- Figura 18 Gel de poliacrilamida 8% corado com brometo de etídio. 1 e 5: padrão de peso molecular em escada de 25 pb. 2-4: amostras (ditags de 26 pb). 102

Figura 19	Visualização do tamanho e qualidade dos concatâmeros. Gel de poliacrilamida 12% corado com brometo de etídio. 1 e 3: padrão de peso molecular em escada de 100 pb. 2: Amostra (concatâmeros).	104
Figura 20	Verificação da eficiência de linearização do plasmídeo pZeRO®. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. 1: peso de 1 Kb 2: plasmídeo pZeRO® não linearizado. 3: plasmídeo pZeRO® linearizado com a enzima <i>Sph</i> I.	105
Figura 21	Distribuição dos tags de acordo com a homologia. A: Biblioteca dos folículos ovarianos das bezerras pré-púberes (FOL); B: Biblioteca dos folículos ovarianos das novilhas púberes (LOF).	108
Figura 22	Representação esquemática do comportamento dos quinze tags mais expressos em ambas as bibliotecas de acordo com a posição que ocupam. Os tags estão representados por suas siglas. Cores iguais indicam o mesmo tag.	117
Figura 23	Níveis de expressão (em número de tags) dos genes envolvidos com a atividade esteroidogênica. * $P < 0,001$	118
Figura 24	Níveis de expressão (em número de tags) dos genes envolvidos com a degradação da matriz extracelular. * $P < 0,001$	118
Figura 25	Níveis de expressão (em número de tags) dos genes de fatores de crescimento. * $P < 0,001$	119
Figura 26	Níveis de expressão (em número de tags) dos genes das proteínas ligadoras ao IGF.	119
Figura 27	Ontologias (Processo Biológico) dos genes da biblioteca das bezerras pré-púberes (FOL; A) e da biblioteca das novilhas púberes (LOF; B). Os dados foram mantidos na Língua Inglesa para assegurar a fidelidade da informação.	121
Figura 28	Ontologias (Componente Celular) dos genes da biblioteca das bezerras pré-púberes (FOL; A) e da biblioteca das novilhas púberes (LOF; B). Os dados foram mantidos na Língua Inglesa para assegurar a fidelidade da informação.	122
Figura 29	Ontologias (Função Molecular) dos genes da biblioteca das bezerras pré-púberes (FOL; A) e da biblioteca das novilhas púberes (LOF; B). Os dados foram mantidos na Língua Inglesa para assegurar a fidelidade da informação.	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Quantificação e Índice DO_{260}/DO_{280} dos RNAs extraídos de folículos ovarianos das bezerras pré-púberes e novilhas púberes	93
Tabela 2	Genes mais abundantes na Biblioteca das bezerras pré-púberes (FOL) dentre os diferencialmente expressos	110
Tabela 3	Genes mais abundantes na Biblioteca das novilhas púberes (LOF) dentre os diferencialmente expressos	112
Tabela 4	Genes com expressão superior ou igual a 0,5% do total dos tags nas bibliotecas das bezerras pré-púberes (FOL) e das novilhas púberes (LOF)	116
Tabela 5	Ontologias dos genes diferencialmente expressos (por ordem alfabética)	124

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Verificação da síntese de cDNA	69
Quadro 2	Verificação da ligação dos adaptadores	72
Quadro 3	Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores de M13	86
Quadro 4	Cálculo para determinação do número de tags da biblioteca	86

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	20
1.1	Fisiologia da puberdade em ruminantes.....	22
1.2	O folículo ovariano e a dinâmica folicular.....	24
1.3	Atividade esteroideogênica no folículo ovariano.....	26
1.4	Fatores de crescimento com ação sobre o ovário.....	30
1.5	O papel da matriz extracelular na dinâmica folicular.....	34
1.6	A Biologia Molecular a serviço da Fisiologia.....	36
1.7	Expressão Gênica Diferencial e Análise Serial de Expressão Gênica (SAGE).....	39
1.8	SAGE em tecidos reprodutivos.....	48
1.9	SAGE na agropecuária.....	50
2	OBJETIVOS.....	52
2.1	Objetivos gerais.....	53
2.2	Objetivos específicos.....	53
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
3.1	Delineamento experimental.....	55
3.2	Animais.....	57
3.3	Ultra-sonografia transretal.....	59
3.4	Coleta dos tecidos.....	61
3.5	Extração e Análise do RNA.....	63
3.6	Análise serial de expressão gênica (SAGE).....	66
3.6.1	Preparo do RNA.....	66
3.6.2	Preparo das partículas ligadas aos oligo(dT)s.....	66
3.6.3	Ligação do RNAm.....	67
3.6.4	Síntese do cDNA.....	67
3.6.5	Digestão pela <i>Nla</i> III.....	69
3.6.6	Ligação dos adaptadores ao cDNA.....	71
3.6.7	Digestão pela <i>Bsm</i> FI.....	72
3.6.8	Purificação dos fragmentos de DNA.....	73
3.6.9	Reação de polimerização pela enzima Klenow DNA polimerase.....	73
3.6.10	Purificação dos fragmentos de DNA.....	74
3.6.11	Formação de ditags.....	75
3.6.12	Otimização das condições do ditag PCR.....	76
3.6.13	PCR em larga escala.....	77
3.6.14	Eletroforese.....	77
3.6.15	Eluição do DNA do gel.....	78
3.6.16	Clivagem com <i>Nla</i> III para a retirada dos adaptadores.....	79
3.6.17	Purificação dos fragmentos de DNA.....	79
3.6.18	Eletroforese.....	80
3.6.19	Eluição das bandas.....	80
3.6.20	Ligação dos ditags para a formação de concatâmeros.....	81
3.6.21	Eletroforese em gel preparativo.....	81
3.6.22	Eluição do DNA.....	82
3.6.23	Clonagem dos concatâmeros em vetor plasmidial.....	82
3.6.24	Transformação das bactérias.....	84
3.6.25	Análise dos clones recombinantes por PCR em colônia.....	85

3.7	Seqüenciamento do DNA.....	86
3.7.1	Preparação de fragmentos de DNA para o seqüenciamento.....	86
3.7.2	Reação de seqüenciamento.....	87
3.7.3	Precipitação dos fragmentos com etanol e Leitura.....	87
3.8	Bioinformática.....	88
3.8.1	Análise dos tags.....	88
3.8.2	Comparação das bibliotecas.....	88
3.8.3	Pesquisa da Ontologia.....	88
4	RESULTADOS.....	89
4.1	Observação da dinâmica folicular por ultra-sonografia transretal.....	90
4.2	Purificação e análise do RNA.....	92
4.3	Construção das bibliotecas SAGE.....	94
4.4	Seqüenciamento e análise dos tags.....	107
5	DISCUSSÃO.....	134
6	CONCLUSÕES.....	148
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	151
8	ANEXO: Reagentes utilizados e suas formulações.....	165

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Por definição, um macho ou uma fêmea das espécies mamíferas alcança a puberdade quando se mostra capaz de produzir e liberar gametas viáveis e exibir comportamento sexual completo. A puberdade é o resultado de um ajuste gradativo entre o aumento da atividade gonadotrófica e a habilidade das gônadas em assumir simultaneamente a esteroidogênese e a gametogênese (HAFEZ & HAFEZ, 2004a).

Em bovinos, a idade ao início da puberdade varia entre as diferentes subespécies e raças. Os animais *Bos primigenius taurus*, em condições de saúde e nutrição adequadas, apresentam início da ciclicidade reprodutiva por volta dos 12 meses de idade, enquanto que os animais *Bos primigenius indicus* mostram-se mais tardios, apresentando ciclicidade em média aos 20 meses de idade.

Além dos aspectos genéticos, o início da puberdade depende também do manejo, do meio ambiente e da nutrição aos quais o animal está submetido. Além disso, o tamanho corporal que pode ser avaliado pelo peso vivo e por outros parâmetros como a altura da cernelha, o comprimento da área pélvica e as taxas de crescimento ósseo, são aspectos importantes (HAFEZ & HAFEZ, 2004a).

1.1 Fisiologia da puberdade em ruminantes

Como possível explicação para os fenômenos que regulam a puberdade em fêmeas *Bos primigenius indicus*, pode-se estabelecer correlações com os mecanismos previamente descritos em ovinos (FOSTER, 1994). O hipotálamo secreta o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) em padrão rítmico de baixa frequência. Em consequência, a hipófise libera na corrente sangüínea o hormônio luteinizante (LH) com relação temporal praticamente idêntica àquela apresentada pelo GnRH. Assim, os níveis séricos de LH se mantêm baixos, não sendo suficientes para deflagrar o início da puberdade. Esse padrão de secreção hipotalâmico é mantido principalmente pela ação inibitória exercida pelo estradiol de origem ovariana (Figura 1A).

A primeira alteração hormonal observada no início da puberdade consiste do aumento da frequência de secreção do LH pela hipófise, que é por sua vez conseqüente ao aumento na frequência de secreção do GnRH pelo hipotálamo. Esta maior atividade hipotalâmica se deve a uma temporária falta de sensibilidade ao controle inibitório exercido pelo estradiol (FOSTER, 1994). A diminuição na retroalimentação negativa do estradiol sobre a secreção de GnRH é resultado do decréscimo do número de receptores para estradiol no citoplasma das células do hipotálamo anterior, médio basal e hipófise anterior à medida que a puberdade se aproxima (NAKADA *et al.*, 2001 *apud* NOGUEIRA, 2003). O aumento dos níveis basais de LH estimula a esteroidogênese pelo ovário, levando ao aumento dos níveis séricos de esteróides ovarianos, suficientes para promover o início da fase folicular que culmina com a ovulação (FOSTER, 1994; Figura 1B).

Neuropeptídeos opióides também possuem efeitos inibitórios na secreção de gonadotrofinas. Segundo WOLFE *et al.* (1992), a inibição do estradiol é mediada via neuropeptídeos opióides e a mesma declina durante o período peripuberal.

Figura 1: Esquema das interações fisiológicas do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal em fêmeas pré-púberes (A) e no início da puberdade (B).

1.2 O folículo ovariano e a dinâmica folicular

Os folículos ovarianos estão localizados no córtex ovariano e se encontram em vários estágios de desenvolvimento e regressão. De maneira geral estão presentes vários folículos primários (com oócitos em estágio quiescente) e poucos folículos grandes.

O folículo primário consiste no oócito envolvido por uma única camada de células foliculares planas ou cubóides. No folículo em crescimento, o oócito apresenta diâmetro aumentado, possui maior número de camadas de células foliculares e a zona pelúcida já está presente ao redor do oócito. As células planas ou unilaminares da granulosa do folículo primordial se proliferam formando o folículo secundário. O folículo terciário ou vesicular sofre a influência de gonadotrofinas hipofisárias de modo que as células da granulosa com camadas múltiplas passam a secretar um fluido que se acumula nos espaços intercelulares. A secreção contínua e o acúmulo de líquido folicular resultam na dissociação de células da granulosa que assim formam o antro. A zona pelúcida é circundada por uma massa sólida de células foliculares radiais, formando a coroa radiata. O folículo de Graaf é caracterizado pelo aumento de tamanho das células foliculares e por apresentar-se repleto de líquido. O oócito então posiciona-se na periferia do antro, sendo circundado por células foliculares (*cumulus oophorus*). Forma-se então um epitélio de espessura uniforme, denominado de membrana granulosa. Por fim, o folículo pré-ovulatório é constituído de uma vesícula que projeta-se na superfície ovariana devido ao rápido acúmulo de fluido e ao adelgaçamento da camada granulosa. O fluido folicular é formado por secreções da granulosa e proteínas plasmáticas

transportadas para dentro do folículo por transudação (HAFEZ & HAFEZ, 2004b).

O desenvolvimento folicular ocorre em ondas de crescimento desde as fases fetais até a puberdade nas fêmeas bovinas (ADAMS *et al.*, 1994). As ondas de crescimento folicular, presentes no período pré-puberal, continuam ocorrendo durante os ciclos estrais e mesmo durante a gestação. Durante o período pré-puberal, apesar das bezerras não ovularem, as mesmas apresentam variação na população de folículos, com ondas de crescimento folicular semelhante às de vacas adultas (MIHM *et al.*, 2002a; EVANS *et al.*, 1995).

Uma onda de crescimento folicular envolve o desenvolvimento sincrônico de um grupo de folículos – um folículo dominante e vários subordinados. O folículo dominante inibe o crescimento dos seus subordinados e suprime a emergência da próxima onda folicular (KO *et al.*, 1991; KASTELIC *et al.*, 1990). Este efeito de dominância é caracterizado por um efeito parácrino e endócrino sobre os demais folículos recrutados, que por sua vez entram em processo de atresia via apoptose. A secreção de estradiol e inibina, pelo folículo dominante causa redução na concentração plasmática de FSH, até níveis insuficientes para o crescimento e manutenção dos folículos subordinados (MIHM *et al.*, 2002b).

Em vacas púberes, a maioria dos ciclos estrais são compostos de duas ou três ondas foliculares. O desenvolvimento dos folículos dominantes e subordinados de uma onda compreende as fases de crescimento, estática e de regressão (SILCOX *et al.*, 1993; GINTHER *et al.*, 1989). Na primeira onda de crescimento folicular, a fase de crescimento vai desde a emergência da onda até aproximadamente o oitavo dia após o estro; a fase estática ocorre entre o oitavo e décimo dia e a fase de regressão ocorre após o décimo dia. Ao redor do

décimo dia do ciclo estral começa a segunda onda de crescimento folicular e o processo se reinicia.

O folículo dominante que se desenvolve na segunda onda pode regredir ou se tornar o folículo ovulatório, no caso do ciclo de apenas duas ondas. Provavelmente, a ocorrência de duas, três ou quatro ondas de crescimento folicular é devida à taxa de crescimento do folículo e à duração da fase luteínica em ciclos estrais normais. Se a regressão do corpo lúteo ocorrer enquanto o folículo dominante da segunda onda ainda for funcional (fase de crescimento ou estática) ele será ovulatório (ciclo estral com duas ondas), porém se o corpo lúteo permanecer ativo suprimindo a frequência dos pulsos de LH, então o segundo folículo dominante sofrerá atresia e uma terceira onda emerge, conferindo o crescimento do terceiro folículo dominante (MIHM *et al.*, 2002b).

1.3 Atividade esteroidogênica no folículo ovariano

Hormônios esteroidais são derivados do colesterol via uma série clássica de reações enzimáticas (MILLER, 1988; Figura 2). O passo limitante da biossíntese de esteróides é considerado o transporte do substrato colesterol até a face matricial da membrana mitocondrial interna, onde ele será alvo da enzima citocromo P450 side chain cleavage (P450_{scc} ou CYP11A1; revisto por THOMSON, 1998). Esse mecanismo de transporte é dependente da síntese *de novo* da proteína responsável. Um importante candidato para esse papel é a relativamente recentemente descoberta proteína reguladora esteroidogênica aguda (StAR, CLARK *et al.*, 1994) que é expressa rapidamente e em grandes quantidades após o estímulo esteroidogênico, tornando-se associada à mitocôndria (IVELL *et al.*, 2000; STOCCO & CLARK, 1996).

O colesterol derivado da circulação sanguínea ou sintetizado diretamente a partir do acetato é inicialmente convertido à pregnenolona pela enzima citocromo P450_{scc} (CYP11A1). Duas enzimas agem sobre a pregnenolona catalizando sua conversão a progesterona, pela enzima 3 β hidroxisteróide desidrogenase (3 β HSD), ou a andrógeno (também denominado dihidroepiandosterona - DHEA), pela enzima citocromo P450 17 β hidroxilase/C17-20liase (CYP17), via o intermediário 17 α OH pregnenolona. O DHEA pode ser convertido pela 3 β HSD formando androstenediona (AE), ou o AE pode ser derivado da progesterona pela ação da CYP17, via o intermediário 17 α OH progesterona. A androstenediona pode ser convertida no andrógeno mais ativo, a testosterona, pela enzima 17 β hidroxisteróide desidrogenase (17 β HSD). Finalmente a testosterona pode ser convertida a estradiol pela ação da enzima citocromo P450 aromatase (P450_{arom} ou CYP19). O produto esteroideal final secretado pelo tecido depende do perfil (quantitativo e qualitativo) das enzimas esteroidogênicas expressas pelo mesmo. O ovário expressa em níveis mais elevados a CYP11A1, 3 β HSD, CYP17 e CYP19, portanto sua secreção primária é o estrógeno (FREKING, 2000; Figura 2)

Em mamíferos, os estrógenos são conhecidos por regular vários processos vitais como a reprodução, o crescimento celular e a diferenciação, o desenvolvimento da glândula mamária e a lactogênese, a homeostase e a oncogênese (ENG *et al*, 1997).

Figura 2: Vias da biossíntese de esteroides no ovário

A principal característica dos folículos ovarianos em crescimento não atresícos e pré-ovulatórios é a expressão da citocromo P450 aromatase (P450_{arom}, CYP19) (BAO *et al.*, 1997; XU *et al.*, 1995) e sua habilidade de produzir estradiol (GUILBAULT *et al.*, 1993; BADINGA *et al.*, 1992). Diversos estudos descrevem as funções do estradiol ovariano em mamíferos. Em folículos em crescimento nos roedores, o estradiol é requerido para a indução da expressão de receptores de LH nas células da granulosa (SEGALOFF *et al.*, 1990), considerada um pré-requisito essencial para a ovulação. Alta atividade estrogênica associada com a alta atividade de aromatase é um bom indicador da dominância fisiológica em novilhas (CROWE *et al.*, 2001), do mesmo modo que a inibição da atividade aromatase pode induzir a atresia folicular (BERGFELT *et al.*, 1999).

O estimulador primário da expressão do gene P450_{arom} e da sua atividade enzimática (resultando no crescimento folicular) é o hormônio folículo estimulante (FSH), como demonstrado para ratos, humanos e ruminantes (GUTIERREZ *et al.*, 1997; CAMPBELL *et al.*, 1996; FITZPATRICK & RICHARDS, 1991; STEINKAMPF *et al.*, 1987). De acordo com a hipótese de divergência folicular, o futuro folículo dominante se torna mais sensível ao FSH, podendo assim manter a expressão de P450_{arom} mesmo em ambiente com baixas concentrações de FSH (revisão em FORTUNE *et al.*, 2001).

A perda de atividade da P450_{arom} é geralmente considerada um dos primeiros eventos da atresia folicular. Em diferentes modelos de atresia induzida experimentalmente, as concentrações plasmáticas de estradiol (OTSUKA *et al.*, 1997) e os níveis de P450_{arom} nas células da granulosa rapidamente diminuíram (HUET *et al.*, 1998; HUBARD & GREENWALD, 1985)

A aromatase pode também ser modulada pela insulina e pelo insulin-like growth factor I (IGF-I) (SILVA & PRICE, 2002), inibina (YING *et al.*, 1986), ativina (HILLIER & MIRO, 1993), Müllerian inhibiting substance (DI CLEMENTE *et al.*, 1994) e heat shock protein (hsp) 90 (DRIANCOURT *et al.*, 1999).

Folículos de bezerras >9 mm de diâmetro possuem baixa habilidade em produzir estradiol (10 vezes menores quando comparadas com vacas adultas, apesar do aporte de testosterona pelas células da teca ser similar ao observado em vacas). Essa observação está em acordo com a baixa atividade da aromatase em células da granulosa em bezerras (DRIANCOURT *et al.*, 2001)

1.4 Fatores de crescimento com ação sobre o ovário

O crescimento e desenvolvimento folicular são dependentes de interações parácrinas e endócrinas finamente controladas entre o oócito, as células da granulosa e da teca, orquestradas por fatores séricos, incluindo gonadotrofinas e a matriz extracelular circundante (RODGERS *et al.*, 1999). Participam deste ajuste fino da função ovariana uma série de fatores de crescimento.

O IGF-I (insulin-like growth factor I) é um dos fatores que estimulam a expressão da citocromo P450_{arom.}. A diminuição da biodisponibilidade do IGF pode inibir especificamente a expressão da aromatase, sendo essa uma das causas da regressão do futuro folículo subordinado. Células da granulosa não luteinizadas expressam RNAm para IGFBP-2 (IGF binding protein) e são imunologicamente positivas para as proteínas IGFBP-2 e -4 de origem tecal (ARMSTRONG *et al.*, 1998). Essas proteínas ligadoras se associam à matriz extracelular e seqüestram IGF-I para si produzindo estoque de IGF extracelular. O aumento da atividade de IGFBP protease no futuro folículo dominante, diminui

as concentrações de IGFBP. Entretanto, as concentrações de IGFBP continuam altas no folículo subordinado (FORTUNE *et al.*, 2001). A diminuição da atividade da IGFBP promove o aumento nas concentrações de IGF livre, que por sua vez mantem a esteroidogênese e crescimento folicular apesar das concentrações diminuídas de FSH, e assim o folículo se torna dominante (AUSTIN *et al.*, 2001).

O fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) é importante por regular uma série de funções ovarianas, incluindo mitose das células da granulosa (ROBERTS & ELLIS, 1999; LAVRANOS *et al.*, 1994), esteroidogênese (VERNON & SPICER, 1994), diferenciação (ANDERSON & LEE, 1993) e apoptose (TILLY *et al.*, 1992).

Células da granulosa bovina produzem bFGF nos estágios pré-antral e antral de desenvolvimento. O tratamento com bFGF resulta na diminuição do número de folículos primordiais e um concomitante aumento nos folículos em desenvolvimento. Isso mostra que o bFGF induz o desenvolvimento de folículos primordiais. O início do desenvolvimento do folículo primordial determina o número de folículos disponíveis para a seleção do folículo dominante e ovulação (NILSSON *et al.*, 2001).

O fator de crescimento epidermal (EGF) e seu homólogo, o fator de crescimento transformante α (TGF α), foram identificados como potentes fatores intraovarianos (SKINNER & COFFEY, 1989). O EGF aumenta a atividade mitogênica do IGF-I em culturas de células da granulosa (MAY *et al.*, 1988) e da teca porcinas (MAY *et al.*, 1992), diminui a produção de progesterona induzida pelo FSH pelas células da granulosa (KNECHT & CATT, 1983) e da teca (ERICKSON & CASE, 1983) de ratas. O bFGF e EGF estimulam um determinado número de células da teca independentemente da presença ou não

de insulina e IGF-I e inibem a produção de androstenediona nas células da teca na presença de LH e insulina ou IGF-I, mas não tem nenhum efeito na presença ou ausência de insulina e IGF-I sem o LH. O bFGF e o EGF inibem a produção tecal de progesterona na presença ou ausência de insulina e IGF-I e reduzem o número de sítios ligantes para ^{125}I -IGF-I nas células da teca (SPICER & STEWART, 1996)

O fator de crescimento do tecido conectivo (CTGF) está implicado em diversos tipos de células epiteliais como regulador parácrino da mitose, angiogênese, taxa celular e no remodelamento da matriz extracelular (HARLOW *et al.*, 2002a). Ele é mediador da regulação induzida por $\text{TGF}\beta$ da síntese de tecido conectivo em diversos tipos celulares incluindo fibroblastos (DUNCAN *et al.*, 1999), condrócitos (EGUCHI *et al.*, 2001), osteoblastos (PEREIRA *et al.*, 2000), células da musculatura lisa vascular (FAN *et al.*, 2000) e células mesangiais renais (GOPPELL-STRUEBE *et al.*, 2001).

A expressão do gene CTGF é estreitamente controlada por interações entre o FSH e membros da superfamília $\text{TGF}\beta$. O FSH inibe a expressão de CTGF e o $\text{TGF}\beta$ estimula a expressão de CTGF de maneira dose-dependente.

A natureza dinâmica da arquitetura ovariana dos mamíferos requer o remodelamento cíclico da matriz extracelular. Vários relatos estão disponíveis na literatura sobre a ocorrência e regulação dos fatores responsáveis pela ruptura da matriz extracelular ovariana. Metaloproteinases e seus inibidores são componentes decisivos na quebra do colágeno da membrana basal folicular, teca interna e externa, túnica albugínea e da membrana basal da superfície epitelial (MCINTOSH & SMITH, 1998). No entanto, pouco se sabe sobre os fatores que regulam a deposição de componentes da matriz extracelular, tais

como o colágeno e a elastina, nestes compartimentos ovarianos. O CTGF tem sido implicado como fator regulador da deposição de colágeno no ovário (HARLOW *et al.*, 2002a).

No ovário de porcas, o CTGF é proposto como promotor do crescimento celular e angiogênese durante o desenvolvimento folicular e luteal (WANDJI *et al.*, 2000). Entretanto foi observada correlação negativa entre a atividade aromatase e a expressão do RNAm para CTGF (HARLOW *et al.*, 2002a).

O CTGF é expresso em altos níveis nos estágios primários do desenvolvimento folicular e novamente depois da ovulação, com maior abundância associada com células endoteliais na vasculatura em desenvolvimento (SLEE *et al.*, 2001; WANDJI *et al.*, 2000). Utilizando a análise de Northern Blot, no ovário de ratas o RNAm do CTGF é expresso em grandes concentrações nas células da granulosa localizadas no centro do folículo no momento da vigência da ruptura do mesmo. Neste caso, o CTGF serviria como um fator luteotrófico (HARLOW & HILLIER, 2002)

1.5 O papel da matriz extracelular na dinâmica folicular

De maneira geral, as principais funções do ovário são produzir e liberar oócitos maduros e excretar hormônios sexuais. Ambos os processos ocorrem dentro de uma matriz de tecido conectivo, que provê suporte estrutural para o ovário. Além disso, a matriz extracelular exerce importante papel na diferenciação, desenvolvimento e migração celular por proporcionar um ambiente permissivo ou instrutivo (MEREDITH *et al.*, 1993). A matriz tem papel também na dinâmica de fluidos, provendo forças osmóticas ou filtrando materiais solúveis, além de influir nos processos de morte celular.

Fazem parte da matriz extracelular os colágenos, a laminina e seus receptores (integrinas), os proteoglicanos (heparan sulphate proteoglycan – HSPG), as metaloproteinases (MMP) e o inibidor tecidual de metaloproteinases (TIMP), que estão envolvidos nas cascatas de degradação proteolítica dos colágenos ovarianos, as proteínas ligadoras de fatores de crescimento, como o IGFBP, a osteonectina, envolvida na ativação do tecido conectivo, a fibromodulina, entre outros.

O principal componente da matriz é o colágeno tipo IV. A sua estrutura de tripla hélice é estabilizada pela ligação da entactina ou nidogen ao colágeno e à laminina. Como a teca interna e a externa são camadas de estroma, outros tipos de componentes de matriz estão presentes. Colágenos estruturais foram observados na teca externa de várias espécies, como o colágeno tipo I (LUCK *et al.*, 1995; ZHAO & LUCK, 1995). O colágeno tipo VI, envolvido na organização da fibronectina extracelularmente, foi identificado na teca interna (IWAHASHI *et al.*, 2000).

A ativação dos mecanismos colagenolíticos durante a maturação folicular deve ser um importante passo na resposta ovulatória uma vez que observa-se considerável adelgaçamento das camadas colagenosas, que culmina na ruptura das mesmas, no momento da ovulação (REICH *et al.*, 1985).

Sob condições fisiológicas, a MMP2 é secretada principalmente por células endoteliais na forma inativa, o zimógeno pró-MMP2, estando estabelecido que a sua ativação ocorre por mecanismo de formação de complexo zimógeno-MT1-MMP-TIMP2 na estequiometria 1:1:1. Uma vez ativado, o MMP2 pode se ligar e ser inibido pelo TIMP2. A enzima que não se

liga ao TIMP2 pode se ligar e degradar o colágeno (KARAGEANNIS & POPEL, 2004).

A laminina suprime a produção de progesterona pelas células da granulosa de humanos via interação com o receptor integrina $\alpha_6\beta_1$ (FUJIWARA *et al.*, 1997).

Células da granulosa dos folículos antrais são banhadas pelo fluido folicular contendo proteínas e moléculas solúveis da matriz extracelular incluindo os proteoglicanos. Proteoglicanos consistem de uma proteína filamentosa central com glicosaminoglicanos anexados a ela. Existem dois proteoglicanos, versican e perlecan, identificados no fluido folicular. O versican parece desempenhar diversos papéis no desenvolvimento folicular. Na porção N terminal do proteoglicano existe um domínio (G1) que pode se ligar ao ácido hialurônico e participar das interações célula-matriz e célula-célula. O domínio G3 da porção C terminal contém vários motivos (lectin-like, epidermal growth factor-like e de ligação ao complemento). A super expressão do perlecan pode ser uma das mais significantes alterações que ocorrem durante o desenvolvimento folicular inicial uma vez que ele pode se ligar a vários fatores de crescimento (RODGERS *et al.*, 2003).

Estudos na composição da lâmina basal folicular bovina mostram que algumas cadeias de laminina (alfa 1 e 2, beta 2 e gama 1), o heparan sulfato proteoglicano (HSPG) perlecan e nidogen estão presentes no folículo atrésico (MCARTHUR *et al.*, 2000). Na atresia dos folículos, a lâmina basal não é degradada uma vez que a microscopia eletrônica mostra que a lâmina basal é ainda visível e intacta, e retém laminina alfa 1 e beta 2, colágeno tipo IV alfa 1 e nidogen (IRVING-RODGERS *et al.*, 2002).

Como observado em ovelhas intactas (HUET *et al.*, 1997) e hipofisectomizadas (HUET *et al.*, 1998), a atresia foi associada com o aumento nos níveis de fibronectina, laminina, colágeno tipo IV e, em menor extensão, com os de HSPG nas células da granulosa.

1.6 A Biologia Molecular a serviço da Fisiologia

Com o avanço e popularização das técnicas de Biologia Molecular ocorrido principalmente a partir da década de 80, o estudo das características fisiológicas voltou-se cada vez mais para a elucidação dos mecanismos bioquímicos mediados pela expressão de genes específicos que possam estar relacionados direta ou indiretamente com a manifestação do fenótipo. A análise do genoma e de sua expressão, em alternativa aos estudos fisiológicos clássicos pode ser justificada pelo fato da variabilidade (polimorfismo) do DNA ser maior do que aquela apresentada por perfis protéicos, basicamente por três fatores: i) ambigüidade do código genético, ou seja, uma mudança na seqüência de bases não implica necessariamente na mudança da seqüência de aminoácidos; ii) presença de regiões não-codificadoras, que não influenciam a estrutura primária da proteína, mas podem, entretanto, atuar na regulação da expressão da mesma; iii) regiões intergênicas, pseudogenes ou regiões repetitivas, que constituem a maior parte do DNA nuclear, e que possuem variabilidade aparentemente não associada a modificações na expressão fenotípica (ZAGO *et al.*, 1994 *apud* GURGEL, 1998).

A análise do genoma e de sua expressão gênica utiliza alguns caminhos para a identificação de genes ou regiões do genoma responsáveis ou relacionadas com características produtivas. O primeiro deles, o mapeamento

genético (do inglês “gene mapping”) através do estudo de *loci* que afetam características quantitativas (do inglês “quantitative trait *loci* – QTL”), consiste na análise de regiões microssatélites de todos os indivíduos de grandes famílias de animais formadas por acasalamentos direcionados (HALEY, 1995). Esses estudos permitem o estabelecimento de correlações entre o perfil dos microssatélites e o desempenho produtivo dos animais testados. Dessa forma pode-se mapear os cromossomos tentando identificar a localização dos genes envolvidos com determinada característica de produção (maciez da carne, produção de leite, desenvolvimento corporal, resistência a doenças, entre outras). Uma determinada região de QTL pode gerar por si só um marcador genético sem necessariamente identificar o gene ou os genes responsáveis pelo fenótipo..

O segundo caminho, denominado busca do gene principal (do inglês “major gene approach”), baseia-se no estudo dos mecanismos fisiológicos envolvidos com a manifestação da (s) característica (s) de produção em questão, e na tentativa de pesquisar as variações de genes específicos (enzimas, hormônios ou proteínas constitutivas) entre indivíduos que apresentem fenótipos distintos (WOMACK, 1993). No caso desta estratégia, além do conhecimento prévio da função dos genes envolvidos na característica fenotípica que se deseja estudar, é fundamental que se disponha de meios para a caracterização dos alelos desses *loci* que estejam segregando na população ou linhagens estudadas. É uma abordagem limitada uma vez que trabalha com um ou poucos genes de cada vez, e sabe-se que a maioria das características fisiológicas são determinadas por vários genes..

Recentemente, as pesquisas têm voltado atenção para uma terceira abordagem, que é o estudo da expressão gênica diferencial, baseando-se no princípio de que os animais que apresentam características fenotípicas diferentes, possam diferir tanto qualitativamente quanto quantitativamente na produção de RNA mensageiro (RNAm) e conseqüentemente na expressão da proteína correspondente. As ferramentas utilizadas nesta abordagem são o "mRNA differential display" (MARTIN & PARDEE, 1999), os "macro" e "microarrays" (COLLINS, 1999) e a análise serial de expressão gênica (do inglês "Serial Analysis of Gene Expression – SAGE") (VELCULESCU *et al.*, 1997; VELCULESCU *et al.*, 1995). Estas técnicas de análise de expressão gênica permitem identificar os genes e eventualmente agrupá-los quanto ao seu envolvimento em diferentes situações fisiológicas e/ou patológicas.

São várias e ricas em informação as revisões que abordam estas e outras técnicas de expressão gênica (BASHIARDES & LOVETT, 2001; GEORGES, 2001; KUHN, 2001; GREENWAY & SMITH, 2000; STERKY & LUNDEBERG, 2000; GOING & GUSTERSON, 1999; VIETOR & HUBER, 1997).

1.7 Expressão Gênica Diferencial e Análise Serial de Expressão Gênica (SAGE)

A última década vivenciou grandes avanços na área da genômica. Desde que o Projeto Genoma Humano foi lançado em 1989 observou-se grande impacto no meio científico e na sociedade como um todo, sendo que outros projetos genoma se seguiram (microorganismos de importância econômica, camundongo, e mais recentemente de plantas e animais superiores). Toda a informação gerada por centenas de laboratórios espalhados pelo mundo e depositada em sítios de domínio público teria utilização limitada não fosse o desenvolvimento das técnicas de expressão gênica diferencial mencionadas no item anterior. Estas técnicas foram desenvolvidas para analisar a expressão de todos os transcritos de determinado tipo celular ou tecidual ao mesmo tempo e para tal utilizam o conhecimento das seqüências geradas pelos projetos genoma. De maneira geral, essas técnicas são particularmente úteis para as triagens iniciais, indicando os genes provavelmente envolvidos no processo estudado. Estas técnicas devem ser seguidas de reverse transcriptase – polymerase chain reaction (RT-PCR) semi-quantitativo e/ou Northern Blot, ou então PCR em tempo real (real time PCR) que em última análise serão utilizadas para confirmar a informação.

Dentre as diversas técnicas de análise de expressão gênica diferencial, o SAGE reveste-se de grande importância em áreas onde a informação genômica não tão é abundante, como no caso dos humanos e roedores de laboratório.

A técnica de SAGE baseia-se em três princípios: i) um pequeno pedaço de seqüência de cDNA (de 9 a 14 pares de bases), ou *tag*, contém informação suficiente para identificar unicamente um transcrito, ou RNAm, do qual o mesmo

é representativo; ii) as seqüências de *tags* podem ser ligadas umas às outras a fim de formarem moléculas de DNA em série que podem então ser clonadas e seqüenciadas; iii) a quantificação do número de vezes que um *tag* em particular é observado num determinado tecido permite acessar o nível de expressão do transcrito correspondente. Além disso, a comparação das seqüências de *tags* com as bases de dados do GenBank fornece informação qualitativa sobre os genes que estão sendo transcritos (<http://www.sagenet.org>).

A técnica da análise serial de expressão gênica baseia-se no método inicialmente descrito por VELCULESCU *et al.* (1997; 1995). Posteriormente, algumas modificações foram incorporadas no protocolo, dentre elas as de CHEN *et al.* (2000); KENZELMANN & MUHLEMAN, (1999); POWELL, (1998) e WANG & ROWLEY, (1998). Revisão extensa sobre o emprego desta técnica em distintas aplicações pode ser encontrada em YAMAMOTO *et al.* (2001). A Figura 3 ilustra a seqüência das principais etapas envolvidas na construção e análise de uma biblioteca SAGE.

O RNA total é extraído dos tecidos (1, Figura 3). A síntese do cDNA é realizada pela reação de transcrição reversa utilizando oligonucleotídeos ligados a partículas magnéticas. (2, Figura 3). O cDNA ligado às partículas magnéticas é clivado com a enzima de restrição *NlaIII*, que reconhece uma seqüência de 4 nucleotídeos (CATG) e digere o cDNA produzindo extremidades coesivas (3, Figura 3) e, em seguida, é dividido em duas alíquotas a serem ligadas aos *adaptadores* A ou B, que também possuem extremidades coesivas complementares à do cDNA (4, Figura 3). Por fim, o cDNA é novamente clivado por uma enzima, a *BsmFI*, que age sobre o cDNA a 14 pares de bases de distância do sítio de reconhecimento, liberando então um fragmento de cDNA de

14 pares de bases (onde 4 correspondem ao sítio da *NlaIII*) (**5**, Figura 3). São produzidas extremidades “cegas” com o fragmento de enzima *Klenow* DNA polimerase (**6**, Figura 3). As duas alíquotas de cDNA são misturadas e os *tags* são então ligados pela enzima ligase para a formação de *ditags* que contêm um *tag* flanqueado pelo *adaptador* A e o outro *tag* flanqueado pelo *adaptador* B (**7**, Figura 3). O *ditag* é amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando *primers* iniciadores dirigidos para as seqüências dos dois *adaptadores* (**8**, Figura 3). O produto de amplificação é isolado (**9**, Figura 3), os *adaptadores* são retirados utilizando-se novamente a enzima *NlaIII* (**10**, Figura 3). O sobrenadante é recuperado, os *ditags* com extremidades *NlaIII* livres são ligados entre si através de uma reação com a enzima ligase a fim de formar concatâmeros, ou seja, longas moléculas de DNA contendo vários *ditags* entrecortados por seqüências CATG (**11**, Figura 3). O concatâmero é em seguida clonado e sequenciado (**12**, Figura 3).

Figura 3 Esquema representando as etapas envolvidas na construção de biblioteca do tipo SAGE (Análise Serial de Expressão Gênica). 1 a 12: referências ao texto do corpo da tese.

Em relação a outros métodos de expressão diferencial, a técnica de SAGE tem como vantagem o fato de permitir o estudo de toda a população de transcritos de um tecido/órgão, sem a necessidade de conhecimento prévio de suas seqüências. Assim sendo, possibilita o estudo quantitativo tanto de genes conhecidos como de não conhecidos. Portanto, o SAGE constitui-se na atualidade em ferramenta ideal para determinar alterações na expressão gênica em consequência a diversos tratamentos, estágios fisiológicos e/ou patológicos distintos.

A maior parte dos trabalhos descritos na literatura até o momento empregando essa técnica, referem-se a estudos de expressão gênica em células ou tecidos humanos. Alguns exemplos incluem estudos de expressão gênica no músculo esquelético (WELLE *et al.*, 1999), em células hepáticas (YAMASHITA *et al.*, 2000), células renais (VIRLON *et al.*, 1999), e células da tireóide (PAUWS *et al.*, 2000) como referência para estudos futuros onde se queiram estudar variações fisiológicas e/ou patológicas. EL-MEANAUY *et al.* (2000) utilizaram a técnica de SAGE para gerar uma biblioteca do rim, utilizando o camundongo como modelo experimental. Os transcritos foram agrupados em grupos funcionais, sendo que as enzimas metabólicas, proteínas de membrana celular e proteínas ribossomais representaram os tipos mais abundantes (39, 14 e 12% dos transcritos, respectivamente). NEILSON *et al.* (2000) de maneira semelhante estudaram o transcriptoma do oócito na mesma espécie.

YAMASHITA *et al.* (2001) tomaram como base seu trabalho anterior (YAMASHITA *et al.*, 2000) e estudaram a expressão diferencial em células hepáticas nas condições de hepatite tipo C crônica e no carcinoma hepatocelular. RYO *et al.* (1999) estudaram linfócitos T infectados ou não pelo

vírus HIV-1 e observaram que o vírus mantém a célula ativada, acelerando o processo de replicação do HIV, e interrompendo a expressão de alguns genes, incluindo aqueles que regulam sistemas anti-apoptóticos.

Uma série de trabalhos foi publicada com o emprego de SAGE para a análise do comportamento do sistema imune. HASHIMOTO *et al.* (1999) descreveram o primeiro estudo de expressão gênica de células do sistema hematopoiético, no caso células dendríticas derivadas de monócitos. As mesmas células foram estudadas posteriormente (HASHIMOTO *et al.*, 2000), enfocando-se alterações moleculares decorrentes do processo de diferenciação das mesmas a partir de monócitos, que incluem: i) mudanças em compartimentos sub-celulares a fim de processar antígenos, ii) mudanças nas moléculas da superfície celular para aderir a tecidos e linfócitos e iii) mudanças nas moléculas relacionadas a migração celular. O processo de diferenciação de monócitos em macrófagos também foi estudado pelo mesmo grupo (HASHIMOTO *et al.*, 1999) evidenciando que, durante o processo, os genes com maior expressão foram aqueles envolvidos com metabolismo lipídico. KURAMASU *et al.* (2001) identificaram cerca de 70% genes não caracterizados previamente em mastócitos, sendo que os mesmos poderão ser úteis em estudos futuros da função destas células. Células de camundongos também foram estudadas por ANISIMOV *et al.*, (2002) e CHEN *et al.*, (2001) (células tronco embrionárias R1 pluripotentes e células progenitoras de células mielóides Gr-1⁺, respectivamente).

Células endoteliais e seu processo de ativação, que é o evento inicial do processo patogênico de aterosclerose, foram estudadas por DE WAARD *et al.* (1999), confirmando que o processo envolve a ativação de fatores protéicos

específicos. ST CROIX *et al.* (2000), com o intuito de estudar a angiogênese, compararam células endoteliais derivadas de vasos sanguíneos de tecidos coloretais normais e malignos. Dos mais de 170 transcritos, 79 foram diferencialmente expressos e representam proteínas de matriz extracelular sendo a maioria de função desconhecida.

SETH *et al.* (2000) utilizaram um modelo *in vitro* de células MC3T3-E1, derivadas de osteoblastos, para estudar a diferenciação dos mesmos. Células em repouso foram comparadas com células induzidas à diferenciação pela adição de β -glicerofosfato e ácido ascórbico. Os resultados foram a indução coordenada de Rab 24, calponina e calcitonina. Em contrapartida foram suprimidos MSY-1, SH3P2, fibronectina, α -colágeno, pró-colágeno, LAMP1 e o fator de transformação do crescimento TGF β , que modula a função da fosfatase alcalina.

Foram estudados 157.000 *tags* de células PC12 depois da diferenciação neuronal promovida pelo NGF representando 21.000 transcritos únicos. Destes, quase 800 se mostraram aumentados na magnitude de 6 vezes ou mais. Estes genes representam múltiplas ações: sinalização intracelular, fatores de transcrição, proliferação/síntese de DNA, dobramento de proteínas/chaperoninas, função microtubular, regulação da actina e citoesqueleto, tráfego de proteínas/vesículas, componentes de grânulos/vesículas sinápticas, proteínas de ligação ao cálcio, ubiquitinação/componentes de proteossomos, interação intercelular/substrato, neuroproteção, metabolismo energético, bombas iônicas/transportadores (ANGELASTRO *et al.*, 2000a).

Com o intuito de estudar melhor a função pato-fisiológica de monócitos humanos ativados, SUZUKI *et al.* (2000) compararam monócitos ativados e não ativados pelo lipopolissacarídeo (LPS). A ativação induziu uma maior expressão de várias citocinas e quimiocinas, incluindo IL-6, IL-1 α , IL-1 β , TNF α , MIP-1 β , MIP-2 β , MIP-2 α , quimiocina regulada pelo fígado e pela ativação (LARC), MIP-1 α , quimiocina regulada pelo timo e pela ativação (TARC), quimiocina derivada de macrófagos (MDC), RANTES, oncogene regulador de crescimento (GRO) e IL8. Aumentaram em segundo plano o ativador-inibidor de plasminogênio tipo 2 (PAI-2), Hc-gp39, apolipoproteínas, malato desidrogenase, metaloproteína 9 de matriz, cicloxigenase (COX2). Estes resultados sugerem que os produtos gênicos de monócitos estimulados pelo LPS estejam envolvidos com ativação e migração celular, remodelação tecidual, metabolismo e orquestrar as reações inflamatórias.

WELLE *et al.* (2000) com o propósito de estudar a senescência do tecido muscular humano, compararam o músculo *vastus lateralis* de jovens e idosos. Foram detectados 702 tags diferentes com pelo menos 10 vezes em um ou ambos os pools, sendo a frequência de detecção diferente em 89 destes. A razão de RNAm miosina cadeia pesada 2aa/miosina cadeia pesada 1 se reduziu no idoso. Diminuíram em 30% também RNAm codificante para proteínas mitocondriais envolvidas no transporte de elétrons e subunidades da ATP-sintase. Enzimas envolvidas no metabolismo da glicose também diminuíram.

KENZELMANN & MÜHLEMANN (2000) estudaram fibroblastos infectados com citomegalovirus humano e observaram quatro genes aumentados em relação a fibroblastos não infectados.

À semelhança do que acontece com outras técnicas de expressão gênica diferencial, como o microarray, grande volume de trabalhos tem sido dedicado a estudos com o câncer. Alguns exemplos são discorridos a seguir. O PPAR δ é alvo do APC, um supressor tumoral, em uma resposta que é mediada pela β -catenina e elementos responsivos ao Tcf-4 na região do promotor do PPAR δ . O fato do PPAR δ se ligar a eicosanóides sugere que o mesmo seja alvo de drogas anti-inflamatórias não esteroidais quimiopreventivas. Ele é suprimido pelo sucindac, o que sugere que anti-inflamatórios não esteroidais inibam a tumorigênese via inibição do PPAR δ (HE *et al.*, 1999). A proteína myc, um fator de transcrição, quando transfectada em neuroblastomas aumenta a expressão de várias proteínas que têm papel na constituição e atividade ribossomal, o que sugere que a mesma esta envolvida na maquinaria da síntese protéica. Outra via superexpressada foi a glicolítica. Análise por Northern Blot confirmou todos os transcritos testados (BOON *et al.*, 2001).

HIBI *et al.* (1998), observaram que alguns fatores se expressam mais em células cancerosas de pulmão quando comparadas com o tecido normal. MICHIELS *et al.* (1999), comparando células normais e tumorais do cérebro fetal, encontraram fatores que sugerem que o meduloblastoma (tumor cerebral infantil) se origina das camadas germinais vestibulares. Células derivadas de ratos foram utilizadas no estudo da expressão diferencial induzida pela proteína p53 (MADDEN *et al.*, 1997) e da diferenciação neuronal induzida pelo NGF (ANGELASTRO *et al.*, 2000b).

ZHANG *et al.* (1997), observaram grande similaridade entre tumores gastrointestinais humanos e células normais. No entanto, dos genes expressos diferencialmente, vários são comuns entre câncer colorretal e cancer

pancreático. Além disso, a maioria dos transcriptos (86%) eram expressos em menos de 5 cópias por células. Células do câncer colorretal infectadas e não infectadas por Adenovirus codificando para a proteína p53 (Adp53) foram comparadas. De 7202 transcritos identificados, 14 (0,19%) estavam aumentados nas células infectadas e representam proteínas que geram ou respondem ao estresse oxidativo (POLYAK *et al.*, 1997). A técnica de SAGE também revelou um *tag* expressando freqüentemente em células direcionadas a células T, a quimiocina CC TARC. O RT-PCR foi positivo em esclerose nodular, linfomas de Hodgkins clássicos de celularidade mista, mas não em outros tipos de linfomas (VAN DEN BERG *et al.*, 1999).

1.8 SAGE em tecidos reprodutivos

A técnica de SAGE tem sido utilizada para estudar tecidos reprodutivos normais ou no contexto tumoral. BAHRENBURG *et al.* (2000) estudou o câncer de próstata e constatou que o PSCA (do inglês “prostate stem cell antigen”), que é expresso em níveis elevados no câncer de próstata, foi constatado estar em baixa expressão em outros tipos de tumores como os de bexiga, esôfago e estômago. XU *et al.* (2000) identificaram pela técnica de SAGE um novo gene regulado pelo andrógeno e PMEPA-1. Este gene pode ser útil como biomarcador no tecido prostático.

Pela técnica de SAGE foi identificado o gene σ cuja expressão está sete vezes abaixo em células de carcinoma mamário quando comparadas com células do epitélio mamário normal. A hipermetilação das ilhas CpG no gene σ pode ser detectada em 91% dos tumores sendo associado com a falta de expressão. É possível que a perda de expressão de σ contribua para a

transformação maligna (FERGUSON *et al.*, 2000). Células MCF7 derivadas do cancer mamário humano foram divididas em dois grupos: tratadas e não tratadas com estrógeno. Os dois perfis foram similares, mas 4 transcritos apresentaram-se marcadamente aumentados pelo tratamento com estrógeno, a saber, catepsina, pS2, proteína do grupo 1 de alta mobilidade e WISP-2. O aumento WISP-2 é prevenido pela co-incubação com anti-estrógeno, mas não pela co-incubação com cicloximide, indicando que o WISP-2 é diretamente regulado pelo receptor de estrógeno. O WISP-2 também é induzido por estrógenos ambientais (INADERA *et al.*, 2000).

NEILSON *et al.* (2000) estudaram o transcriptoma do oócito de camundongo gerando aproximadamente 50.000 tags, representando genes conhecidos e outros ainda não descritos previamente como expressos no ovário. HOUGH *et al.* (2000) identificaram inúmeros genes expressos de maneira altamente diferenciada entre o epitélio ovariano não transformado e o carcinoma ovariano, sendo que alguns destes genes ainda não eram conhecidos. Alguns destes genes expressos em maior quantidade são proteínas de superfície ou secreção como as claudinas-3 e -4, HE 4, mucina-1, molécula de adesão celular epitelial, mesotelina e apolipoproteína E (ApoE) e J (ApoJ).

Recentemente, MCRAE *et al.* (2005) estudaram os perfis de expressão gênica de células da granulosa de folículos ovarianos de ratas durante o processo de luteinização. Alguns genes se mostraram mais ativados durante o processo, incluindo enzimas esteroidogênicas e proteínas associadas (P45011A1, StAR, adrenodoxina), genes envolvidos na remodelação do citoesqueleto (actina, cofilina, tubulina β 2) entre outros.

1.9 SAGE na agropecuária

Existem diversos trabalhos empregando SAGE no estudo da expressão gênica de plantas (GOWDA *et al.*, 2004; LORENZ & DEAN, 2002; MATSUMURA *et al.*, 1999) e leveduras (BASRAI *et al.*, 1999; GYGI *et al.*, 1999; KAL *et al.*, 1999; VELCULESCU *et al.*, 1997).

Por ser uma técnica de descoberta recente, poucos trabalhos empregaram a técnica de SAGE como ferramenta para o estudo da expressão gênica em células/tecidos de animais de produção. BLOMBERG *et al.* (2004), com o objetivo de estudar as causas da perda dos conceptos suínos no período peri-implantação, estudaram os perfis de transcriptoma de conceptos nos dias 11 e 12 gestacionais. A análise serial de expressão gênica revelou um total de 431 tags diferencialmente expressos entre as duas bibliotecas, incluindo genes envolvidos com a esteroidogênese e o stress oxidativo.

Na África central, bovinos da raça N'Dama (*Bos taurus*) são sabidamente capazes de resistir a infecções por tripanossomas, habilidade denominada tripanotolerância. BERTHIER *et al.* (2003) utilizaram a técnica de SAGE, a partir de células mononucleares do sangue periférico, para construir duas bibliotecas dos dias 0 e 10 pós-infecção por *Trypanosoma congolense*. Dados preliminares identificaram um total de 187 genes expressos diferencialmente.

O presente trabalho propõe a utilização da técnica de SAGE em fêmeas *Bos primigenius indicus* pré-púberes e púberes com o intuito de analisar diferenças nos perfis de expressão gênica em folículo ovariano. O trabalho se justifica pelo fato do estudo de expressão gênica diferencial neste cenário prover uma ferramenta auxiliar para a compreensão da fisiologia da puberdade, podendo contribuir na elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos e,

permitindo eventualmente, a utilização destas informações no desenvolvimento de marcadores genéticos direcionados a genes específicos envolvidos na manifestação da característica zootécnica de interesse.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais:

- ✓ Analisar os perfis de expressão diferencial de genes em folículos ovarianos de *Bos primigenius indicus* (Nelore) pré-púberes e púberes com o intuito de identificar e caracterizar marcadores genéticos para a aplicação em programas de seleção assistida por marcadores.

2.2 Objetivos específicos:

- ✓ Analisar a expressão gênica diferencial em folículos ovarianos de animais *Bos primigenius indicus* (Nelore) distintos quanto à fase fisiológica (antes e depois da puberdade) por meio da técnica de Análise Serial de Expressão Gênica (SAGE).
- ✓ Estabelecer correlações entre eventuais diferenças quantitativas e/ou qualitativas na expressão gênica com a manifestação de características fisiológicas distintas.

3 Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

Os animais foram examinados diariamente por ultra-sonografia transretal para acompanhamento da dinâmica folicular ovariana. Baseando-se na média do padrão de crescimento do diâmetro folicular das ondas precedentes, os animais foram sacrificados no momento de maior diâmetro folicular (ao redor de 8 mm nas bezerras pré-púberes e de 14 mm nas novilhas púberes). Após o abate, os ovários foram retirados e os folículos dominantes dissecados.

RNA total dos folículos dominantes de cada animal foi extraído e mantido individualizado até a sua mistura com outros RNAs de animais da mesma categoria (três bezerras pré-púberes ou duas novilhas púberes) mantendo concentrações proporcionais de RNA de cada indivíduo do grupo na mistura. Aproximadamente 30 µg da mistura de RNA foram utilizados para a construção de duas bibliotecas SAGE.

As bibliotecas tiveram suas seqüências determinadas e foram analisadas qualitativa e quantitativamente. As duas bibliotecas foram comparadas gerando uma lista de genes (tags) diferencialmente expressos.

A Figura 4 demonstra a seqüência de etapas desenvolvidas no presente trabalho.

Figura 4 Organograma representando o delineamento experimental

3.2 Animais

Em janeiro de 2001 ocorreu o nascimento das 3 bezerras *Bos primigenius indicus* (Nelore) (Figura 5) provenientes de rebanho comercial no município de Araçatuba. Todos os animais foram mantidos nas dependências da Fazenda Santa Cecília (Araçatuba – S.P.) em fase de amamentação e submetidos à ultra-sonografia transretal para o acompanhamento da dinâmica folicular à partir dos três meses de idade (abril de 2001)).

Em maio de 2003 foram adquiridas outras três novilhas *Bos primigenius indicus* (Nelore) com 20 meses de idade provenientes de rebanho comercial no município de Araçatuba, com a informação de que já haviam apresentado a primeira ovulação entretanto não expostas à monta ou inseminação artificial. As novilhas foram mantidas no curral experimental da Faculdade de Odontologia (Curso de Medicina Veterinária) da UNESP em Araçatuba recebendo água *ad libitum* e ração de crescimento e feno (Figura 6). Após dois meses de adaptação, as fêmeas foram submetidas a ultra-sonografia transretal para o acompanhamento da dinâmica folicular e ovulações.

Figura 5. Bezerras da sub-espécie *Bos primigenius indicus* (Nelore) pré-púberes.

Figura 6. Novilhas da sub-espécie *Bos primigenius indicus* (Nelore) púberes.

3.3 Ultra-sonografia transretal

Foram realizados exames ultra-sonográficos transretais (Figura 7) diariamente a partir dos três meses de idade nas bezerras pré-puberes para avaliar a morfologia do ovário, com o intuito de determinar o comportamento das ondas foliculares. Os exames foram feitos utilizando o equipamento de ultra-sonografia GE (General Electric LogicTM α-100 CE 0459; GE Medical System, Milwaukee, EUA) acoplado a um transdutor linear de 5 MHz para uso transretal, que por sua vez foi acoplado a um bastão de madeira para permitir sua introdução no reto sem a necessidade de co-introdução da mão do operador.

Os exames para avaliação dos ovários foram feitos de acordo com GINTHER *et al.* (1996). Após a contenção do animal no brete e retirada das fezes do reto, o transdutor linear recoberto por uma camada fina de gel (Synth carboximetilcelulose – sal sódico USP) foi introduzido com a face dos cristais voltada ventralmente. Durante a passagem do transdutor sobre a cérvix e corpo do útero, foram realizados suaves movimentos latero-laterais para avaliação dessas estruturas. Em seguida, o transdutor foi direcionado no sentido de cada ovário, buscando posicioná-los sob o transdutor e, com movimentos antero-posteriores e latero-laterais, os ovários foram avaliados quanto a localização e diâmetro de cada folículo.

A cada dia, a posição e o diâmetro dos folículos maiores ou iguais a 4mm foram anotados em fichas individuais. A imagem foi congelada na área aparente de maior distância entre as bordas do folículo e a mensuração do antro foi feita na altura e largura máximos da imagem, com os marcadores (calipers) do ultra-som. O diâmetro foi estimado através da média dos valores

obtidos. Quando possível, as ondas foliculares foram obtidas pela observação do crescimento de um grupo de folículos, individualizando o maior folículo até a sua regressão. A fase de crescimento foi definida a partir do dia em que os folículos identificados aumentaram de diâmetro ($> 1\text{mm}/\text{dia}$) até cessarem o seu crescimento. A fase estática foi definida como o período em que os folículos atingiram o seu maior diâmetro e não variaram de tamanho. A fase de regressão foi definida como o período em que os folículos começaram a regredir até atingirem o diâmetro de 4 mm.

Por volta dos 7 meses de idade das bezerras pré-púberes, foi iniciado o abate dos animais, sempre baseando-se no atingimento do diâmetro máximo do folículo dominante (aproximadamente 8mm) e realizando o abate no momento imediatamente anterior ao da regressão folicular.

Em relação às novilhas púberes, foram realizados exames ultrasonográficos transretais diariamente a partir dos 22 meses de idade para acessar a morfologia do ovário, com o intuito de determinar o comportamento das ondas foliculares e as ovulações.

Os exames dos ovários foram feitos conforme anteriormente descrito com a diferença de que não foi necessária a utilização do transdutor adaptado.

Em outubro de 2003 foi conduzido o abate da primeira novilha (25 meses de idade e com folículo de aproximadamente 14 mm). Escolheu-se o dia da véspera da provável terceira ovulação (41 dias após a primeira ovulação observada). Em novembro foi conduzido o abate da segunda novilha. A terceira novilha foi observada de julho de 2003 a janeiro de 2004 e

apresentou apenas folículos pequenos que não culminaram com ovulação, levando ao seu descarte do experimento.

3.4 Coleta dos tecidos

Para o abate dos animais, foi realizada a secção da medula na altura da articulação atlanto-occipital. Em seguida, foi iniciada a sangria do animal pela secção da veia jugular. Assim que o animal não apresentasse mais os reflexos vitais, foi iniciada a retirada dos tecidos de interesse. A cavidade pélvica foi exposta e os ovários retirados (Figura 8). O ovário contendo o folículo dominante foi levado em Tubo Falcon[®] de 15 ml mantido em gelo para o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal onde foi dissecado em placa mantida resfriada (Figura 9). Uma vez dissecado, o folículo ovariano foi submergido em nitrogênio líquido em tubo apropriado, permanecendo até o momento da extração de RNA. .

Figura 7 Exame ultrassonográfico em bezerra utilizando o transdutor adaptado.

Figura 8 Exposição da cavidade pélvica para a retirada dos ovários. A seta indica o ovário direito dentro da cavidade pélvica.

Figura 9 Dissecando o folículo dominante em placa gelada.

3.5 Extração e Análise do RNA

Com o auxílio de lâminas de micrótomo, pinças dente de rato e placas de Petri mantidas refrigeradas fragmentou-se individualmente os folículos congelados em pequenos fragmentos. Durante este procedimento, os tecidos foram resfriados no gelo para diminuir ao máximo a degradação do RNA e, para facilitar o processo de fragmentação dos mesmos. Em seguida, os tecidos foram macerados em um cadinho gelado em nitrogênio líquido e o conteúdo do macerado foi dividido em tubos plásticos graduados de 10 ml.

O RNA total das células foi extraído pelo método do TRIzol, conforme o protocolo do fabricante (Invitrogen®), que é baseado no método de CHOMCZYNSKI & SACCHI (1987). A cada 100 mg de tecido, adicionou-se 1 ml de Trizol. Em seguida incubou-se a mistura por 5 minutos, para que ocorresse a dissociação das nucleoproteínas. Adicionou-se 0,2 ml de clorofórmio resfriado a 4°C para cada ml de TRizol e homogeneizou-se vigorosamente por inversão durante 15 segundos. Em seguida incubou-se a solução por 2 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação à 14.000 g por 10 minutos a 4°C transferiu-se a fase aquosa para outro tubo de 10 ml e adicionou-se 0,5 ml de isopropanol resfriado a -20°C para cada ml de TRizol utilizado. Homogeneizou-se e dividiu-se a solução em tubos de 1,5 ml, incubando-se em gelo por 10 minutos. Após nova centrifugação a 14.000 g por 10 minutos à 4°C, removeu-se o sobrenadante e lavou-se o sedimento de cada tubo com 1 ml de etanol 75% gelado. Misturou-se e centrifugou-se à 7.500 X g por 5 minutos à 4°C. Após deixar-se o sedimento secar por 10 minutos na temperatura ambiente ressuspendeu-se o mesmo em 20 µl de TE

(Tris-EDTA, pH 8,0). Incubou-se por 10 minutos à 56°C para solubilização e por 5 minutos no gelo.

A cada 20 µl de solução (TE + RNA total) foi adicionado 1 µl de DNase (Amersham Pharmacia Biotech). Incubou-se por 15 minutos à 37°C em banho-maria e, em seguida, em gelo por 5 minutos. No final do processo as amostras de RNA foram armazenadas em freezer -80°C.

Previamente antes do armazenamento, uma pequena fração do RNA de cada amostra foi retirada da solução principal. Parte foi usada para espectrofotometria e parte para eletroforese desnaturante em gel de agarose.

As aliquotas foram diluídas em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e submetidas à análise espectrofotométrica nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. Os valores de leitura obtidos em DO_{260} foram utilizados como referência para quantificar o RNA, levando-se em conta que $DO_{260} = 1 \approx 40 \mu\text{g}$ de RNA/ml. Fazendo-se uma regra de três e corrigindo as diluições, chegou-se às concentrações de RNA das amostras. O índice DO_{260} / DO_{280} esteve em torno de 1,8 indicando a boa qualidade dos procedimentos de extração.

Para visualização da qualidade do RNA total, adicionou-se a 2,75 µl de cada solução de RNA purificada, 0,5 µl de ácido 3-(N-morfolino)propanosulfônico (MOPS) 10x, 1,75 µl de formaldeído e 5,0 µl de formamida. As amostras foram incubadas por 15 minutos à 65°C em termociclador e, em seguida, no gelo por 5 minutos. Adicionou-se a cada amostra 1 µl de brometo de etídio (1:20), 2 µl de sacarose (40%) e 1 µl de “tampão de amostra”. Para preparação do gel desnaturante de agarose 1% (w/v) para RNA (volume final de 99,44 ml) utilizou-se 1,04 g de agarose, 10,4

ml de MOPS 10x e 88 ml de água-DEPC. Realizou-se a eletroforese à 70V por aproximadamente 90 minutos.

3.6 Análise Serial de Expressão Gênica (SAGE)

3.6.1 Preparo do RNA

Utilizou-se uma mistura equimolar de RNAs de cada grupo experimental constituído de 10 μ g de RNA de cada uma das três novilhas pré-púberes totalizando quantidade final de 30 μ g e 15 μ g de RNA de uma das duas novilhas púberes totalizando quantidade final de 30 μ g. O volume foi completado para 1 ml com o “Tampão de Lise e Ligação”.

3.6.2 Preparo das partículas ligadas aos oligo(dT)s

Ressuspendeu-se vigorosamente os oligo(dT)s ligados às partículas magnéticas e transferiu-se 100 μ l para um tubo de microcentrifuga com capacidade para 1,5 ml previamente siliconizado e autoclavado. Colocou-se o tubo em estante magnética por 1-2 minutos e cuidadosamente removeu-se o sobrenadante que foi descartado. Lavaram-se as partículas ressuspensando-as em 500 μ l do “Tampão de Lise e Ligação”. Colocou-se novamente o tubo na estante magnética por 1-2 minutos. Cuidadosamente removeu-se o sobrenadante e acrescentou-se a amostra de RNA às partículas magnéticas.

3.6.3 Ligação do RNAm

Cada uma das misturas de amostras de RNA a serem utilizadas na preparação das bibliotecas SAGE (30 µg de RNA em 1 ml de “Tampão de Lise e Ligação”) foi adicionada às partículas magnéticas equilibradas com “Tampão de Lise e Ligação”. Misturaram-se as partículas e a amostra de RNA por inversão durante 20 minutos à temperatura ambiente. Colocou-se o tubo na estante magnética por 1-2 minutos e cuidadosamente removeu-se o sobrenadante. Lavaram-se as partículas duas vezes com 1,0 ml do “Tampão de Lavagem A”. Lavou-se com 1,0 ml do “Tampão de Lavagem B”. Lavaram-se as partículas quatro vezes com 100 µl de “Tampão da Primeira Fita 1X” colocando o tubo na estante magnética por 1-2 minutos e removendo o sobrenadante entre as lavagens. Antes de remover o sobrenadante da quarta lavagem, preparou-se a reação da Síntese de cDNA Primeira Fita.

3.6.4 Síntese de cDNA

Para a síntese da primeira fita de cDNA foi preparada solução contendo: 18 µl de “Tampão da Primeira Fita 5X”, 1 µl de RNaseOUT, 54,5 µl de água-DEPC, 9 µl de DTT 0,1M e 4,5 µl de dNTP mix (10 mM cada), mantendo o tubo em banho de gelo. Ressuspenderam-se as partículas contendo a amostra de RNA na solução previamente descrita. Homogeneizou-se e incubou-se a mistura a 37 °C por 2 minutos para equilibrar os reagentes. Acrescentou-se 3 µl de “SuperScript™ II reverse transcriptase” homogeneizando-se e incubando-se a 37 °C por 1 hora. A amostra foi homogeneizada a cada 10-15 minutos até completar 1 hora

quando a reação da primeira fita foi terminada pelo resfriamento do tubo em banho de gelo por 2 minutos.

Continuou-se com a síntese de segunda fita de cDNA acrescentando-se seqüencialmente os seguintes reagentes ao tubo contendo 90 µl da reação de primeira fita: 465 µl de água-DEPC, 150 µl de “Tampão da Segunda Fita 5X”, 15 µl de dNTP mix (10 mM cada), 5 µl de *E.coli* DNA ligase, 20 µl de *E.coli* DNA polimerase e 5 µl de *E.coli* RNase H. Homogeneizou-se vigorosamente o conteúdo do tubo e centrifugou-se por alguns segundos. Incubou-se a solução a 16 °C por duas horas, ressuspensando-se as partículas a cada 10-15 minutos. Colocou-se o tubo no gelo e acrescentou-se 45 µl de solução 0,5 M EDTA para inibir as reações enzimáticas. Colocou-se o tubo na estante magnética por 1-2 minutos e cuidadosamente removeu-se o sobrenadante. Acrescentou-se 750 µl de “Tampão de Lavagem C” aquecido à 37°C para inativar a *E. coli* DNA polimerase. A amostra foi aquecida à 75 °C por 10-12 minutos homogeneizando-se intermitentemente para inativar completamente a polimerase. Colocou-se o tubo na estante magnética por 1-2 minutos e removeu-se o sobrenadante, lavando-se novamente com 750 µl de “Tampão de Lavagem C” e posteriormente outras quatro vezes com o “Tampão de Lavagem D”. Após a quarta lavagem, ressuspenderam-se as partículas em “Tampão de Lavagem D”, retirou-se 2 µl para a Verificação da Síntese de cDNA (Quadro 1), que foram armazenados à 4°C até que se pudesse realizar o PCR controle. O tubo contendo a solução com cDNA foi colocado na estante magnética por 1-2 minutos, tendo o sobrenadante removido cuidadosamente após esse período. Adicionou-se 200 µl do “Tampão 4 1X” e

ressuspendeu-se gentilmente as partículas. Transferiu-se o conteúdo para um novo tubo de microcentrífuga para evitar qualquer traço de atividade de exonuclease da *E. coli* DNA polimerase. Lavou-se o tubo antigo uma vez mais com 200 µl do “Tampão 4 1X” e transferiu-se o conteúdo ao novo tubo contendo a mistura. Colocou-se o tubo na estante magnética por 1-2 minutos e removeu-se o sobrenadante que foi descartado. Lavou-se o tubo uma vez mais com 200 µl de “Tampão 4 1X”. Neste momento armazenou-se as partículas a 4 °C “overnight”.

Verificação da síntese de cDNA

Para averiguar a eficiência da síntese do cDNA foram realizados controles de amplificação por PCR dos genes gliceraldeído fosfo desidrogenase (GAPDH) e o fator de alongação (EF). Preparou-se solução contendo 31,5 µl de água, 5 µl de “Tampão BV 10X”, 3 µl de DMSO, 5 µl de dNTP mix (10 mM cada), 2 µl de cada oligonucleotídeo iniciador (GAPDH sense e antisense ou EF sense e antisense) e 0,5 µl de Platinum Taq polimerase (Invitrogen). Por fim foi adicionado a cada tubo 1 µl de amostra, que foi amplificada por PCR de acordo com as seguintes condições de termociclagem: para a amplificação de GAPDH - denaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 32 ciclos de 95°C por 1 minuto, 70°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos e finalmente a extensão final a 72°C por 2 minutos. Para a amplificação de EF: denaturação inicial a 95°C por 2 minutos, 27 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos, acrescidos de 5 minutos a 72°C. Para visualização, o material amplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose 2% (w/v)

Seqüências dos oligonucleotídeos utilizados

GAPDH sense	5'- AGTGGGGTGATGCTGGTGCTGAGTA – 3'
GAPDH antisense	5'- ACGCCTGCTTCACCACTTCTTGAT – 3'
EF sense	5'- AAGTCTGCCGACAAAGCTCA – 3'
EF antisense	5'- TGACCAAAAGGAAGACACAGG – 3'

Quadro 1 Verificação da síntese de cDNA.

3.6.5 Digestão pela *N/a* III

Como primeiro passo da formação dos tags foi feita a digestão dos cDNAs pela enzima de restrição *N/a* III. Para tal, colocaram-se as partículas magnéticas que foram armazenadas durante a noite na estante magnética

por 2 minutos. Removeu-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as partículas na seguinte solução: 172 µl de tampão LoTE, 2 µl de 100X soro albumina bovina 100X (BSA), 20 µl de “Tampão 4 10X” e 6 µl de *Nla* III. Incubou-se a 37°C por 2 horas, homogeneizando-se ocasionalmente para evitar a sedimentação das partículas magnéticas. Uma vez finda a reação, colocou-se o tubo na estante magnética por 1-2 minutos e cuidadosamente descartou-se o sobrenadante. Inativou-se a *Nla* III lavando-se o tubo duas vezes com 750 µl de “Tampão de Lavagem C”. Em seguida, lavaram-se as partículas quatro vezes com 750 µl do “Tampão de Lavagem D”. Depois da última lavagem ressuspenderam-se as partículas em 750 µl de “Tampão de Lavagem D”. Deste material foram retirados 2 µl para a verificação eficiência da digestão pela *Nla* III, sendo o restante estocado a 4 °C.

O protocolo para a verificação da digestão pela *Nla* III é semelhante àquele empregado na verificação da síntese de cDNA. A única diferença é que esperou-se que o fragmento de 540 pb do gene da GAPDH não aparecesse, indicando a perda de um sítio CATG no mesmo, que é reconhecido e clivado pela enzima *Nla* III.

Uma vez feita a verificação, colocou-se o tubo contendo o material clivado na estante magnética por 1-2 minutos e cuidadosamente removeu-se o sobrenadante. Lavou-se o sedimento duas vezes com 150 µl de “Tampão da Ligase 1X”. Após a lavagem final ressuspenderam-se as partículas em 100 µl de “Tampão da Ligase 1X” e dividiu-se a amostra igualmente em dois novos tubos, A e B. Esta divisão foi feita a fim de permitir a adição de um adaptador diferente em cada aliquota. Cada adaptador possuiu três atributos: 1) a extremidade 3’ compatível com a extremidade dos fragmentos ligados às

partículas magnéticas resultantes da digestão pela *Nla* III, 2) um sítio de reconhecimento para a enzima *Bsm* FI e 3) a extremidade 5' constituída de uma sequência reconhecida pelos oligonucleotídeos iniciadores DTP 1, no caso do adaptador A, e pelos oligonucleotídeos DTP 2, no adaptador B.

Lavaram-se os tubos A e B contendo as partículas uma vez com “Tampão da Ligase 1X”. Ressuspenderam-se as partículas em “Tampão da Ligase 1X” e procedeu-se imediatamente à ligação dos adaptadores ao cDNA.

3.6.6 Ligação dos adaptadores ao cDNA

Colocaram-se os tubos mencionados no item anterior na estante magnética por 1-2 minutos e cuidadosamente removeu-se o sobrenadante, acrescentando-se os seguintes reagentes: 14 µl de LoTE, 2 µl de “Tampão da Ligase 10X”, 1,5 µl de Adaptador A (20 ng/µl) no Tubo A e 1,5 µl de Adaptador B (20 ng/µl) no Tubo B.

Ressuspenderam-se as partículas e aqueceram-se os tubos por dois minutos a 50 °C, seguido de resfriamento à temperatura ambiente por 15 minutos e finalmente resfriamento das mesmas em banho de gelo. Acrescentou-se 2,5 µl de T4 DNA ligase homogeneizando-se vigorosamente. Incubou-se por duas horas a 16 °C, misturando-se intermitentemente para evitar a sedimentação das partículas magnéticas. Findo o processo de ligação, lavou-se cada tubo quatro vezes com 500 µl de “Tampão de Lavagem D”. Durante a quarta lavagem, ressuspenderam-se as partículas em “Tampão de Lavagem D” e removeram-se 2 µl da amostra de cada tubo para a verificação da ligação dos adaptadores (Quadro 2).

Colocou-se o tubo na estante magnética por 1-2 minutos e removeu-se o sobrenadante. Lavou-se cada tubo duas vezes com 200 µl de “Tampão 4 1X”. Ressuspenderam-se as partículas em “Tampão 4 1X”, sendo os tubos armazenados a 4°C por 16 horas.

Verificação da ligação dos adaptadores

Numerou-se quatro tubos de 1 a 4. Acrescentou-se a cada um 32 µl de água-DEPC, 5 µl de “Tampão BV 10X”, 3 µl de DMSO, 5 µl de dNTP mix (10 mM cada) e 2 µl do oligonucleotídeo iniciador EF antisense. Nos Tubos 1 e 2 foi acrescentado 2 µl de oligonucleotídeo DTP 1, enquanto que nos tubos 3 e 4. Foi acrescentado 2 µl de DTP2. 1 µl da amostra do tubo A foi acrescido aos tubos 1 e 3 e 1 µl da amostra do tubo B foi acrescido aos tubos 2 e 4. Esperou-se a amplificação de fragmentos de 275 pb nos tubos 1 e 4 apenas. As seguintes condições de termociclagem foram empregadas: 1 minuto a 95°C, 27 ciclos de 1 minutos a 95°C, 1 minuto a 55°C e 2 minutos a 72°C, e uma extensão final de 5 minutos a 72°C. O resultado foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo.

Adaptador A

5' TTTGGATTGCTGGTGCAGTACA ACTAGGCTTAATAGGGACATG3'
3' amino CCTAAACGACCACGTCATGTTGATCCGAATTATCCCT PO₄ 5'

Adaptador B

5' TTTCTGCTCGAATTCAAGCTTCTAACGATGTACGGGGACATG3'
3' amino GACGAGCTTAAGTTCTGAAGATTGCTACATGCCCCCT PO₄ 5'

DTP1 priming site

DTP2 priming site

Sítio de reconhecimento da enzima *Bsm* FI

Quadro 2 Verificação da ligação dos adaptadores

3.6.7 Digestão pela *Bsm* FI

Colocaram-se os dois tubos obtidos no passo anterior na estante magnética por 1-2 minutos. Removeu-se cuidadosamente e descartou-se o sobrenadante. Ao sedimento dos mesmos foram acrescentados 174 µl de LoTE, 20 µl de “Tampão 4 10X” e 4 µl de 100X BSA, sempre mantendo os tubos em banho de gelo. Pré-incubaram-se os tubos a 65 °C por 2 minutos sendo em seguida acrescentados 2 µl de *Bsm* FI a cada tubo, misturando-se

vigorosamente. Após a adição da enzima, incubou-se a 65 °C por 2 horas com agitação ocasional. Findo o processo, colocaram-se os tubos na estante magnética por 1-2 minutos. Removeu-se cuidadosamente o sobrenadante de cada tubo e transferiu-se para um novo tubo. Não foi descartado o sobrenadante, uma vez que os “tags” estavam presentes no mesmo após a digestão com *Bsm* FI. Ressuspenderam-se as partículas em 500 µl de “Tampão de Lavagem D” e retirou-se 4µl para a verificação da digestão com a *Bsm* FI. A protocolo da verificação da digestão pela *Bsm* FI foi semelhante aquele utilizado para a verificação da ligação dos adaptadores. Neste caso, esperou-se que nenhum fragmento fosse amplificado pela PCR.

3.6.8 Purificação dos fragmentos de DNA

A cada tubo foi acrescentado igual volume de solução eqüimolar de fenol/clorofórmio. Homogeneizou-se e centrifugou-se à 14.000 g por 5 minutos à temperatura ambiente. Transferiu-se a fase aquosa superior (aproximadamente 200 µl) de cada tubo para um novo tubo de microcentrífuga. Acrescentou-se 133 µl de acetato de amônio 7,5 M, 3 µl de “mussel glycogen”, e 1000 µl de etanol 100% para cada novo tubo. Homogeneizou-se vigorosamente, incubou-se em banho de gelo seco com etanol por 20 minutos e centrifugou-se à 14.000 g por 40 minutos a 4 °C. Removeu-se cuidadosamente o sobrenadante que foi descartado. Lavou-se o sedimento duas vezes com 1000 µl de etanol 70%. Após a última lavagem, centrifugou-se novamente para coletar qualquer etanol residual. Removeu-se cuidadosamente o etanol e secou-se o sedimento em centrífuga a vácuo por 5-10 minutos, até que não se visualizasse líquido no interior dos tubos. Cada

sedimento foi ressuspensionado em 10 µl de LoTE e incubado a 37 °C por 3 minutos para ressuspensão.

3.6.9 Reação de polimerização pela enzima Klenow DNA polimerase

Esse procedimento foi realizado com o intuito de transformar as extremidades coesivas originadas da digestão pela *Bsm* FI em extremidades cegas.

Acrescentaram-se os seguintes reagentes a cada tubo contendo 10 µl da amostra: 30,5 µl de água-DEPC, 5 µl de “Tampão Klenow 10X”, 1 µl de 100X BSA e 1 µl da enzima Klenow DNA polymerase. Homogeneizou-se vigorosamente e incubou-se por 30 minutos a 37 °C. Juntaram-se os conteúdos dos tubos A e B, transferindo-se 50 µl do Tubo A ao Tubo B (100 µl total). Lavou-se o Tubo A com 200 µl de LoTE e então transferiu-se ao Tubo B para alcançar um total de 300 µl.

3.6.10 Purificação dos fragmentos de DNA

Adicionou-se igual volume de solução eqüimolar de fenol/clorofórmio. ao Tubo B e homogeneizou-se vigorosamente e centrifugou-se à 14.000 g por 5 minutos à temperatura ambiente. Transferiu-se 300 µl da fase aquosa para um novo tubo. Removeu-se 100 µl da fase aquosa do tubo anterior para um novo tubo para servir como controle negativo (“no ligase”) posteriormente. Acrescentou-se 100 µl de Água-DEPC ao controle negativo para atingir volume final de 200 µl. A cada tubo foram acrescentados 133 µl de acetato de amônio 7,5 M, 3 µl de “mussel glycogen” e 1000 µl de etanol 100%. Incubou-

se no banho de gelo seco com etanol por 20 minutos e centrifugou-se à 14.000 g por 40 minutos à 4 °C. Removeu-se cuidadosamente o sobrenadante que foi descartado. Lavou-se o sedimento duas vezes com 1000 µl de etanol 70%. Após a última lavagem, centrifugou-se novamente para coletar qualquer etanol residual. Após a lavagem final, removeu-se cuidadosamente o etanol e secou-se o sedimento em centrífuga a vácuo por 5-10 minutos, até que não se visualizasse líquido no interior dos tubos.. Ressuspendeu-se o sedimento em 1,5 µl LoTE e incubou-se a 37 °C por 10-15 minutos para auxiliar na solubilização.

3.6.11 Formação de ditags

Prepararam-se em banho de gelo, dois tubos estéreis contendo a seguinte solução: 0,75 µl de água-DEPC e 0,75 µl de “Tampão da Ligase 10X”. No primeiro tubo, denominado 2X Ditag, foram acrescentados 1,25 µl de Tris-HCl 3mM, pH7,5 e 1 µl da enzima T4 DNA ligase. No segundo tubo, denominado 2X Controle Negativo (no ligase), foram acrescentados 2,25 µl de Tris-HCl 3mM, pH 7,5. Acrescentou-se 1,5 µl da mistura de reação denominada “2X Ditag” ao tubo contendo “tags” ressuspendidos em 1,5 µl LoTE (conforme item 3.6.11). Acrescentou-se 1,5 µl da mistura “2X controle negativo (no ligase)” ao tubo contendo a amostra armazenada para teste (conforme descrito no item 3.6.11). Incubaram-se os dois tubos “overnight” a 16 °C. Após a incubação, adicionou-se 14 µl de LoTE a cada um dos dois tubos.

3.6.12 Otimização das condições do Ditag PCR

Diluiu-se o controle negativo na proporção de 1/20 e os ditags na de 1/20, 1/40 e 1/80 em água estéril. Foram preparadas em banho de gelo as seguintes reações de PCR: Tubos 1-3: diferentes reações do template; Tubo 4: Controle positivo contendo amostra de referência fornecida pela Invitrogen (I-SAGE Control Template), Tubo 5: Controle negativo (“no template”) e Tubo 6: Controle negativo (“no ligase”). A cada um dos tubos foram acrescentados 29 µl de água-DEPC, 5 µl de “Tampão BV 10X”, 3 µl de DMSO, 7,5 µl de dNTP mix (10 mM cada), 2 µl de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores DTP1 e DTP2, além de 0,5 µl de Platinum Taq polimerase (Invitrogen). De cada amostra foi acrescentado 1 µl ao mix correspondente. No tubo 5 (no template) não foi acrescentada amostra. Amplificou-se utilizando os seguintes parâmetros de termociclagem: 92°C por 2 minutos, 27 ciclos de 92°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto e 70°C por 1 minuto, e extensão final a 70°C por 5 minutos.

Após o PCR analisou-se 10 µl de cada amostra num gel de 12% poliacrilamida para verificar a presença de DNA amplificado. A escolha da diluição a se utilizar no PCR em larga escala foi feita comparando-se visualmente as três diluições com a banda do I-SAGE control template. A diluição que mais se aproximou do controle foi escolhida para continuar o protocolo.

3.6.13 PCR em larga escala

Para cada µl de amostra foi acrescentado 29 µl de água-DEPC, 5 µl de “Tampão B0V 10X”, 3 µl de DMSO, 7,5 µl de dNTP mix (10 mM cada), 2 µl de

cada oligonucleotídeo iniciador DTP1 e DTP2 e 0,5 µl de Platinum Taq DNA polimerase. Acrescentou-se 50 µl da mistura aos poços de uma ou mais placas de PCR de 96-poços. Usaram-se os mesmos parâmetros de termociclagem utilizados na otimização dos ditags.

3.6.14 Eletroforese

Juntaram-se os produtos de PCR de cada poço em um tubo cônico de 50 ml estéril. Acrescentou-se um igual volume de fenol/clorofórmio ao tubo. Centrifugou-se a 2.400 X g por 10 minutos a temperatura ambiente e transferiu-se a fase aquosa a outro tubo cônico de 50 ml estéril. Aproximadamente 12,5 ml da amostra, acrescentou-se 3,2 ml de acetato de amônio 7,5 M, 72 µl de mussel glycogen e 22,8 ml de etanol 100%. Homogeneizando-se vigorosamente. Colocou-se o tubo em banho de gelo seco com etanol por 20 minutos e centrifugou-se a 12,000 g por 30 minutos a 4 °C. Removeu-se e descartou-se cuidadosamente o sobrenadante e lavou-se o sedimento duas a três vezes com 25 ml de etanol 70% resfriado. Removeu-se cuidadosamente o etanol remanescente e secou-se o sedimento em centrífuga a vácuo por 15-20 minutos até que não se visualizasse líquido no interior dos tubos. Ressuspendeu-se o sedimento em 300 µl de LoTE e incubou-se a 37 °C por 5-10 minutos para auxiliar na solubilização. Acrescentou-se 60 µl de “Tampão de Amostra TBE 6X” e aplicou-se aproximadamente 40 µl por poço num gel de poliacrilamida 12%, 1,5mm de espessura. A eletroforese foi feita até que o tampão de amostra contendo azul de bromofenol saísse do gel. Após a eletroforese, corou-se o

gel com 0,5 µg/ml brometo de etídio e visualizaram-se as bandas no gel sobre luz ultravioleta.

3.6.15 Eluição do DNA do gel

Tubos de microcentrífuga de 0,5 µl tiveram seu fundo perfurado com uma agulha de 18 Gauge previamente aquecida. Usando lâmina de bisturi estéril, excisou-se os fragmentos do gel contendo o produto de 100 pb. Cortou-se cada fragmento do gel em dois pedaços e colocou-se cada pedaço em um dos tubos de 0,5 µl de microcentrífuga perfurados. Colocou-se cada tubo de 0,5 µl dentro de um tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 µl e centrifugou-se à 14.000 g por 2-3 minutos. Após a centrifugação os tubos de 0,5 ml foram descartados. Preparou-se 150 µl de solução contendo LoTE e 7,5 M acetato de amônio (125:25), acrescentando a solução aos tubos de microcentrífuga de 1,5 ml contendo os restos de gel. Foi tomado cuidado para que todos os pedaços de gel estivessem cobertos de tampão. Homogeneizou-se vigorosamente e incubou-se a 65 °C por 2 horas para a eluição do DNA do gel. Transferiu-se o conteúdo para colunas S.N.A.P. acomodada ao tubo coletor. Centrifugou-se à 14.000 g por 2 minutos. Coletou-se o eluato (aproximadamente 150 µl) e combinou-se os eluatos oriundos da mesma amostra inicialmente aplicada no gel em um microtubo de 1,5 ml perfazendo volume de 300 µl. Foi feita a purificação do DNA como descrito no item 3.6.10. Cada sedimento foi ressuspenso em 14 µl de LoTE e então combinaram-se todas as amostras (aproximadamente 126 µl), que ficaram armazenadas a -20 °C durante a noite.

3.6.16 Clivagem com *Nla* III para a retirada dos adaptadores

Dividiu-se os 126 μ l da solução descrita no item anterior em três aliquotas de 42 μ l, em tubos de microcentrifuga estéreis. Acrescentaram-se os seguintes reagentes a cada tubo: 79 μ l de água-DEPC, 15 μ l de “Tampão 4 10X”, 2 μ l de 100X BSA e 12 μ l de *Nla* III. Homogeneizou-se vigorosamente o conteúdo e incubou-se a 37 °C por 1-2 horas, ajustando o volume de cada tubo para 200 μ l com LoTE.

3.6.17 Purificação dos fragmentos de DNA

Adicionou-se igual volume de solução eqüimolar de fenol/clorofórmio. ao Tubo B e homogeneizou-se vigorosamente e centrifugou-se à 14.000 g por 5 minutos à temperatura ambiente Transferiu-se a fase aquosa (aproximadamente 200 μ l) a um novo tubo e acrescentou-se 90 μ l de acetato de amônio 7,5M, 3 μ l de “mussel glycogen” e 850 μ l de etanol 100%. Homogeneizou-se vigorosamente e incubou-se em banho de gelo seco com etanol por 20 minutos e centrifugou-se à 14.000 g por 40 minutos à 4 °C. Removeu-se cuidadosamente o sobrenadante que foi descartado. Lavou-se o sedimento duas vezes com 1000 μ l de etanol 70%. Após a última lavagem, centrifugou-se novamente para coletar qualquer etanol residual. Após a lavagem final, removeu-se cuidadosamente o etanol e secou-se o sedimento em centrífuga a vácuo por 5-10 minutos, até que não se visualizasse líquido no interior dos tubos. Combinaram-se os sedimentos e ressuspendeu-se num volume total de 32 μ l usando LoTE.

3.6.18 Eletroforese

Acrescentou-se 7 μ l de “Tampão de Amostra TBE 6X” na amostra. Aplicou-se 13 μ l da amostra por poço em gel de poliacrilamida 12%. Foi feita a eletroforese até que o azul de bromofenol do tampão de amostra saísse do gel. Finda a eletroforese, corou-se o gel com 0,5 μ g/ml de brometo de etídio, visualizando as bandas sobre luz ultravioleta.

3.6.19 Eluição das bandas

Fez-se um furo no fundo do tubo de microcentrifuga estéril de 0,5 ml usando uma agulha de 18 gauge. Foram necessários dois tubos por canaleta no gel. Usando uma lâmina de bisturi nova, excisou-se o produto de 26 pb de uma linha do gel. Cortou-se a banda em dois pedaços e colocou-se cada um em um tubo de microcentrifuga de 0,5 ml preparado. Repetiu-se estes passos até que todas as bandas do gel fossem excisadas. Colocou-se o microtubo de 0,5 ml dentro de um microtubo de 1,5 ml estéril e centrifugou-se à 14.000 g por 2-3 minutos. As bandas excisadas foram quebradas em pedaços pequenos e coletadas nos microtubos de 1,5 ml. Descartaram-se os microtubos de 0,5 ml. Preparou-se 150 μ l de LoTE/7,5 M acetato de amônio (125:25). Acrescentou-se este mix aos microtubos contendo os pedaços de gel. Tomou-se cuidado para que todos os pedaços fossem cobertos pelo tampão. Misturou-se bem no vórtex. Incubou-se a 37°C por 2 horas para eluir o DNA do gel. Transferiu-se o conteúdo dos tubos a colunas S.N.A.P. acopladas a um tubo coletor. Centrifugou-se à 14.000 g por 2 minutos. Combinaram-se todos os eluatos. Aliquotou-se 200 μ l em tubos novos e continuou-se com a precipitação por etanol. Foi precipitado por etanol como

em 3.5.17. Juntaram-se e ressuspenderam-se os sedimentos em volume total de 7,75 µl de LoTE em gelo e acrescentou-se 1 µl de “Tampão da Ligase 10X” ao tubo. Procedeu-se imediatamente à reação de ligação.

3.6.20 Ligação dos ditags para a formação de concatâmeros

Preparou-se a reação de ligação em banho de gelo adicionando: 7,75 µl do DNA dos ditags de 26 pb, 1 µl de “Tampão da Ligase 10X” e 1,25 µl de T4 DNA Ligase. Incubou-se por 3 horas a 16 °C e uma vez terminado esse período de ligação, acrescentou-se 2 µl do “Tampão de Amostra TBE 6X” ao mix de ligação e aqueceu-se a 65 °C por 10 minutos, antes de proceder a eletroforese.

3.6.21 Eletroforese em gel preparativo

Centrifugou-se brevemente a solução contendo os ditags ligados a 14.000 g e aplicou-se a totalidade da solução em um único poço de um gel de poliacrilamida a 8%. A eletroforese foi conduzida até que todo o azul de bromofenol alcançasse entre $\frac{1}{2}$ e $\frac{3}{4}$ da distância da placa. Uma vez finda a eletroforese, corou-se o gel com 0,5 µg/ml de brometo de etídio e visualizaram-se as bandas sobre luz ultravioleta.

3.6.22 Eluição do DNA

Fez-se um buraco no fundo de um microtubo de 0,5 ml usando uma agulha de 18 gauge. Foram necessários 2 tubos por canaleta. Usando uma lâmina de bisturi nova, excisaram-se as seguintes regiões do gel: 300 pb – 500 pb, 500 pb – 800 pb e 800 pb – 1 kb. Cortou-se cada banda do gel em

dois pedaços e colocaram-se cada um dos pedaços em um tubo de 0,5 ml preparado. Colocou-se o microtubo de 0,5 ml dentro de um microtubo estéril de 1,5 ml e centrifugou-se à 14.000 g por 2-3 minutos. Descartaram-se os microtubos de 0,5 ml. Preparou-se 200 µl de um mix LoTE/7,5 M acetato de amônio (5:1) (167/33). Acrescentou-se este mix aos tubos contendo os géis. Tomou-se cuidado para que todos os pedaços de gel estivessem cobertos com o mix. Misturou-se bem no vórtex. Incubou-se a 65 °C por duas horas para eluir o DNA do gel. Transferiu-se o conteúdo dos tubos a uma coluna S.N.A.P. acoplada a um tubo coletor. Centrifugou-se na velocidade máxima por 2 minutos. Transferiu-se o eluato (cerca de 200 µl) de cada tubo para um microtubo novo e procedeu-se a precipitação por etanol como em 3.6.8. Ressuspendeu-se o sedimento em cada tubo com 6 µl LoTE.

3.6.23 Clonagem dos concatâmeros em vetor plasmidial

Preparação do plasmídio pZErO[®]-1

Para linearizar o vetor digeriu-se 2 µg do pZErO[®]-1 com a enzima de restrição *Sph* I conforme o seguinte protocolo: 19,1 µl de água estéril, 2 µl de pZErO[®]-1 (1µg/µl), 2,5 µl de 10 X Buffer 2 e 1,4 µl de *Sph* I. Incubou-se a 37°C por 30 minutos e posteriormente acrescentou-se 175 µl de LoTE à solução. Acrescentou-se igual volume de solução eqüimolar de fenol/clorofórmio e homogeneizou-se vigorosamente. Centrifugou-se à 14.000 g à temperatura ambiente. Transferiu-se a fase aquosa (200 µl) para tubo estéril de 1,5 ml. Acrescentou-se 65 µl de 7,5 M acetato de amônio e 600 µl de etanol 100%, homogeneizando vigorosamente. Incubou-se em banho de

gelo seco com etanol por 20 minutos e centrifugou-se à 14.000 g a 4 °C. Removeu-se e descartou-se cuidadosamente o sobrenadante. Lavou-se o sedimento duas vezes com 1 ml de etanol 70% resfriado e secou-se o mesmo em centrífuga a vácuo por 5-10 minutos. Ressuspendeu-se o sedimento em 60 µl de LoTE e avaliou-se a eficiência da digestão por eletroforese em gel de agarose. Foram analisados 2 µl da solução de digestão e alíquota do pZErO[®]-1 não digerido em gel de agarose 2%.

Ligação dos concatâmeros ao pZErO[®]-1

Preparou-se solução contendo os reagentes para a ligação em volume final de 10 µl em banho de gelo. Foram adicionados ao tubo de reação: 6 µl de solução de concatâmeros, 1 µl de PZErO[®]-1 clivado com *Sph* I, 1 µl de 19X Ligase Buffer e 2 µl de T4 DNA ligase. Foram conduzidos paralelamente controles do tipo “no DNA” (sem a amostra) e “no ligase” (sem amostra e a enzima T4 DNA ligase). Nestes últimos, o volume foi ajustado para 10 µl com água estéril. As amostras foram incubadas por 3 horas a 16 °C e tiveram volume ajustado para 200 µl com LoTE. Acrescentou-se igual volume de solução eqüimolar de fenol/clorofórmio a cada tubo e homogeneizou-se vigorosamente, seguida de centrifugação a 14.000 g à temperatura ambiente. Transferiu-se a fase aquosa superior (aproximadamente 200 µl) para tubo estéril e acrescentou-se 133 µl de 7,5 M acetato de amônio, 3 µl de mussel glycogen e 1 ml de etanol 100%, homogeneizando-se vigorosamente. As amostras foram incubadas em banho de gelo seco com etanol por 20 minutos, sendo em seguida centrifugadas a máxima velocidade a 4 °C por 40

minutos. Removeu-se e descartou-se cuidadosamente o sobrenadante. Lavou-se o sedimento quatro vezes com 1 ml de etanol 70% gelado e em seguida secou-se o mesmo em centrífuga a vácuo por 10-15 minutos. Ressuspendeu-se o sedimento em 12 µl de LoTE e procedeu-se à transformação.

3.6.24 Transformação das bactérias

Prepararam-se placas de meio *low salt* LB contendo 50 µg/ml do antibiótico Zeocina. Aqueceu-se as placas a 37°C por 30 minutos antes da transformação.

Para cada transformação foi necessário um tubo contendo bactérias competentes (One Shot® TOP10 Electrocomp™ *E. Coli*) e entre 2 e 3 placas de Petri com meio seletivo. Após descongelação, o meio SOC foi mantido a temperatura ambiente. Número suficiente de tubos contendo células competentes (One Shot® TOP10 Electrocomp™ *E. coli*) foram descongelados em banho de gelo para cada transformação. Resfriaram-se as cubetas de eletroporação em banho de gelo. Foram incluídos os seguintes controles: negativo (“no DNA”), “no ligase” e plasmídeo pUC18 supercoiled como controle positivo. Acrescentou-se 2 µl da reação de ligação em outro tubo contendo 50 µl de One Shot® TOP10 Electrocomp™ *E. coli* e homogenizou-se gentilmente. Transferiu-se cuidadosamente as células e o DNA para uma cubeta de eletroporação resfriada com capacidade para 0,1 cm. As amostras foram submetidas a eletroporação a 2500 V, sendo que imediatamente após a descarga elétrica acrescentou-se 1 ml de meio SOC na cubeta e transferiu-se todo o conteúdo da mesma para um tubo estéril. Incubou-se em agitador

orbital a 200 rpm a 37°C por 1 hora. Distribuiu-se 100 µl de cada transformação nas placas de Petri contendo o meio *low salt* LB adicionado de 50 µg/ml de Zeocina e incubou-se overnight a 37 °C em estufa. Foram preparadas uma ou duas placas de cada reação de transformação. O restante da reação de transformação foi armazenado a 4 °C. No próximo dia, todo o restante da reação de transformação foi diluído apropriadamente e distribuído em placas de Petri contendo o meio seletivo.

3.6.25 Análise dos clones recombinates por PCR em colônia

As placas foram removidas da estufa e tiveram suas colônias analisadas por PCR. Para cada colônia foi preparada a seguinte solução: 18 µl de água estéril, 2,5 µl de 10X BV Buffer, 1,25 µl de DMSO, 10 mM dNTP's, 1 µl de cada oligonucleotídeo iniciador (M13 forward 5 mM e M13 reverse 5 mM (Quadro 3) e 0,2 µl de Platinum *Taq* DNA Polimerase. Com o auxílio de uma ponteira de pipeta estéril, tocou-se gentilmente cada colônia resistente à Zeocina e mergulhou-se a ponteira no poço contendo a solução de PCR (25 µl) descrita acima. Este procedimento foi conduzido para determinar os intervalos de eficiência da reação de ligação observada em cada colônia. Os seguintes parâmetros foram empregados na reação de PCR: 2 minutos a 94°C, 24 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto e 70°C por 1 minuto, finalizando com extensão de 5 minutos a 70°C. Analisou-se 4 µl de cada amplificado em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo. Determinou-se o tamanho e a porcentagem de insertos presentes na biblioteca I-SAGE, sendo que em seguida calculou-se o número de tags de cada biblioteca (Quadro 4).

Seqüências dos oligonucleotídeos utilizados

M13 forward 5'- GTAAAACGACGGCCAG – 3'
 M13 reverse 5'- CAGGAAACAGCTATGAC – 3'

Quadro 3 Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores de M13

Cálculo para determinação do número de tags

1. Número total de tags por clone = tamanho do inserto/14 (tamanho do tag)
 2. Total de tags por clone X $\frac{\text{número de clones}}{\mu^*} = \frac{\text{número total de tags}}{\mu^*}$
 3. $\frac{\text{Número total de tags}}{\mu^*} \times \text{Número total de } \mu\text{l} = \text{Número total de tags por biblioteca}$
- μ^* = quantidade de μl utilizado no mix de ligação

Quadro 4 Cálculo para determinação do número de tags da biblioteca

3.7 Seqüenciamento do DNA

3.7.1 Preparação de fragmentos de DNA para o seqüenciamento

Inoculou-se cada colônia em 120 μl de meio SOB líquido com zeocina overnight. Após essa etapa, 2 μl do sobrenadante da cultura foram adicionados a 8,6 μl de água estéril, 1,5 μl de Tampão 10X, 1,5 μl de dNTP mix (1,25 mM cada), 0,5 μl de MgCl_2 50 mM, 0,35 μl de cada oligonucleotídeo iniciador (M13 Forward 5 pmol e M13 reverse 5 pmol) e 0,2 μl de Taq DNA polymerase. A mistura foi amplificada por PCR com os seguintes parâmetros de termociclagem: denaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de 94°C por 20 segundos, 58°C por 15 segundos e 72°C por 1 minuto.

3.7.2 Reação de seqüenciamento

A 1 µl do produto da reação de PCR foram acrescentados 9 µl de água estéril, 4 µl de solução contendo os reagentes para o seqüenciamento (Dynamic ET Dye Terminator, Amersham®) e 1 µl do oligonucleotídeo iniciador M13 forward. As condições de temperatura para a reação de polimerização foram de 94°C por 2 minutos e 35 ciclos de 94°C por 20 segundos, 57 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto.

3.7.3 Precipitação dos fragmentos com etanol e Leitura

Uma vez terminada a reação de seqüenciamento, as amostras foram purificadas por precipitação com etanol. Adicionou-se a cada poço contendo DNA referente a um plasmídeo seqüenciado, 2 µl de acetato de amônio 7,5 M e 50 µl de etanol. Homogenizou-se e incubou-se durante 20 minutos em banho de ao abrigo da luz. Centrifugou-se a 4.000 rpm por 40 minutos. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 100 µl de etanol 70% e centrifugou-se por 20 minutos a 4.000 rpm, descartando-se o sobrenadante lentamente. Centrifugou-se a placa invertida sobre papel toalha a 200 rpm por 6 segundos. Secaram-se as placas a 65 °C por aproximadamente 5 minutos e adicionou-se a cada poço 10 µl de tampão de amostra. Após a homogeneização, as placas foram armazenadas a 4°C ou submetidas imediatamente à leitura no equipamento MegaBACE 1200® (Amersham).

3.8 Bioinformática

3.8.1 Análise dos Tags

As seqüências foram submetidas ao programa Laika para análise em phred 20 e retirada das seqüências correspondentes ao vetor pZErO[®]-1. Em seguida, as seqüências editadas foram submetidas ao software eSAGE que extraiu e classificou os tags gerando tabela em formato MS Access. No MS Access 97, os tags de cada biblioteca foram comparados com banco de tags de bovinos (www.ncbi.nlm.nih.gov/sage), permitindo a identificação dos mesmos.

3.8.2 Comparação das bibliotecas

Novamente no software eSAGE os arquivos do MS Access representando as duas bibliotecas foram comparados e submetidos à análise estatística pelo método de AUDIC & CLAVERIE (1997). Os genes diferencialmente expressos foram considerados aqueles que apresentaram valor de $P < 0,05$.

3.8.3 Pesquisa da Ontologia

Todos os tags de cada biblioteca foram analisados pelo Software GOLIAS (Gene Ontology Library Analyser for SAGE - UNICAMP), que utiliza as ferramentas do Gene Ontology Consortium (www.geneontology.org) para pesquisar as ontologias de cada gene.

4 Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Observação da dinâmica folicular por ultra-sonografia transretal

As três bezerras pré-púberes *Bos primigenius indicus* (Nelore) foram observadas diariamente por ultra-sonografia transretal entre abril e julho de 2002. A título de ilustração, a Figura 10A apresenta o padrão de ondas de desenvolvimento folicular (apenas os folículos dominantes) de uma das bezerras pré-púberes. O diâmetro folicular máximo atingiu em torno de 8 e 9 mm cada onda folicular durou em torno de 9 dias e os folículos não culminam em ovulação.

Empregando a mesma metodologia, as três novilhas púberes *Bos primigenius indicus* (Nelore) foram observadas diariamente por ultra-sonografia transretal entre de julho de 2003 a janeiro de 2004. A Figura 10B ilustra o padrão de desenvolvimento das ondas foliculares (folículos dominantes) de uma das novilhas púberes. O diâmetro folicular máximo atingiu em torno de 14-15 mm de diâmetro, sendo que foram observadas três ondas que culminaram em ovulação (ondas 7, 10 e 13). Nessa figura também se observa a presença de um ciclo curto (ondas 6-7) que é característico de algumas novilhas voltam a ciclar depois de um período de anestro que se encontram em anestro por certo tempo.

Figura 10 Acompanhamento das ondas foliculares (folículos dominantes) por ultra-sonografia transretal de um animal Nelore pré-púbere (A) e púbere (B).

4.2 Purificação e Análise do RNA

Os RNAs dos folículos dominantes foram extraídos dos tecidos em etapa subsequente aos abates, que ocorreram em julho de 2002 (fêmeas do grupo 1) e outubro e novembro de 2003 (fêmeas do grupo 2).

Conforme pode ser observado na Figura 11 (A e B), o RNA apresentou-se íntegro, fato verificado pela presença das bandas de 28S e 18S de RNA ribossômico. O rastro presente entre as bandas e abaixo da banda de 18S corresponde ao RNAm, que é o alvo principal do nosso trabalho.

As amostras foram quantificadas em DO_{260} , sendo avaliado o índice DO_{260}/DO_{280} . Os resultados são demonstrados na Tabela 1.

FIGURA 11 Amostras de RNA total extraídas a partir do folículo dominante de bezerras pré-púberes (A) e novilhas púberes (B).

Tabela 1 Quantificação e Índice DO_{260}/DO_{280} dos RNAs extraídos de folículos ovarianos das bezerras pré-púberes e novilhas púberes.

Animal	Quantidade ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	DO_{260}/DO_{280}
Grupo 1 (bezerras pré-púberes)		
Nelore 03	3,50	1,883
Nelore 04	3,43	1,824
Nelore 07	5,45	1,821
Grupo 2 (novilhas púberes)		
Nelore 617	1,79	1,840
Nelore 633	2,37	1,811

4.3 Construção das bibliotecas SAGE

As duas bibliotecas SAGE utilizadas nesse experimentos foram construídas com sucesso, tendo sido cumpridas todas as etapas de verificação requeridas no protocolo original da técnica. Passaremos a descrever os resultados dessas etapas de verificação de tal sorte a fornecer subsídios sobre a atitude criteriosa adotada nesse experimento, uma vez que tratam-se de muitas etapas metodológicas até a obtenção das seqüências editadas dos tags e divergências do esperado nos controles poderiam levar-nos ao insucesso.

Inicialmente os RNAs totais foram ligados aos oligo(dT)s acoplados às partículas magnéticas para posterior síntese de cDNA (primeira fita e segunda fita). Para verificação da eficiência desta síntese, submeteu-se alíquota de 1 µl do cDNA recém sintetizado à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), tendo como região alvo fragmentos dos genes gliceraldeído fosfo-desidrogenase (GAPDH) e fator de alongamento (EF). Após a eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose 2%, conclui-se que o cDNA dos genes GAPDH e EF (genes sabidamente expressos em todos os tecidos corporais) estavam íntegros, tendo-se como base a visualização do fragmento esperado de 540 pb do GAPDH e 175 pb do EF (Figura 12). Dessa forma inferiu-se que a totalidade dos cDNAs da solução também apresentava-se intacto, permitindo o prosseguimento para a próxima etapa.

O cDNA ligado às partículas magnéticas foi então clivado com a enzima de restrição *Nla* III que reconhece sítios CATG. Dada a existência de um sítio CATG dentro do fragmento amplificado do gene GAPDH, presume-

se que após a clivagem do cDNA nesse ponto com subsequente amplificação por PCR com os oligonucleotídeos iniciadores específicos seja possível constatar a eficiência da clivagem pela *Nla* III. Observou-se a esperada não amplificação do gene GAPDH após o tratamento com *Nla* III (ausência da banda de 540 pb), o mesmo não ocorrendo com o gene EF, que não possui sítio CATG, sendo portanto amplificado normalmente conforme observado na Figura 13.

A eficiência da ligação dos cDNAs com os adaptadores A ou B foi aferida por reação de PCR utilizando-se o oligonucleotídeo iniciador EF antisense (que se hibridiza com o cDNA) e os oligonucleotídeos iniciadores DTP1 ou DTP2, complementares aos adaptadores A e B, respectivamente. A Figura 14 apresenta gel de agarose 2% indicando a presença do fragmento esperado de 453 pb nos poços 1 e 4 e ausência nos poços 2 e 3 não foram (resultado esperado). Esse resultado mostra que a ligação dos adaptadores A e B foi bem sucedida permitindo a continuação do processo de obtenção dos tags.

Figura 12 Verificação da síntese de cDNA. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. 1: padrão de peso molecular em escada de 100 pb. 2: cDNA amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores para o gene GAPDH (banda de 540 pb). 3: cDNA amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores para o gene Elongation Factor (EF) (banda de 275 pb).

Figura 13: Verificação da digestão pela *Nla* III. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. 1: padrão de peso molecular em escada de 100 pb. 2: cDNA amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores de GAPDH. 3: cDNA amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores de EF.

Em seguida os fragmentos de cDNA ligados na sua porção 3' aos oligo(dT)s aderidos às partículas magnéticas, e na porção 5' aos adaptadores A e B, foram clivados com a enzima de restrição *Bsm* FI, que reconhece a sequência GGGAC presente próxima à extremidade 3' do adaptador. Esta enzima apresenta a particularidade de reconhecer essa sequência específica e clivar o DNA 16 pares de bases adiante formando assim um “tag”, por isso chamada de “tagging enzyme”. Em sendo eficiente o processo, a clivagem libera a porção do cDNA ligada aos oligo(dT)s aderidos às partículas magnéticas. Como ferramenta de verificação da eficiência da clivagem, a amplificação por PCR do eventual material genético que possa ainda estar ligado às partículas magnéticas, simplesmente ressuspensas com o Tampão de Lavagem D, com os oligonucleotídeos iniciadores EF antisense e DTP1 ou DTP2 não deverá produzir fragmentos amplificáveis após o tratamento com a enzima. A Figura 15 mostra que a solução contendo as partículas magnéticas amplificadas com os primers EF antisense e DTP1 ou DTP2, não produziram os fragmentos esperados de 453 pb quando comparadas ao cDNA amplificado com os mesmos oligonucleotídeos iniciadores antes da digestão, sugerindo a eficiência do processo de digestão enzimática com *Bsm* FI.

Seqüencialmente, os tags ligados aos adaptadores foram submetidos à reação de polimerização do DNA com a enzima Klenow DNA polimerase, uma vez que a digestão com a enzima *Bsm* FI resulta em fragmentos com extremidades coesivas, sendo necessária a produção de extremidades cegas para a continuação do processo SAGE. Os dois tubos contendo os tags ligados aos adaptadores A e B respectivamente foram homogeneizados e

incubados durante a noite para que se procedesse a ligação dos tags e formação dos ditags. No dia seguinte foi realizada a amplificação por PCR com os oligonucleotídeos iniciadores DTP1 e DTP2 com diluições do material ligado, obtendo-se a amplificação dos ditags flanqueados com os adaptadores A e B. Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 12% corado com brometo de etídio (Figura 16).

O gel da Figura 16 mostra que as amostras (ditags) foram amplificadas de maneira quantitativa de acordo com a diluição das mesmas. A diluição mais próxima em intensidade à banda do I-SAGE control template foi a de 1/20. Esta diluição foi então escolhida para prosseguir com o PCR em larga escala, que consistiu em fazer múltiplas reações de PCR em placas de 96 poços. O resultado desta amplificação foi precipitado e submetido a gel de poliacrilamida a 12% corado com brometo de etídio (Figura 17).

A Figura 17 apresenta os fragmentos de 100 pb correspondentes aos ditags flanqueados pelos adaptadores e a banda de 80 pb corresponde aos adaptadores ligados entre si. As bandas de 100 pb foram recortadas, submetidas ao processo de eluição, precipitadas e digeridas novamente com a enzima *Nla* III para a retirada dos adaptadores. O resultado foi submetido a um gel de poliacrilamida 12% para a visualização dos ditags de 26 pb (Figura 18).

Figura 14 Verificação da eficiência de ligação dos adaptadores aos cDNAs. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. 1: cDNA ligado ao adaptador A e amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores EF antisense e DTP1. 2: cDNA ligado ao adaptador B e amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores EF antisense e DTP1. 3: cDNA ligado ao adaptador A e amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores EF antisense e DTP2. 4: cDNA ligado ao adaptador B e amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores EF antisense e DTP2. 5: marcador ϕ X174 RF DNA/*Hae* III.

Figura 15 Verificação da eficiência da clivagem com *Bsm* FI. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. 1: cDNA ligado ao adaptador A e amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores EF antisense e DTP1. 2: cDNA ligado ao adaptador B e amplificado com os oligonucleotídeos iniciadores EF antisense e DTP2. 3: partículas magnéticas amplificadas com os oligonucleotídeos iniciadores EF antisense e DTP1. 4: partículas magnéticas amplificadas com os oligonucleotídeos iniciadores EF antisense e DTP2. 5: marcador ϕ X174 RF DNA/*Hae* III.

Figura 16 Otimização da amplificação dos ditags por PCR. Gel de poliacrilamida 12% corado com nitrato de prata. 1: No template. 2: No ligase. 3: padrão de peso molecular em escada de 100 pb. 4: amostra (ditags) diluição 1/20. 5: amostra (ditags) diluição 1/40. 6: amostra (ditags) diluição 1/80. 7: I-SAGE control template. Todas as amostras foram amplificadas empregando os oligonucleotídeos iniciadores DTP1 e DTP2.

Figura 17 Gel de poliacrilamida 12% corado com brometo de etídio. 1: padrão de peso molecular em escada de 100 pb.. 2-11: amostras (ditags de 100 pb) amplificadas com os oligonucleotídeos iniciadores DTP1 e DTP2.

Figura 18 Gel de poliacrilamida 8% corado com brometo de etídio. 1 e 5: padrão de peso molecular em escada de 25 pb. 2-4: amostras (ditags de 26 pb).

A Figura 18 mostra as bandas de 26 pb (ditags sem os adaptadores), sendo que outras bandas são correspondentes a digestões parciais pela enzima *Nla* III. As bandas de 26 pb foram recortadas, eluídas, precipitadas e o DNA eluído foi submetido a reação de ligação com a enzima T4 DNA ligase a fim de produzir os concatâmeros (ditags separados entre si por seqüências CATG).

Os concatâmeros foram então submetidos a gel de poliacrilamida 8% para a visualização, sendo o resultado mostrado na Figura 19 onde se observa rastro que vai desde 100 pb até cerca de 1 Kb, indicando a geração de concatâmeros na faixa esperada de comprimento.

Foram recortadas do gel três regiões distintas: entre 300 e 500 pb, entre 500 e 800 pb e acima de 800 pb. As regiões recortadas foram eluídas e precipitadas tornando-se preparadas para a clonagem.

Preparou-se então o plasmídeo pZeRO da seguinte forma: linearizou-se o mesmo com a enzima *Sph* I que produz extremidades compatíveis com as geradas pela *Nla* III (como é o caso dos concatâmeros). Para verificação se o plasmídeo estava linearizado comparou-se o mesmo com o plasmídeo não linearizado em gel de agarose 2%. A forma linear apresentou uma banda ligeiramente mais alta (correspondente a 2,8 Kb) do que a do plasmídeo não linearizado (Figura 20).

A Figura 20 mostra que o plasmídeo foi linearizado, permitindo o prosseguimento do experimento com a ligação do mesmo com os concatâmeros, novamente utilizando a enzima T4 DNA ligase.

Figura 19 Visualização do tamanho e qualidade dos concatâmeros. -Gel de poliacrilamida 12% corado com brometo de etídio. 1 e 3: padrão de peso molecular em escada de 100 pb. 2: Amostra (concatâmeros).

Figura 20: Verificação da eficiência de linearização do plasmídeo pZeRO[®]. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. 1: peso de 1 Kb 2: plasmídeo pZeRO[®] não linearizado. 3: plasmídeo pZeRO[®] linearizado com a enzima *Sph* I.

Foram preparadas reações de ligação do plasmídeo com as 3 faixas de tamanho de concatâmeros (300-500 pb, 500-800 pb e maiores do que 800 pb, controle negativo sem DNA, controle negativo sem ligase e plasmídeo controle PUC). 2 µl de cada reação de ligação foram transformadas com 50 µl da solução de bactérias competentes. Logo após a eletroporação a 2500 V, 1 ml do meio de cultura SOC foi acrescentado a cada reação, incubando-se sob agitação (200 rpm) por 1 hora a 37°C. Em seguida, 100 µl de cada reação foram plaqueados em placas contendo meio seletivo LB sólido adicionado de zeocina e incubadas “overnight” em estufa a 37°C. No dia seguinte, o número de colônias presentes em cada placa foi contado. As placas controle não apresentaram colônias visíveis. As placas dos concatâmeros apresentaram grande número de clones, permitindo a realização de PCR de colônia em uma amostragem de cada intervalo de tamanho dos concatâmeros para avaliar a porcentagem de clones com inserto. Com base nesses números chegou-se ao tamanho efetivo de cada biblioteca: 60.732 tags para a biblioteca dos folículos ovarianos das bezerras pré-púberes e 3.342.883 tags na biblioteca dos folículos ovarianos das novilhas púberes.

4.4 Seqüenciamento e Análise dos tags

Foram seqüenciados 2.208 clones da biblioteca dos folículos ovarianos das bezerras pré-púberes e 1.152 clones da biblioteca dos folículos ovarianos das novilhas púberes. Estas seqüências foram submetidas ao programa eSAGE e geraram 14.531 e 14.285 tags (biblioteca dos folículos ovarianos das bezerras pré-púberes e das novilhas púberes, respectivamente), sendo que 6.840 genes estão representados na primeira e 6.386 genes na última. Estes tags foram comparados com um banco de tags de bovinos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sage>) utilizando tabela do MS Access. A porcentagem de tags que corresponderam a genes conhecidos de *Bos taurus* foi de 26,8% e 28,5%, de *Homo sapiens* e outros organismos, de 38,4% e 37,8% e de genes sem correspondência (no match), 34,8% e 33,7% (biblioteca dos folículos ovarianos de bezerras pré-púberes e biblioteca dos folículos ovarianos de novilhas púberes, respectivamente) (Figura 21).

Figura 21 Distribuição dos tags de acordo com a homologia. A: Biblioteca dos folículos ovarianos das bezerras pré-púberes (FOL); B: Biblioteca dos folículos ovarianos das novilhas púberes (LOF).

Em seguida foi feita a comparação entre as duas bibliotecas utilizando-se novamente o software eSAGE. Os tags diferencialmente expressos estão sumarizados nas Tabelas 2 (tags diferencialmente expressos mais abundantes nas bezerras pré-púberes, FOL) e 3 (tags diferencialmente expressos mais abundantes nas novilhas púberes, LOF). Foram considerados como diferenças significantes os resultados que apresentam valores de $P < 0,05$.

Os genes mais expressos em ambos os tecidos (expressão superior a 0,5%) estão representados na Tabela 4. Vários deles apresentaram expressão diferencial que foi assinalada em vermelho ou azul. A Figura 22 ilustra a classificação dos 15 genes mais expressos em cada biblioteca de acordo com a posição em que ocupam.

Alguns grupos de genes foram selecionados pela sua importância reconhecida na reprodução. São eles os genes envolvidos com a atividade esteroidogênica (Figura 23), genes envolvidos com a degradação da matriz extracelular (Figura 24), genes que codificam fatores de crescimento (Figura 25) e genes das proteínas ligadoras ao IGF (Figura 26). Os genes assinalados com um asterisco apresentam diferenças estatisticamente significantes entre as bibliotecas ($P < 0,05$). Outros genes importantes na reprodução, como os receptores de LH, FSH e estrógeno, a ativina, a inibina e a folistatina não foram encontrados nas bibliotecas, apesar da presença do tag correspondente aos mesmos no banco de dados utilizado como referência.

Tabela 2 Genes mais abundantes na Biblioteca das bezerras pré-púberes (FOL) dentre os diferencialmente expressos

Tag	FOL	LOF	Valor de P	Identificação*
TTCAGCTCCA	26	1	1,631E-07	Transcribed locus, moderately similar to NP_114031.2 dipeptidylpeptidase 7 [Mus musculus]
CCGGACCTCT	38	7	1,283E-06	LAMR1 Laminin receptor 1 (ribosomal protein SA, 67 kDA)
TCCCGTACAT	19	0	1,545E-06	
TCGGTCTGGG	63	22	4,044E-06	RPS2 Ribosomal protein S2
TTGCATTACC	32	6	1,062E-05	Transcribed locus, weakly similar to NP_002718.2 proteoglycan 1, secretory granule [Homo sapiens]
AGACAGACAG	71	30	2,389E-05	EEF1A1 Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1
CTGAACATCT	27	5	5,152E-05	RPLP0 Ribosomal protein, large, P0
CCCCGTACAT	14	0	5,243E-05	
TTGGCTGCCC	35	10	0,0001171	RPS14 Ribosomal protein S14
TGGTGTTGAG	29	8	0,0003705	RPS18 Ribosomal protein S18
GATACCTAGT	66	34	0,0009046	
CCCAGCCACT	25	7	0,0010724	POMC Proopiomelanocortin [adrenocorticotropin] [beta-lipotropin] [alpha-melanocyte stimulating hormone] [beta-melanocyte stimulating hormone] [beta-endorphin]
TAGCGGGTGC	12	1	0,0016262	
TCCGTGCACC	34	13	0,0016315	Transcribed locus, highly similar to NP_112372.1 ribosomal protein S11 [Rattus norvegicus]
TCCCCTACAT	9	0	0,0017786	
CCTACTATCT	34	14	0,003001	Transcribed locus, weakly similar to XP_375527.2 hypothetical protein LOC339290 [Homo sapiens]
CACAAACAGT	61	34	0,0040024	Transcribed locus, highly similar to XP_370878.1 KIAA2002 protein [Homo sapiens]
GACGACACGA	34	15	0,005264	RPS28 Ribosomal protein S28
ATCCTGAAGC	10	1	0,0057694	Transcribed locus, highly similar to NP_000225.1 ligase I, DNA, ATP-dependent [Homo sapiens]
ATCCTGAAGC	10	1	0,0057694	Transcribed locus, highly similar to NP_150254.1 ribosomal protein L13 [Homo sapiens]
GCAACAGGAG	10	1	0,0057694	RAB7 RAB7, member RAS oncogene family
AGTGCACGTG	12	2	0,0066239	Transcribed locus, highly similar to NP_003661.1 basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2 [Homo sapiens]
ACGAACCTGG	7	0	0,0072825	Transcribed locus, highly similar to XP_237641.2 hypothetical gene supported by NM_031969; AF178845 [Rattus norvegicus]
TTCCCGTACA	7	0	0,0072825	

Continuação da Tabela 2

Tag	FOL	LOF	Valor de P	Identificação*
GTGTATGGAT	11	2	0,0117391	MGP Matrix Gla protein
CTTCTGGACA	6	0	0,0147362	Transcribed locus, highly similar to NP_937895.1 gelsolin (amyloidosis, Finnish type) [Homo sapiens]
CATTTTCCAC	6	0	0,0147362	GSTA2 Glutathione S-transferase A2
TCCGGGATGC	6	0	0,0147362	Transcribed locus, highly similar to NP_001015.1 ribosomal protein S21 [Homo sapiens]
AGATCTATAC	14	4	0,0171736	Transcribed locus, highly similar to NP_000962.2 ribosomal protein L7 [Homo sapiens]
GTGAAGGTAG	69	45	0,0182539	RPS3A Ribosomal protein S3A
AAGAAAATAG	12	3	0,0192633	Transcribed locus, highly similar to NP_079940.2 sorting nexin 9 [Mus musculus]
CCCACAAGGT	17	6	0,0199663	RPL27 Similar to ribosomal protein L27
CCTGTCCGTG	5	0	0,0298189	WDR1 WD repeat domain 1
ACCTCCATAG	5	0	0,0298189	
TAGCTCTATG	5	0	0,0298189	
ACAGTGCCAG	5	0	0,0298189	TPT1 Tumor protein, translationally-controlled 1
GGATTTCCCA	5	0	0,0298189	MHC class I-like family A1 (MHCLA1)
ACAAATGATA	5	0	0,0298189	Transcribed locus, highly similar to NP_081207.1 RIKEN cDNA 1810011O10 gene [Mus musculus]
GGATTTCCCA	5	0	0,0298189	Transcribed locus, moderately similar to NP_005116.1 copper chaperone for superoxide dismutase [Homo sapiens]
GCGACGGCTA	11	3	0,0321999	Transcribed locus, highly similar to NP_001950.1 eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2 [Homo sapiens]
GAGGCGGTCC	11	3	0,0321999	IFITM3 Interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)
AAGGAGATGG	35	20	0,0365262	Transcribed locus, weakly similar to NP_795975.1 RIKEN cDNA 9130023H24 gene [Mus musculus]
AAGGAGATGG	35	20	0,0365262	Transcribed locus, highly similar to NP_071951.1 ribosomal protein L31 [Rattus norvegicus]
GGCTTGCGCA	7	1	0,036751	Transcribed locus, moderately similar to NP_002880.1 retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2 [Homo sapiens]
ATTGCTGTAA	7	1	0,036751	
TTGCTTTTGG	7	1	0,036751	Transcribed locus, highly similar to NP_077065.1 ADP-ribosylation factor 4 [Rattus norvegicus]
ATTCTTTGGT	89	72	0,04	Transcribed locus, highly similar to XP_213448.1 ribosomal protein L23 [Rattus norvegicus]
ACCGTGCGCA	12	4	0,0448358	Transcribed locus, highly similar to XP_341789.1 ribosomal protein S5 [Rattus norvegicus]
CAGAACTACG	18	8	0,0464149	IFITM3 Interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)
GGCAAGCCCC	67	47	0,0473547	Transcribed locus, highly similar to NP_112327.1 ribosomal protein L10A [Rattus norvegicus]

*Os dados foram mantidos na Língua Inglesa para assegurar a fidelidade da informação

Tabela 3 Genes mais abundantes na Biblioteca das novilhas púberes (LOF) dentre os diferencialmente expressos.

Tag	FOL	LOF	Valor de P	Identificação*
GATTCCTAGT	1	40	3,105E-11	Transcribed locus, highly similar to NP_036555.1 ribosomal protein L13a [Homo sapiens]
TGGGCGACTT	17	69	1,548E-08	Transcribed locus, moderately similar to NP_001839.1 collagen, type VI, alpha 1 [Homo sapiens]
GCAAGATGCT	0	24	7,956E-08	Transcribed locus, moderately similar to NP_116010.1 brain expressed X-linked 2 [Homo sapiens]
GGCTTCGGCT	35	95	1,916E-07	RPLP2 Ribosomal protein, large P2
ACCAAAAACC	8	43	6,145E-07	LOC404067 Similar to pro alpha 1(I) collagen
AATAAAAACA	7	36	7,524E-06	TIMP2 Tissue inhibitor of mettaloproteinase 2
TGAGAACATT	24	65	1,787E-05	LOC404122 Hypothetical protein LOC404122
TTGATGTTTG	4	23	0,0002276	CYP19 Cytochrome P450, family XIX (conversion of androgen to estrogen), aromatase
AAGGCAATAA	2	18	0,0002698	CYP11A1 Cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1
TAAGGATCCA	44	87	0,0002704	Transcribed locus, highly similar to NP_037356.1 ribosomal protein S26 [Rattus norvegicus]
GACCCCTGAG	3	19	0,000596	Immunoglobulin light chain
TTTGACACCTT	2	16	0,0008684	CTGF Connective tissue growth factor
TAAATGTGCA	2	16	0,0008684	Transcribed locus
AGTGCATAAG	15	40	0,0009346	Transcribed locus, moderately similar to NP_003964.2 ribosomal protein L14 [Homo sapiens]
TGCACATTTT	33	67	0,0009749	hypothetical protein FLJ31978, Homo sapiens polymerase (DNA directed) kappa (POLK) gene,
ACAGGAGTCA	0	10	0,0011089	STAR Steroidogenic acute regulatory protein
GGGTGGGGTG	2	15	0,0015464	Transcribed locus, moderately similar to NP_059132.1 alpha 1,4-galactosyltransferase [Homo sapiens]
GTAACGGCGA	2	14	0,0027378	Transcribed locus, highly similar to NP_996261.1 hypothetical protein LOC284361 [Homo sapiens]
ACAACACATA	164	243	0,005	
GGCTTTGGTC	154	205	0,005	CDK5R1 Cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)
TGACACGTAT	83	112	0,005	
CTCACCAATA	65	104	0,005	RPL10 Ribosomal protein L10
CCACTAACTC	7	22	0,006329	CLU Clusterin
TGTGTCTGTA	27	52	0,006682	LOC404053 Similar to alpha-tubulin isoform 1
TATGACTTAA	1	10	0,0071368	RAC1 Rho family, small GTP binding protein Rac1
CGGTGTCTGC	2	12	0,0084113	
GGTGTAGTTA	2	12	0,0084113	Transcribed locus, moderately similar to XP_375024.1 UTP14, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog C (yeast) [Homo sapiens]
TGGATCTGCA	0	7	0,0085688	Transcribed locus, highly similar to NP_003011.1 secretory granule, neuroendocrine protein 1 (7B2 protein) [Homo sapiens]

Continuação da Tabela 3

Tag	FOL	LOF	Valor de P	Identificação*
GGACCACTTA	22	44	0,0089278	Rpl3 Ribosomal protein L3
TGTTCTGGAG	12	29	0,0098517	GJA1 Gap junction protein, alpha 1, 43 kD (connexin 43)
CAAACCTCTTG	73	132	0,01	SPARC Secreted protein, acidic, cysteine-rich [osteonectin]
GGATTGCAAG	1	9	0,0130263	
TACTCTTGGC	3	13	0,0145147	Transcribed locus, highly similar to NP_796275.2 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L [Mus musculus]
TGGCCAGCTA	2	11	0,0145715	Transcribed locus, highly similar to NP_955805.1 steroid sensitive gene 1 [Homo sapiens]
TTCAAGTGAA	0	6	0,0169408	Transcribed locus, highly similar to NP_077745.2 tropomyosin 1, alpha [Mus musculus]
GCGGGAGGGGA	0	6	0,0169408	
TGAAGGCCAG	0	6	0,0169408	
TTCAAGTGAA	0	6	0,0169408	Transcribed locus, moderately similar to NP_005591.1 nitrilase 1 [Homo sapiens]
TGGACCAGAG	0	6	0,0169408	Transcribed locus, moderately similar to NP_062097.1 regulator of G-protein signaling 9 [Rattus norvegicus]
AGTGCATAAG	15	40	0,0009346	Transcribed locus, moderately similar to NP_003964.2 ribosomal protein L14 [Homo sapiens]
GGTACCGAAG	0	6	0,0169408	Transcribed locus, highly similar to NP_034697.1 inositol polyphosphate phosphatase-like 1 [Mus musculus]
GAACGCCTAA	0	6	0,0169408	Transcribed locus, highly similar to XP_341343.1 dihydropyrimidinase-like 2 [Rattus norvegicus]
TTAAACCTCA	0	6	0,0169408	Transcribed locus, highly similar to NP_112740.1 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like [Homo sapiens]
GGAGAGGATG	0	6	0,0169408	COL1A2 Collagen, type I, alpha 2
GCGGGCCTGC	0	6	0,0169408	Transcribed locus, weakly similar to XP_323450.1 Neurospora crassa NCU04110.1 gene
TACAGTTCAT	0	6	0,0169408	Transcribed locus, moderately similar to NP_080709.1 RIKEN cDNA 1810057C19 gene [Mus musculus]
TACATAATCA	0	6	0,0169408	Transcribed locus, moderately similar to XP_341998.1 latent transforming growth factor beta binding protein 3 [Rattus norvegicus]
TACAATTTTT	10	24	0,0200414	Transcribed locus, highly similar to NP_003570.1 RAD54-like (S. cerevisiae) [Homo sapiens]
CGGGGGCTCG	1	8	0,0236114	CTSD Cathepsin D (lysosomal aspartyl protease)
GCAAAAAAAA	1	8	0,0236114	APOE Apolipoprotein E
GCAAAAAAAA	1	8	0,0236114	Transcribed locus, highly similar to NP_859530.1 LAG1 longevity assurance homolog 2 (S. cerevisiae) [Homo sapiens]
GTGGAAGTGA	9	22	0,0238262	ST3GAL-IV Alpha2,3-sialyltransferase

Continuação da Tabela 3

Tag	FOL	LOF	Valor de P	Identificação*
AACAGGTCCC	43	67	0,0305349	IBSP Integrin-binding sialoprotein (bone sialoprotein, bone sialoprotein II)
TAGTCCAGAA	0	5	0,0334926	Transcribed locus, highly similar to NP_954635.1 aminolevulinate, delta-, synthase 1 [Homo sapiens]
AACATTTAAA	0	5	0,0334926	COL1A2 Collagen, type I, alpha 2
TACTCAAATG	0	5	0,0334926	SDF1 Stromal cell-derived factor 1
TGAGCCATAG	0	5	0,0334926	Transcribed locus, highly similar to NP_036121.1 COP9 (constitutive photomorphogenic) homolog, subunit 3 (Arabidopsis thaliana) [Mus musculus]
CACATTCGCT	0	5	0,0334926	Transcribed locus, highly similar to NP_114405.1 STARD3 N-terminal like [Homo sapiens]
ACTTCTATAG	0	5	0,0334926	
GTTCCCGGGA	0	5	0,0334926	Transcribed locus, highly similar to NP_032148.1 gap junction membrane channel protein alpha 7 [Mus musculus]
GGTACCGAAG	0	6	0,0169408	Transcribed locus, highly similar to NP_034697.1 inositol polyphosphate phosphatase-like 1 [Mus musculus]
GAACGCCTAA	0	6	0,0169408	Transcribed locus, highly similar to XP_341343.1 dihydropyrimidinase-like 2 [Rattus norvegicus]
TTAAACCTCA	0	6	0,0169408	Transcribed locus, highly similar to NP_112740.1 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like [Homo sapiens]
GTGCTGTGTG	0	5	0,0334926	ATP5H ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit d
AAGAACAAGT	0	5	0,0334926	ACTR3 ARP3 (actin-related protein 3, yeast) homolog
GAAATCTATT	0	5	0,0334926	Transcribed locus, highly similar to NP_006797.3 BTG family, member 3 [Homo sapiens]
GCTTCAGAAA	0	5	0,0334926	SULT1A1 Sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 1
GTGACTTCAC	0	5	0,0334926	EED Embryonic ectoderm development protein
CCACTCCTAA	0	5	0,0334926	Transcribed locus, highly similar to NP_620265.1 defender against cell death 1 [Rattus norvegicus]
GAAGCAGGAC	22	39	0,0376507	Transcribed locus, highly similar to NP_005498.1 cofilin 1 (non-muscle) [Homo sapiens]
TTGGCAAAC	33	53	0,0409964	Transcribed locus
CATATTTGGG	33	53	0,0409964	FTH1 Ferritin, heavy polypeptide 1
CAGTCTGACC	1	7	0,0424459	Transcribed locus, moderately similar to NP_742035.1 glutathione S-transferase, mu 5 [Rattus norvegicus]
GAGGAAGGAG	1	7	0,0424459	MYLK Myosin, light polypeptide kinase
ACCTGAAAAA	1	7	0,0424459	Transcribed locus
GCAGAGGGAG	1	7	0,0424459	Transcribed locus, moderately similar to NP_004372.3 cAMP responsive element binding protein-like 1 [Homo sapiens]
AGAGGCAGCT	1	7	0,0424459	Transcribed locus, highly similar to NP_001545.2 cysteine-rich, angiogenic inducer, 61 [Homo sapiens]
ACCTGAAAAA	1	7	0,0424459	VIA L Cytochrome-c oxidase

Continuação da Tabela 3

Tag	FOL	LOF	Valor de P	Identificação*
TGTCGTAATA	2	9	0,0424736	Transcribed locus, highly similar to XP_243637.2 similar to Fbln1 protein [Rattus norvegicus]
GACCCCTTTT	5	14	0,0468194	ACTB Actin, beta
GGGATGAACA	5	14	0,0468194	Transcribed locus, highly similar to NP_001226.2 serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1) [Homo sapiens]
GGCAAGCCCC	67	47	0,0473547	Transcribed locus, highly similar to NP_112327.1 ribosomal protein L10A [Rattus norvegicus]
AATTGGAGGA	9	20	0,0497046	

*Os dados foram mantidos na Língua Inglesa para assegurar a fidelidade da informação

Tabela 4 Genes com expressão superior ou igual a 0,5% do total dos tags nas bibliotecas das bezerras pré-púberes (FOL) e das novilhas púberes (LOF)

Tag	FOL	LOF	Identificação*
GCCTGATGGG	257	261	RPL21 Ribosomal protein L21
ACAACACATA	164	243	
TAGGTTGTCT	158	156	TPT1 Tumor protein, translationally-controlled 1
GGCTTTGGTC	154	205	AP3D1 Adaptor-related protein complex 3, delta 1 subunit
GCAGAGCTTT	114	117	LOC404068 Similar to protein kinase C receptor
CTGGGAAATT	106	105	ORF protein
ATTCTTTGGT	89	72	Transcribed locus, highly similar to XP_213448.1 ribosomal protein L23 [Rattus norvegicus]
TGACACGTAT	83	112	
CAAACCTCTTG	73	132	SPARC Secreted protein, acidic, cysteine-rich [osteonectin]
GCCGGCCCCGG	73	69	Transcribed locus, highly similar to NP_054894.1 mitochondrial ribosomal protein L15 [Homo sapiens], highly similar to NP_058847.1 ribosomal protein S15 [Rattus norvegicus]
AGACAGACAG	71	30	EEF1A1 Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1
CTCACCAATA	65	104	RPL10 Ribosomal protein L10
AAGCCCAGCG	59	80	Transcribed locus, highly similar to XP_341816.1 ribosomal protein S16 [Rattus norvegicus]
TAAGGATCCA	44	87	Transcribed locus, highly similar to NP_037356.1 ribosomal protein S26 [Rattus norvegicus]
GGCTTCGGCT	35	95	RPLP2 Ribosomal protein, large P2

*Os dados foram mantidos na Língua Inglesa para assegurar a fidelidade da informação

Vermelho: genes mais expressos nas bezerras pré-púberes

Azul: genes mais expressos nas novilhas púberes

Figura 22 Representação esquemática do comportamento dos quinze tags mais expressos em ambas as bibliotecas de acordo com a posição que ocupam. Os tags estão representados por suas siglas. Cores iguais indicam o mesmo tag.

Figura 23 Níveis de expressão (em número de tags) dos genes envolvidos com a atividade esteroidogênica. * $P < 0,001$

Figura 24 Níveis de expressão (em número de tags) dos genes envolvidos com a degradação da matriz extracelular. * $P < 0,001$

Figura 25 Níveis de expressão (em número de tags) dos genes de fatores de crescimento. * $P < 0,001$

Figura 26 Níveis de expressão (em número de tags) dos genes das proteínas ligadoras ao IGF.

Foi pesquisada a ontologia de cada gene no sítio www.geneontology.org com o auxílio do software GOLIAS (Gene Ontology Library Analyser for Sage - UNICAMP). Como não existem dados suficientes disponíveis no banco público para associar os tags de bovinos a um número Gene Ontology (GO), a análise foi feita a partir dos tags correspondentes humanos. Como a homologia entre o banco de tags de bovinos e o banco de tags de humanos é de apenas 53,5%, cerca de 46,6% dos tags de cada biblioteca constituíram seqüências *no match* e não puderam ser analisados.

Cada gene foi classificado de acordo com três critérios: processo biológico, componente celular e função molecular. Cada um destes foi subdividido em várias outras categorias (Nível 1 de detalhamento). Os resultados estão expressos nas Figuras 28-30. Com maior nível de detalhamento foram analisados os genes diferencialmente expressos. Cada gene e suas ontologias se encontram na Tabela 5.

Figura 27 Ontologias (Processo Biológico) dos genes da biblioteca das bezerras pré-púberes (FOL; A) e da biblioteca das novilhas púberes (LOF; B). Os dados foram mantidos na Língua Inglesa para assegurar a fidelidade da informação.

Figura 28 Ontologias (Componente Celular) dos genes da biblioteca das bezerras pré-púberes (FOL; A) e da biblioteca das novilhas púberes (LOF; B). Os dados foram mantidos na Língua Inglesa para assegurar a fidelidade da informação.

Figura 29 Ontologias (Função Molecular) dos genes da biblioteca das bezerras pré-púberes (FOL; A) e da biblioteca das novilhas púberes (LOF; B). Os dados foram mantidos na Língua Inglesa para assegurar a fidelidade da informação.

Tabela 5 Ontologias dos genes diferencialmente expressos (por ordem alfabética)

Identificação*	Ontologia
ACTB Actin, beta	citoesqueleto
ACTR3 ARP3 (actin-related protein 3, yeast) homolog; actin cortical patch , actin filament polymerization , Arp2/3 protein complex , establishment and/or maintenance of cell polarity ,	Complexo da proteína Arp2/3, motilidade celular, citoesqueleto, lamelipódio, “actin cortical patch”, complexo da polimerização do filamento da actina, da proteína Arp2/3, o estabelecimento e/ou a manutenção da polaridade celular, ligação a proteínas, ligação à actina, organização do filamento da actina, constituinte estrutural do citoesqueleto
AP3D1 Adaptor-related protein complex 3, delta 1 subunit	Apresentador de antígeno, antígeno exógeno lipídico, processamento de antígeno, Golgi trans face, transporte protéico intracelular, regulação positiva da diferenciação de células T Natural Killer, transporte mediado por vesículas
APOE Apolipoprotein E	espaço extracelular, tem papel na emulsificação e transporte de lipídeos
ARBP Acidic ribosomal phosphoprotein P0	diferenciação de adipócito, desenvolvimento cerebelar, ligação à cromatina, desenvolvimento, ligação ao DNA, replicação do DNA, desenvolvimento embrionário (sensu Mammalia), desenvolvimento do tubo cardíaco embrionário, hematopoiese embrionária, desenvolvimento da placenta embrionária, “mediator complex”, organogênese, regulação positiva da transcrição do promotor da Pol II, ligação à proteína, regulação da transcrição dependente de DNA, geração de hormônios tireoidianos, transcrição de coativador, transcrição do promotor da Pol II
ARPC1B Actin related protein 2/3 complex, subunit 1B, 41kDa	Complexo da proteína Arp2/3, atividade do receptor da adenosina A1acoplada a proteína G, atividade da adenosina deaminase, metabolismo da adenosina, “branched-chain-amino-acid transaminase activity”, atividade da peptidase, regulação do ciclo circadiano dormir/acordar, sono, transmissão sináptica, sinaptossomo, atividade da transferase, transferência de grupos pentosil
ATP1A1 Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 1 polypeptide	Componete celular: fração da membrana, complexo de troca sódio:potássio ATPase, Função molecular: atividade de troca sódio:potássio ATPase, Processo Biológico: hidrólise de ATP acoplado ao transporte de próton, homeostase do íon de hidrogênio, transporte de íon potássio, transporte de íon sódio, mobilidade espermáticas
ATP5H ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit D	mineralização óssea, atividade carboxilesterase, ligação à enzima, atividade do receptor do fator de crescimento do fibroblasto, via de sinalização da proteína G acoplada ao receptor, atividade do receptor GABA-A, atividade do gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, catabolismo do glicosfingolipídio, atividade de transporte do íon hidrogênio, integrante de membrana, percepção sonora, ligação à proteína, complexo de síntese de ATP próton-transporte (sensu Eukaryota), regulação da apoptose, resaposta ao stress oxidativo, ativador da atividade de transcrição, tradução

Continuação da Tabela 5

Identificação*	Ontologia
CDK5R1 Cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)	Ativador da atividade da proteína kinase 5 ciclo-dependente, complexo ativador da proteína kinase 5 ciclo-dependente, ligação à proteína do citoesqueleto, fração de membrana, ligação à proteína
CLU Clusterin	Espaço extracelular
COL1A2 Collagen, type I, alpha 2	Espaço extracelular
COL1A2 Collagen, type I, alpha 2	Espaço extracelular
CTGF Connective tissue growth factor	angiogênese, condensação de cartilagem, diferenciação celular, migração celular, adesão à matriz celular, extracelular, matriz extracelular (sensu Metazoa), espaço extracelular, via de sinalização ao receptor do fator de crescimento do fibroblasto, ligação à heparina, ligação à integrina, via de sinalização mediado pela integrina, ossificação, adesão celular, cascata de sinalização intracelular
CTSD Cathepsin D (lysosomal aspartyl protease)	Lisossomo, mitocôndria
CYP11A1 Cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1	Mitocôndria, atividade de monooxigenação do colesterol(side-chain-cleaving)
CYP19 Cytochrome P450, family XIX (conversion of androgen to estrogen), aromatase	Espaço extracelular
EED Embryonic ectoderm development protein	imprinting, núcleo, pronúcleo, ligação à proteína
EEF1A1 Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	citoplasma, ligação ao DNA, complexo de tradução eu cariótica do fator 1 de elongação, atividade repressora de transcrição
F20- Transcribed locus, highly similar to G8 ribosomal protein L23 G8 G8	Componente celular: subunidade de ribossomo mitocondrial, Função Molecular: ligação ao RNA,constituínte estrutural de ribossomo, Processo Biológico: biosíntese de proteína
FOS Murine FBJ osteosarcoma viral (v-fos) oncogene homolog	neurogênese, núcleo, regulação da transcrição, DNA-dependente, atividade do fator de transcrição, complexo do fator de transcrição, manutenção e/ou crescimento celular
FTH1 Ferritin, heavy polypeptide 1	endocitose, alta afinidade ao transporte de íon férrico, atividade transportadora de íon férrico, membrana vacuolar (sensu Fungi)
FTL Ferritin, light polypeptide	Função Molecular: ligação, ligação ao íon férrico, Processo Biológico: homeostase do íon férrico, transporte de íon férrico
GJA1 Gap junction protein, alpha 1, 43 kD (connexin 43)	Sinalização intercelular, gap junction, atividade de formação de canais gap-junction, integrante de membrana,
GSTA2 Glutathione S-transferase A2	Função Molecular: <i>glutathione transferase activity</i>
IBSP Integrin-binding sialoprotein (bone sialoprotein, bone sialoprotein II)	Espaço extracelular

Continuação da Tabela 5

Identificação*	Ontologia
IFITM3 Interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)	Vesícula citoplasmática, resposta imune, integrante de membrana, regulação negativa de proliferação celular
LAMR1 Laminin receptor 1 (ribosomal protein SA, 67 kDA)	Componente Celular: subunidade ribossomal menor, Função Molecular: atividade receptora, constituinte estrutural do ribossomo, Processo Biológico: biosíntese protéica
LOC404053 Similar to alpha-tubulin isoform 1	Componente Celular: microtúbulos, Função Molecular: ligação ao GTP, atividade estrutural de molécula, Processo Biológico: movimentos baseados em microtúbulos
LOC404067 Similar to pro alpha 1(I) collagen	Bovino: Componente Celular: colágeno, citoplasma, Função Molecular: constituinte estrutural da matriz extracelular, Processo Biológico: transporte de fosfato
LOC404068 Similar to protein kinase C receptor	Atividade quinase, atividade receptora
MGP Matrix Gla protein	Ligação ao íon cálcio, condensação de cartilagem, matriz extracelular (sensu Metazoa), constituinte estrutural da matriz extracelular, ossificação, constituinte estrutural do osso, espaço extracelular
MHC class I-like family A1 (MHCLA1)	Atividade acoplada a ATPase, atividade motora de microfilamentos, miosina muscular, miosina, contração do músculo estriado, filamento denso do músculo estriado, constituinte estrutural do músculo
MYLK Myosin, light polypeptide kinase	Ligação ao ATP, ligação à calmodulina, atividade quinase cadeia leve da miosina, fosforilação de aminoácido protéico, atividade da proteína quinase, atividade da proteína quinase serina/treonina, atividade transferase
ORF ORF protein	Função Molecular: atividade receptora, ligação ao RNA
POMC Proopiomelanocortin [adrenocorticotropin] [beta-lipotropin] [alpha-melanocyte stimulating hormone] [beta-melanocyte stimulating hormone] [beta-endorphin]	Espaço extracelular, atividade de hormônios neuropeptídicos, via de sinalização neuropeptídica
RAB7 RAB7, member RAS oncogene family	Morte celular autofágica, transporte do lisossomo ao endossomo, transporte de endossomos, atividade GTPase, "late endosome", morte celular da glândula salivar, ligação ao DNA, aparato de Golgi, transporte intracelular de proteína, regulação da transcrição, DNA-dependente, sistema de tradução de sinal, mitocôndria, ligação ao GTP

Continuação da Tabela 5

Identificação*	Ontologia
RAC1 Rho family, small GTP binding protein Rac1	Componente celular desconhecido, função molecular desconhecida, resposta à bactéria patogênica, organização do citoesqueleto de actina e biogênese, orientação axônica, gênese axônica, migração celular periférica (sensu Insecta), proliferação celular, morfogênese dendrítica, formação dos apêndices dorsais, fechamento dorsal, modificação morfológica da serosa amniótica, estabelecimento da polaridade do omatídeo (sensu Drosophila), estabelecimento da polaridade tecidual, migração de células da glia, atividade GTPase, junção e/ou manutenção das junções intercelulares, cascata JNK, processos baseados em microtúbulos, morfogênese da do epitélio do disco imaginal larval, fusão mioblástica, desenvolvimento celular do folículo ovariano (sensu Insecta), desenvolvimento do sistema nervoso periférico, regulação da morfogênese dendrítica, regulação da estrutura sináptica, rabdômero, desenvolvimento do rabdômero, adesão celular, motilidade celular, citoplasma, vesícula citoplasmática, organização e biogênese do citoesqueleto, endocitose, extrínscio à membrana plasmática, ligação ao GTP, resposta hiperosmótica, resposta inflamatória, cascata de sinalização intracelular, lamelipódio, biogênese de lamelipódio, fração membrânica, regulação positiva da polimerização do filamento de actina, ligação à proteína, resposta a injúrias, transdução de sinal mediada pela GTPase, atividade oxidativa acyl-CoA, atividade da endonuclease, ligação ao RNA, processamento de RNA (splicing), ligação ao DNA simples-fita, atividade transferase, transferência de grupos alquil ou aril (outros que metil).
RPL10 Ribosomal protein L10	intracelular, biosíntese protéica, ribossomo, constituinte estrutural do ribossomo, subunidade maior do ribossomo citossólico (sensu Eukaryota), junção e manutenção da subunidade ribossomal maior
RPL21 Ribosomal protein L21	Constituinte estrutural do ribossomo, subunidade maior do ribossomo citossólico (sensu Eukaryota), biosíntese protéica
RPL27 Similar to ribosomal protein L27	Constituinte estrutural do ribossomo, subunidade maior do ribossomo citossólico (sensu Eukaryota), biosíntese protéica
Rpl3 Ribosomal protein L3	Subunidade maior do ribossomo citossólico (sensu Eukaryota), ribossomo citossólico (sensu Eukaryota), biosíntese protéica, constituinte estrutural do ribossomo, ribossomo, junção e manutenção da subunidade ribossômica maior
RPLP0 Ribosomal protein, large, P0	citoplasma, subunidade maior do ribossomo citossólico (sensu Eukaryota), ribossomo citossólico (sensu Eukaryota), reparação de DNA, DNA-atividade liase (sítios apurínicos ou apirimídicos), núcleo, biosíntese protéica, ribossomo, constituinte estrutural do ribossomo
RPLP2 Ribosomal protein, large P2	Subunidade maior do ribossomo citossólico (sensu Eukaryota), ribossomo citossólico (sensu Eukaryota), biosíntese protéica, constituinte estrutural do ribossomo, elongação traducional

Continuação da Tabela 5

Identificação*	Ontologia
RPS14 Ribosomal protein S14	plastídio, intracelular, atividade oxidoreductase, biossíntese proteica, ribossomo, constituinte estrutural do ribossomo, ciclo do ácido tricarboxílico, cloroplasto, subunidade ribossomal menor da mitocôndria, mitocôndria, subunidade ribossomal menor plastidial, subunidade menor do ribossomo citossólico (sensu Eukaryota), ligação ao RNA
RPS18 Ribosomal protein S18	plastídio, ligação ao ATP, complexo receptor gama-delta de célula T, homeostase do íon férrico, transporte de íon férrico, ligação ao nucleotídeo, transporte de peptídeo antigênico, atividade ATPase de transporte de peptídeo antigênico, regulação da tradução, subunidade ribossomal menor, constituinte estrutural do ribossomo, cloroplasto, subunidade ribossomal menor plastidial, biossíntese protéica, subunidade ribossomal menor no citossol (sensu Eukaryota), ribossomo, início da tradução
RPS2 Ribosomal protein S2	plastídio, subunidade ribossomal menor do citossol (sensu Eukaryota), biossíntese protéica, regulação da fidelidade traducional, constituinte estrutural do ribossomo, cloroplasto, detecção de bactéria patogênica, resposta hipersensitiva, subunidade menor do ribossomo mitocondrial, membrana plasmática, subunidade ribossomal menor plastidial, ligação à proteína, vesícula citoplasmática
RPS28 Ribosomal protein S28	Subunidade menor do ribossomo citossólico (sensu Eukaryota), intracelular, biossíntese proteica, ribossomo, ligação ao RNA, constituinte estrutural do ribossomo
RPS3A Ribosomal protein S3A	Ribossomo citossólico (sensu Eukaryota), subunidade menor do ribossomo citossólico (sensu Eukaryota), oogênese (sensu Insecta), biossíntese protéica, constituinte estrutural do ribossomo, ribossomo
SDF1 Stromal cell-derived factor 1	Homeostase do íon cálcio, adesão celular, sinalização intercelular, atividade da quimiocina, quimiotaxia, circulação, via de sinalização da proteína G acoplada ao receptor, resposta imune, ligação ao receptor de resposta inflamatória, regulação da polimerização e/ou despolimerização da actina, resposta a vírus, atividade de transdução de sinal, transdução de sinal para o desenvolvimento cerebral, espaço extracelular, desenvolvimento de células germinativas, migração de células germinativas, introdução de quimiotaxia positiva, regulação positiva de migração celular, regulação da migração celular, proliferação de células T
SPARC Secreted protein, acidic, cysteine-rich [osteonectin]	Espaço extracelular
ST3GAL-IV Alpha2,3-sialyltransferase	Componente Celular: integrante da membrana, Função Molecular: atividade da sialiltransferase, Processo Biológico: metabolismo de amino açúcares, Processo Biológico: metabolismo de glicolípido, "protein-lipoylation", Função Molecular: atividade do beta-galactosídeo alfa-2,3-sialiltransferase, modificação protéica

Continuação da Tabela 5

Identificação*	Ontologia
STAR Steroidogenic acute regulatory protein	mitocôndria, biosíntese de esteróides, atividade de transportador de colesterol
SULT1A1 Sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 1	Ligação a nucleotídeo, atividade sulfotransferase
TIMP2 Tissue inhibitor of metalloproteinase 2	Membrana basal, atividade ativadora de enzima, espaço extracelular, atividade inibitória da metaloendopeptidase
TPT1 Tumor protein, translationally-controlled 1	núcleo, atividade tRNA 2'-fosfotransferase, tRNA splicing, anti-apoptose, ligação ao íon cálcio, citoplasma, ligação a proteína, Componente Celular: espaço extracelular, citoplasma
Transcribed locus, highly similar to G151 [Rattus norvegicus]	Componente Celular: matriz extracelular (sensu Metazoa), espaço extracelular, fração solúvel, Função Molecular: constituinte estrutural da matriz extracelular
Transcribed locus, highly similar to NP_000962.2 ribosomal protein L7 [Homo sapiens]	Componente Celular: subunidade maior do ribossomo citosólico (sensu Eukaryota), Função Molecular: ligação ao RNA, constituinte estrutural do ribossomo, Processo Biológico: biossíntese protéica, Componente Celular: subunidade maior do ribossomo, Função Molecular: atividade regulatória da transcrição, Processo Biológico: biossíntese protéica
Transcribed locus, highly similar to NP_001015.1 ribosomal protein S21 [Homo sapiens]	Componente Celular: subunidade menor do ribossomo mitocondrial, Função Molecular: constituinte estrutural do ribossomo, Processo Biológico: biossíntese protéica, Componente Celular: intracelular, ribossomo, Função Molecular: constituinte estrutural do ribossomo
Transcribed locus, highly similar to NP_001226.2 serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1) [Homo sapiens]	Função Molecular: inibidor da atividade endopeptidase "serine-type"
Transcribed locus, highly similar to NP_001545.2 cysteine-rich, angiogenic inducer, 61 [Homo sapiens]	Processo Biológico: proliferação celular, morfogênese
Transcribed locus, highly similar to NP_003570.1 RAD54-like (S. cerevisiae) [Homo sapiens]	Processo Biológico: recombinação de DNA, reparação de DNA, meiose

Continuação da Tabela 5

Identificação*	Ontologia
Transcribed locus, highly similar to NP_031389.3 non-POU domain containing, octamer-binding [Homo sapiens]	Função Molecular: ligação a RNA, Componente Celular: núcleo, Função Molecular: atividade do fator pre-mRNA splicing, Processo Biológico: processamento de mRNA, RNA splicing
Transcribed locus, highly similar to NP_036555.G141 F13	Componente Celular: subunidade maior do ribossomo mitocondrial, Função Molecular: constituinte estrutural do ribossomo, Processo Biológico: biossíntese protéica, Componente Celular: intracelular, Componente Celular: ribossomo
Transcribed locus, highly similar to NP_037356.1 ribosomal protein S26 [Rattus norvegicus]	Componente Celular: intracelular, ribossomo, Função Molecular: constituinte estrutural do ribossomo, Processo Biológico: biossíntese protéica
Transcribed locus, highly similar to NP_077065.1 ADP-ribosylation factor 4 [Rattus norvegicus]	Função Molecular: atividade GTPase
Transcribed locus, highly similar to NP_079940.2 sorting nexin 9 [Mus musculus]	Função Molecular: atividade protéica do adaptador SH3/SH2, Processo Biológico: localização protéica
Transcribed locus, highly similar to NP_112327.1 ribosomal protein L10A [Rattus norvegicus]	Componente Celular: ribossomo, Função Molecular: constituinte estrutural do ribossomo, Processo Biológico: síntese protéica
Transcribed locus, highly similar to NP_112372.1 ribosomal protein S11 [Rattus norvegicus]	Biossíntese protéica
Transcribed locus, highly similar to NP_112740.1 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like [Homo sapiens]	Componente Celular: complexo nuclear ribonucleoprotéico heterogêneo, Função Molecular: ligação ao DNA dupla-fita, ligação a poli(A), ligação ao DNA simples-fita, Processo Biológico: processamento de RNA
Transcribed locus, highly similar to NP_114405.1 STARD3 N-terminal like [Homo sapiens]	Componente Celular: citoplasma, Processo Biológico: metabolismo do colesterol, transporte mitocondrial, metabolismo de esteróides
Transcribed locus, highly similar to NP_150254.1 ribosomal protein L13 [Homo sapiens]	Componente Celular: subunidade maior do ribossomo mitocondrial, Função Molecular: constituinte estrutural do ribossomo, Processo Biológico: biossíntese protéica, componente Celular: intracelular, ribossomo
Transcribed locus, highly similar to NP_620265.1 defender against cell death 1 [Rattus norvegicus]	Perda da proteína DAD1 desencadeadora de apoptose
Transcribed locus, highly similar to NP_796275.2 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L [Mus musculus]	Componente Celular: complexo ribonucleoprotéico nuclear heterogêneo, nucleoplasma, Função Molecular: ligação a RNA, Processo Biológico: processamento de RNA

Continuação da Tabela 5

Identificação*	Ontologia
Transcribed locus, highly similar to NP_859530.1 LAG1 longevity assurance homolog 2 (S. cerevisiae) [Homo sapiens]	Supressor do crescimento de células cancerígenas. Pode estar envolvido na síntese de esfingolípide
Transcribed locus, highly similar to NP_937895.1 gelsolin (amyloidosis, Finnish type) [Homo sapiens]	Componente Celular: citoesqueleto de actina, citosol, região extracelular, Função Molecular: ligação ao íon cálcio, Processo Biológico: polimerização do filamento de actina, rompimento do filamento de actina, "barbed-end actin filament capping"
Transcribed locus, highly similar to NP_954635.1 aminolevulinate, delta-, synthase 1 [Homo sapiens]	Função Molecular: atividade de síntese de 5-aminolevulinato, Processo Biológico: biossíntese do grupo heme
Transcribed locus, highly similar to XP_214539.2 similar to sorting nexin 2 [Rattus norvegicus]	Processo Biológico: endocitose
Transcribed locus, highly similar to XP_216988.2 ribosomal protein L3 [Rattus norvegicus]	A proteína L3 é um componente da subunidade maior de ribossomos citoplasmáticos, Função Molecular: constituinte estrutural do ribossomo, Processo Biológico: biossíntese protéica
Transcribed locus, highly similar to XP_341343.1 dihydropyrimidinase-like 2 [Rattus norvegicus]	Componente Celular: membrana, Função Molecular: atividade de hidrolase
Transcribed locus, highly similar to XP_341789.1 ribosomal protein S5 [Rattus norvegicus]	Componente Celular: mitocôndria, Função Molecular: constituinte estrutural do ribossomo, Componente Celular: subunidade menor do ribossomo citosólico (sensu Eukaryota), Função Molecular: ligação RNA, Processo Biológico: biossíntese protéica
Transcribed locus, highly similar to XP_370878.1 KIAA2002 protein [Homo sapiens]	Função Molecular: ligação a ATP, Função Molecular: atividade de proteína quinase, Processo Biológico: fosforilação de aminoácido protéico
Transcribed locus, moderately similar to NP_002880.1 retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2 [Homo sapiens]	Processo Biológico: metabolismo do retinóide
Transcribed locus, moderately similar to NP_003964.2 ribosomal protein L14 [Homo sapiens]	Componente Celular: subunidade maior do ribossomo citosólico (sensu Eukaryota), Função Molecular: ligação a RNA, constituinte estrutural do ribossomo, Processo Biológico: biossíntese protéica
Transcribed locus, moderately similar to NP_004372.3 cAMP responsive element binding protein-like 1 [Homo sapiens]	Fator de transcrição que age na via da "unfolded protein response" (UPR) por ativar genes UPR alvos induzidos durante o "ER stress". Componente Celular: núcleo, Função Molecular: ligação ao DNA, Processo Biológico: controle da transcrição, DNA-dependente

Continuação da Tabela 5

Identificação*	Ontologia
Transcribed locus, moderately similar to NP_005116.1 copper chaperone for superoxide dismutase [Homo sapiens]	Componente Celular: fração solúvel, Função Molecular: ligação ao íon de cobre, Função Molecular: atividade transportadora de íon de cobre, Processo Biológico: transporte intracelular de íon de cobre, metabolismo do superóxido
Transcribed locus, moderately similar to NP_059132.1 alpha 1,4-galactosyltransferase [Homo sapiens]	Componente Celular: integrante da membrana de Golgi, Função Molecular: atividade galactosiltransferase, Processo Biológico: biosíntese de glicosíngolípido
Transcribed locus, moderately similar to NP_062097.1 regulator of G-protein signaling 9 [Rattus norvegicus]	Função: Inibe a transdução de sinal incrementando a atividade GTPase da subunidade alfa da proteína G dirigindo-os, desse modo, à forma inativa, GDP. Liga-se à G(t)-alfa. Envolvido em fototransdução; elemento chave na fase de recuperação da transdução visual
Transcribed locus, moderately similar to NP_113753.1 carboxylesterase 1 [Rattus norvegicus]	Função Molecular: atividade “serine esterase”, Processo Biológico: metabolismo, resposta a toxinas
Transcribed locus, moderately similar to NP_116212.3 chromosome 9 open reading frame 3 [Homo sapiens]	Função Molecular: atividade aminopeptidase, atividade da alanil aminopeptidase membrânica, Processo Biológico: proteólise e peptidólise
Transcribed locus, moderately similar to NP_742035.1 glutathione S-transferase, mu 5 [Rattus norvegicus]	Função Molecular: atividade da glutathione transferase
Transcribed locus, moderately similar to XP_341998.1 latent transforming growth factor beta binding protein 3 [Rattus norvegicus]	Função: Pode estar envolvido no “assembly”, secreção e direcionamento do TGFB1 a locais nos quais é estocado e/ou ativado. Pode desempenhar papéis críticos no controle e direcionamento da atividade do TGFB1. Pode ter um papel estrutural na matriz extracelular. Função Molecular: ligação ao íon cálcio
Transcribed locus, weakly similar to NP_002718.2 proteoglycan 1, secretory granule [Homo sapiens]	Pode neutralizar enzimas hidrolíticas
Transcribed locus, weakly similar to NP_795975.1 RIKEN cDNA 9130023H24 gene [Mus musculus]	Componente Celular: tubulina, Função Molecular: ligação ao GTP, Função Molecular: atividade GTPase, atividade da molécula estrutural, Processo Biológico: polimerização do microtúbulo, movimento baseado em microtúbulos
Transcribed locus, weakly similar to XP_375024.1 UTP14, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog C (yeast) [Homo sapiens]	Componente da ribonucleoproteína menor U3 (U3 snoRNP), Componente Celular: complexo ribonucleoprotéico menor, Função Molecular: atividade do fator “pre-mRNA splicing”, Processo Biológico: processamento de RNA, Componente Celular: complexo ribonucleoprotéico, nucleocapsídeo viral

Continuação da Tabela 5

Identificação*	Ontologia
VIA L Cytochrome-c oxidase	Esta proteína é um dos polipeptídeos da cadeia do citocromo C oxidase codificados no núcleo, a oxidase terminal do transporte de elétrons na mitocôndria. Citocromo C oxidase é o componente da cadeia respiratória que catalisa a redução do oxigênio da água. As subunidades 1 e 3 formam o núcleo funcional do complexo enzimático. CO I é a subunidade catalisadora da enzima. Elétrons originados no citocromo C são transferidos através da centro Cobre A da subunidade 2 e do Heme A da subunidade 1 ao centro bimetálico formado pelo Heme A3 e Cobre B
WDR1 WD repeat domain 1	Ligação à actina, citoesqueleto de actina, percepção sonora, ligação à proteína

*Os dados foram mantidos na Língua Inglesa para assegurar a fidelidade da informação

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

Considerada a puberdade como o processo de maturação no qual um macho ou uma fêmea mamífera se torna capaz de liberar gametas e exibir comportamento sexual completo, deve-se reconhecer que entre os diversos fatores que influenciam a sua manifestação a genética seja um dos mais importantes (HAFEZ & HAFEZ, 2004a). Não é possível implicar apenas um gene como único desencadeador da puberdade pois suas causas ou determinantes devem ser relacionadas a múltiplos fatores e conseqüentemente múltiplos genes. Embora a puberdade esteja sendo alvo de intensas investigações, pouco se sabe sobre interação dos genes envolvidos nesse processo. Numa tentativa de suprir esta lacuna o presente trabalho avaliou a expressão gênica diferencial entre folículos ovarianos de animais *Bos primigenius indicus* (Nelore) pré-púberes e púberes. Para tal utilizou-se a técnica de Análise Serial de Expressão Gênica, que se constitui de abordagem global sobre os diversos transcritos do tecido num dado momento. O desenho experimental objetivou comparar animais cuja diferença primária fosse o fato de serem púberes ou pré-púberes, segundo o critério da apresentação de ovulação ou não.

Para garantir a maior fidelidade da informação, foi escolhido o momento do sacrifício como o momento de maior diâmetro do folículo dominante, segundo acompanhamento ultra-sonográfico. As bezerras pré-púberes foram abatidas no momento em que o folículo dominante atingiu cerca de 8 mm (média estabelecida pelo diâmetro dos folículos dominantes

precedentes). O sacrifício foi feito após a seleção do folículo dominante (que em Nelore acontece em torno de 6,5 a 7 mm de diâmetro). As novilhas púberes foram abatidas no momento em que o folículo dominante atingiu cerca de 14 mm (média também estabelecida pelo diâmetro dos folículos precedentes). Devido às suas características fisiológicas, os folículos dos animais pré-púberes deveriam estar caminhando para o processo de regressão (atresia que ocorre em torno dos 10 mm de diâmetro) enquanto que aqueles dos animais púberes apresentavam-se no período pré-ovulatório.

Adotando o critério de maior diâmetro folicular buscou-se comparar os grupos no momento crucial da atresia ou ovulação nas fêmeas pré-púberes e púberes respectivamente. Entretanto para a execução desse delineamento experimental outros fatores importantes não puderam ser completamente controlados tais como a idade (diferença de quase 20 meses entre os grupos experimentais), manejo e o tamanho do folículo no momento do abate (8 e 14 mm para fêmeas pré-púberes e púberes respectivamente). Por esse motivo há que se levar em conta a possibilidade de influência destes fatores na manifestação da puberdade e não somente atribuir os achados do presente trabalho ao componente genético relacionado à puberdade.

A observação da dinâmica folicular nos animais de ambos os grupos evidenciou fenômeno previamente observado por outros autores. Novilhas pré-púberes já apresentam ondas de crescimento folicular (ADAMS *et al.*, 1994), sendo que as bezerras desde os três meses de idade já apresentaram comportamento dos folículos em forma de ondas, ou seja, os folículos se alternam nas suas fases de crescimento, estática e de regressão de maneira

semelhante ao animal adulto, salvo o menor tamanho (tanto no diâmetro folicular como na duração da onda) (MIHM *et al.*, 2002a; EVANS *et al.*, 1995).

Uma vez estabelecida a puberdade, a dinâmica folicular se alterou. Conforme dados de literatura, foram observados ciclos de duas ou três ondas foliculares, sendo que apenas a última culminou em ovulação (MIHM *et al.*, 2002b). Em nossos animais experimentais, foi observada também a presença do ciclo estral de curta duração, característico nos animais iniciando a ciclicidade ou que se encontram por algum tempo em anestro. As novilhas púberes foram selecionadas para o experimento por já estarem apresentando ciclos estrais, porém ao serem transferidas para o local do experimento entraram em anestro. A razão fisiológica para o ciclo estral curto é o baixo aporte de progesterona do corpo lúteo, insuficiente para mantê-lo e o mesmo entra em regressão (DE LUCIA, 2002). Após este período de anestro e o primeiro ciclo estral curto, as novilhas passaram a ciclar normalmente (ciclo de três ondas).

A decisão de estudar a expressão gênica do folículo ovariano se deveu ao fato de acreditarmos na existência de maior número de fatores com expressão gênica a nível periférico (ovário), enquanto que centralmente (hipotálamo e hipófise) as diferenças seriam em menor número e de caráter mais regulatório e menos efector. Nossa escolha pela dissecção do folículo dominante baseou-se no fato de que o mesmo ser a unidade fisiológica mais importante do ovário, caracterizado principalmente por sua atividade secretora. Estudar o ovário como um todo, não permitiria a discriminação das informações mais importantes, pois a expressão gênica do folículo dominante se confundiria com a expressão gênica de folículos subordinados, do estroma

ovariano e outros tecidos adjacentes. Não optamos por separar o oócito, as células da teca e da granulosa por razões metodológicas, uma vez que para a preparação de RNAs de excelente qualidade os tecidos devem ser armazenados o mais rápido possível em nitrogênio líquido para inibir a degradação do RNA *in loco*. Além disso, acreditamos que a informação fisiológica do folículo ovariano como um todo reveste-se de suma importância e que a atribuição de expressão de determinados fatores a um ou outro compartimento folicular pode ser feita com o conhecimento fisiológico disponível ou posteriormente com análises tecido-específicas.

A escolha pela união de RNAs de folículos ovarianos de três e dois animais (bezerras pré-púberes e novilhas púberes, respectivamente) objetivou minimizar as diferenças individuais de expressão gênica. Como se tratam de dados cuja interpretação é fisiológica, buscou-se avaliar o comportamento da população, ou de uma amostra desta, tentando manter as diferenças individuais em segundo plano. Diferente seria a nossa abordagem se o que se procurasse fosse uma assinatura molecular. Neste caso, juntar amostras de dois ou mais indivíduos poderia mascarar o dado mais importante de característica individual. Exemplo dessa última abordagem seria o estudo da expressão gênica de um tecido tumoral para fins terapêuticos e prognósticos.

A purificação e análise do RNA mostrou-se adequada, permitindo um bom rendimento de RNA (μg) por tecido (mg). Curiosamente, o rendimento de RNA nos folículos das bezerras pré-púberes foi ligeiramente maior que nos folículos das novilhas púberes. A razão disto provavelmente foi a maior quantidade de líquido no folículo da fêmea púbere. Grande parte do aumento

de tamanho observado no folículo das novilhas púberes pode ser atribuído ao líquido folicular, sendo que seu maior componente (água) foi o principal responsável pela diferença de peso.

Para que se faça a análise serial de expressão gênica não é imprescindível que o RNA mensageiro seja purificado. Além disso, evitou-se esse passo de purificação por o considerar-se uma chance desnecessária de perder material precioso. Partiu-se então para a análise serial de expressão gênica com 30 µg de RNA total contituído da junção de RNAs de três (bezerras pré-púberes) ou dois (novilhas púberes) animais. Acreditamos que por termos partido de quantidade igual de RNA, minimizou-se as diferenças relacionadas ao tamanho dos folículos e que assim sendo, esta variável tornou-se de menor importância. Fato que reforça esta afirmação são as quantidades similares de tags de GAPDH, um “house keeping gene”, em ambas as bibliotecas SAGE (dados não apresentados).

As bibliotecas dos folículos ovarianos apresentaram rendimento (em número de tags) bastante diferente entre si, a saber, 60.732 tags para a biblioteca dos folículos das bezerras pré-púberes e 3.342.883 tags para a biblioteca dos folículos ovarianos das novilhas púberes (valores estimados). Nossa preocupação inicial foi de averiguar se na primeira biblioteca houve perda de tags, e se essa perda foi desigual. GOWDA *et al.* (2004) discutem a perda seletiva de tags ricos em adenina e timina em decorrência da não utilização de gelo em alguns passos fundamentais do protocolo SAGE. Certamente não foi esse o nosso caso, pois nosso procedimento foi o mais cuidadoso possível na observação de pequenos detalhes. Verificamos que cada biblioteca foi feita com um kit proveniente de lotes diferentes.

Acreditamos que a diferença no rendimento tenha sido devida à baixa eficiência do sistema de clonagem utilizado na biblioteca das bezerras pré-púberes, devido a baixa qualidade dos reagentes oferecidos em um dos kits. Houve perda efetiva de clones e conseqüentemente de tags entretanto de maneira equilibrada sendo que o seqüenciamento do mesmo número de tags em cada uma das bibliotecas contornou a possibilidade de problemas quanto à fidelidade da informação.

Para o seqüenciamento dos tags utilizamos a abordagem da amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando o sistema M13. Outra abordagem alternativa seria fazer a purificação dos plasmídeos (minipreps) e seqüenciamento. O seqüenciamento de fragmentos de PCR é rápido e direcionado somente à região do inserto (no caso, os concatâmeros). Uma crítica a esta abordagem é a chance de erro da enzima Taq polimerase, ao acrescentar um nucleotídeo errado a cada 1000 nucleotídeos. Este erro não chega a ser um problema por dois motivos. Em primeiro lugar, os fragmentos seqüenciados não passam de 1000 pares de bases, assim sendo a chance do erro se manifestar é muito baixa. Em segundo lugar, caso haja a incorporação de um nucleotídeo errôneo, serão amplificadas duas populações de fragmentos, uma contendo o nucleotídeo certo e outra contendo o nucleotídeo errado. No momento do seqüenciamento aparecerão dois picos justapostos. Pela análise automática, as seqüências impuras foram identificadas e retiradas da análise (critério phred 20),

A comparação entre as bibliotecas SAGE de bezerras pré-púberes e de novilhas púberes revelou a expressão diferencial de um total de 157 tags ($P < 0,05$) que correspondem a genes que à princípio podem ou não estar

necessariamente envolvidos com reprodução. Este número é compatível com outros estudos feitos em humanos e outros organismos.

Alguns genes se destacam pela sua importância reconhecida na reprodução, tais como os genes envolvidos com a esteroidogênese, os fatores de crescimento e os genes relacionados com a matriz extracelular, cuja dinâmica acompanha estreitamente a dinâmica folicular.

Espera-se que a esteroidogênese esteja mais ativada nos folículos das novilhas púberes quando comparadas aos folículos das bezerras pré-púberes. Embora nos dois casos, os folículos já sejam dominantes, o folículo da novilha púbera é mais estimulado por gonadotrofinas hipofisárias, fato que acontece efetivamente somente à partir do início da puberdade (FOSTER, 1994). No presente trabalho revelou-se que os folículos das novilhas púberes apresentaram alta expressão das principais enzimas esteroidogênicas, e de maneira estatisticamente significativa a CYP11A1 (ou citocromo P450_{scc}), que converte o colesterol à pregnenolona, e a CYP19 (P450_{arom}), que converte andrógenos a estrógeno. Além das enzimas da via esteroidogênica, a StAR (steroidogenic acute regulatory protein), proteína responsável pelo transporte do colesterol para o interior da mitocôndria, passo limitante da via esteroidogênica, também está mais expressa no folículo dos animais púberes (Tabela 3; Figura 24). Em conjunto, estes genes, e conseqüentemente suas proteínas respectivas, direcionam o folículo a produzir estrógeno em abundância. O estrógeno regula vários processos vitais como a reprodução, o crescimento e a diferenciação celular, o desenvolvimento da glândula mamária e a lactogênese, a homeostase e a oncogênese (ENG *et al.*, 1997). No cenário reprodutivo, ele age promovendo a receptividade sexual da

fêmea, na preparação dos tecidos reprodutivos para monta e na preparação, induzindo a expressão de receptores, para a ação do hormônio luteinizante (LH), cujo pico de secreção é necessário para que ocorra a ovulação (SEGALOFF *et al.*, 1990) e, posteriormente, para a progesterona, que será produzida após a ovulação, em plena fase lútea.

Vários fatores de crescimento são produzidos no folículo ovariano e têm sua importância reconhecida no crescimento e desenvolvimento folicular. Particularmente o IGF-1 é reconhecido como um dos fatores que estimulam a produção de RNAm para a CYP19 (P450_{arom}) (SILVA & PRICE, 2000). Poderia se supor que a sua expressão estivesse aumentada no folículo de novilhas púberes quando comparada a expressão no folículo das fêmeas pré-púberes. No entanto, a técnica SAGE não detectou a presença do IGF-1, apenas de IGF-2, e a níveis tão baixos (0 e 1 tag, nas bezerras pré-púberes e nas novilhas púberes, respectivamente) que não pode ser atribuída nenhuma diferença estatisticamente significativa (Figura 26). Por outro lado, as proteínas ligadoras ao IGF, as IGFBPs, são detectadas e apresentam diferenças numéricas, mas não estatisticamente significantes (Figura 27), como era de se esperar uma vez que as mesmas atuam na diminuição de disponibilidade do IGF no ovário, as IGFBPs estão ligeiramente mais expressas nos folículos das bezerras pré-púberes. Acreditamos que o aumento do número dos tags seqüenciados em ambas as bibliotecas poderia, em teoria, aumentar o número de cópias de cada tag, permitindo detectar não somente o IGF-1 como outros fatores de crescimento, além de eventuais diferenças estatísticas, bem como revelar a diferença de expressão das IGFBPs.

Outro fator de crescimento detectado com elevado número de cópias e com maior expressão diferencial significativa na biblioteca das novilhas púberes, foi o CTGF (connective tissue growth factor; Tabela 3; Figura 26). Esse fator é mais expresso nas fases iniciais da foliculogênese (SLEE *et al.*, 2001; WANDJI *et al.*, 2000), depois sua expressão diminui e volta a aumentar pouco antes da ruptura do folículo, tendo importância na luteinização dos tecidos (HARLOW & HILLIER, 2002). O CTGF está envolvido na deposição (HARLOW *et al.*, 2002), enquanto que os MMPs (matrix metalloproteinases) e os TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) estão envolvidos na degradação (respectivamente) da matriz extracelular (KARAGEANNIS & POPEL, 2004; REICH *et al.*, 1985). Todos os processos fisiológicos que envolvem o folículo ovariano se dão dentro da matriz extracelular, e sua dinâmica acompanha de perto a dinâmica folicular (MEREDITH *et al.*, 1993). Quando o folículo cresce, há maior deposição de matriz extracelular (principalmente colágenos). Observou-se no presente trabalho maior expressão de alguns colágenos (alfa 1 tipo I e VI) no folículo das novilhas púberes quando comparados ao folículo das bezerras pré-púberes (Tabela 3).

Por outro lado, a ruptura do folículo no momento da ovulação também é caracterizada pela degradação intensa da matriz extracelular. Neste cenário, são de grande importância as MMPs (matrix metalloproteinases). No entanto, o que observamos nos folículos das novilhas púberes foi a maior expressão de CTGF e TIMP2 (Tabela 3; Figura 25), quando comparadas aos folículos das bezerras pré-púberes. Não há diferença significativa nos níveis de expressão dos MMPs. O CTGF, no folículo pré-ovulatório é considerado

um fator luteotrófico, como demonstrado para ratos (HARLOW & HILLIER, 2002). O TIMP2 teria um papel fundamental na inibição de metaloproteinases (MMPs), como a colagenase. Assim, podemos inferir que os folículos de 14mm das novilhas púberes estão se preparando para a luteinização mas ainda não deram início ao processo de ruptura. É de se supor que tal processo teria início dentro de algumas horas, caso o sacrifício não tivesse ocorrido.

Outros genes da matriz extracelular são também diferencialmente expressos, como a osteonectina (SPARC) e a fibromodulina (mais expressos nas novilhas púberes; Tabela 3) e proteoglicano (mais expresso nas bezerras pré-púberes; Tabela 2). Sabe-se que a osteonectina é expressa em tecidos que estão passando por intensa atividade proliferativa e reorganizacional (LANE & SAGE, 1994). A osteonectina foi identificada em células da granulosa de ratas após o pico do hormônio luteinizante (LH; BAGAVANDOSS *et al.*, 1998), certamente exercendo um papel na transformação do tecido folicular em tecido luteal.

Também envolvidos com a remodelação do folículo para a luteinização estão alguns fatores ligados ao citoesqueleto. A β -actina, proteínas relacionadas à actina (ARPC1B e ARP3), a cofilina e a tropomiosina estão mais expressas nos folículos das novilhas púberes quando comparadas aos folículos das bezerras pré-púberes (Tabela 3), indicando a presença de uma maior teca externa. Estes mesmos elementos foram identificados nas células da granulosa de ratas durante o processo de luteinização (MCRAE *et al.*, 2005)

Elementos ligados à membrana, como a clusterina e a conexina 43 (gap junction protein) estão significativamente mais expressos nos folículos dos animais púberes (Tabela 3). As junções abertas (gap junctions) são extremamente importantes na comunicação das células da granulosa entre si e as mesmas e o oócito. A alta expressão da conexina 43 durante a foliculogênese reforça a hipótese de que as células da granulosa atuem como um sincício funcional (ACKERT *et al.*, 2001).

Foi encontrado no folículo ovariano e com expressão diferencial mais abundante nas bezerras pré-púberes (Tabela 3), o gene da proopiomelanocortina (POMC) que dá origem ao ACTH, a β -endorfina e outros fatores. Seu principal sítio de expressão é a hipófise, mas ele também foi identificado como expresso a níveis baixos, no tecido ovariano de rato e bovino (CHEN *et al.*, 1986, JIN *et al.*, 1988) como um transcrito de 800-900 pb, 250 pb menor que o gene na hipófise. Neuropeptídeos opióides têm papel importante na secreção de gonadotrofinas pela hipófise (WOLFE *et al.*, 1992), mas a importância deste gene no cenário ovariano pode sinalizar para a sua possível função na reprodução, fato que merece investigação.

As técnicas de expressão gênica diferencial são de grande importância, pois permitem identificar vários genes diferencialmente expressos que por outras técnicas mais tradicionais não seriam sequer cogitados. A técnica de Análise Serial de Expressão Gênica, em particular, é uma das poucas técnicas que pode detectar genes (ou tags) sem o conhecimento prévio de informações referentes aos mesmos. Além disso, ao contrário da técnica de macro e microarrays, não possui os problemas de variáveis de hibridização que tornam a mesma técnica bastante sensível mas

pouco específica. O SAGE trabalha apenas com a fidelidade da seqüência e uma vez seqüenciado o tag, sua informação se torna digital e de infinita duração (GOWDA *et al.*, 2004).

Entretanto existem problemas na técnica de SAGE. Uma pequena porcentagem de genes pode não ser detectada devido a baixa, porém existente, probabilidade do mesmo não possuir uma seqüência CATG, imprescindível para que haja a formação do tag. Existe também a probabilidade de um tag pertencer a mais de um gene. Este último problema foi praticamente resolvido com o desenvolvimento da técnica de LongSAGE (SAHA *et al.*, 2002), que utilizando outras enzimas de restrição, produz um tag de 26 pares de bases, onde a chance do mesmo pertencer a mais de um gene é praticamente nula.

Todas as técnicas de expressão gênica diferencial necessitam etapas posteriores de validação de cada gene individualmente empregando técnicas mais sensíveis. As técnicas mais comuns utilizadas para este fim são o Northern blot, o PCR em tempo real ou o RT-PCR semiquantitativo. Além de empregar estas técnicas para as mesmas amostras utilizadas para a confecção das bibliotecas SAGE, é interessante fazer também a validação biológica, utilizando outros animais em outras condições. Tendo em mãos esta lista de genes diferencialmente expressos, o próximo passo será a validação dos principais genes diferencialmente expressos.

A identificação dos tags foi feita pela comparação dos tags de cada biblioteca com o único banco de tags existente para *Bos taurus* (www.ncbi.nlm.nih.gov/sage) uma vez que um banco de tags para *Bos indicus* ainda não está disponível. O banco de tags utilizado ainda está

incompleto, uma vez que grande parte dos tags nele presentes só têm a informação de que são transcritos bovinos sem apresentar informações sobre o gene. Uma alternativa seria comparar esses tags cuja informação é incompleta com um banco de tags humano. No entanto, aproximadamente 50% dos tags do banco de dados bovino não apresenta correspondente no banco de tags humano, restando como única solução aguardar que a informação genômica disponível para bovinos se torne mais abundante. Por isso, é imprescindível que pesquisas sejam feitas para desvendar o genoma bovino e que estudos de expressão gênica na mesma espécie se tornem alvo de novas pesquisas.

Tendo em vista aplicações do conhecimento gerado por este trabalho, surgem algumas indagações. Os genes com expressão diferencial mais abundantes no folículo das novilhas púberes seriam expressos mais cedo nos animais precoces sexualmente? Teriam os animais de origem taurina e zebuína, distintos quanto ao momento do início da puberdade, perfis de expressão gênica distinta do ponto de vista temporal, qualitativo e quantitativo? Em sendo positiva a última pergunta, poderíamos encontrar algum gene que servisse como um marcador de precocidade sexual, com aplicação na seleção assistida por marcadores?

Novos estudos envolvendo a validação ou não da expressão diferencial dos genes apontados no presente trabalho, nessas amostras de RNA bem como de outros tecidos poderão auxiliar-nos a responder a essas questões.

6 Conclusões

6. CONCLUSÕES

- ✓ A comparação das duas bibliotecas SAGE de folículos ovarianos de animais *Bos primigenius indicus* (Nelore) distintos quanto à fase fisiológica (antes e depois da puberdade) revelou um total de cento e vinte e sete genes diferencialmente expressos ($P < 0,05$);
- ✓ Os folículos ovarianos de animais púberes, quando comparados a animais pré-púberes, apresentam maior expressão (em número absoluto de tags) das enzimas citocromo P450 side chain cleavage ($P450_{SCC}$; CYP11A1) e citocromo P450 aromatase ($P450_{arom}$; CYP19), bem como do transportador StAR (Steroidogenic acute regulatory protein), envolvidos com a esteroidogênese e que determinam uma maior produção de estrógeno pelo folículo;
- ✓ Os folículos das novilhas púberes já se encontram em processo de luteinização (folículos pré-ovulatórios), fato caracterizado pela alta expressão do CTGF (fator de crescimento do tecido conectivo), quando comparados aos folículos das bezerras pré-púberes, mas ainda não se encontram em processo de ruptura da matriz extracelular, caracterizado pela expressão mais acentuada do TIMP2 (inibidor tecidual das metaloproteinases), e da expressão de MMPs (metaloproteinases matriciais) equivalentes a dos folículos das bezerras pré-púberes;

- ✓ A maior expressão de genes como a osteonectina (matriz extracelular), a beta-actina, proteínas relacionadas à actina (ARPC1B e ARP3), a cofilina e a tropomiosina (citoesqueleto) no folículo das novilhas púberes também indicam intensa atividade reorganizacional do tecido folicular;
- ✓ A conexina 43 (gap junction protein) se encontra mais abundante no folículo das novilhas púberes, indicando uma intensa comunicação das células da granulosa entre si e entre as mesma e o oócito;
- ✓ O gene da proopiomelanocortina, importante na expressão de ACTH e beta-endorfinas hipofisárias foi demonstrado estar mais expresso no folículo das bezerras pré-púberes;
- ✓ Tomados em conjunto, os perfis de expressão gênica diferencial entre folículos ovarianos de bezerras pré-púberes e novilhas púberes indicam que as principais fatores que distinguem os primeiros dos últimos são a intensa atividade esteroidogênica (secreção de estrógeno) e a preparação para a luteinização (produção de progesterona);

7 Referências Bibliográficas

7 REFERÊNCIAS

ACKERT, C.L.; GITTENS, J.E.; O'BRIEN, M.J.; EPPIG, J.J.; KIDDER, G.M. Intercellular communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse, **Developmental Biology**, v.233, p.258-270, 2001.

ADAMS, G.P.; EVANS, A.C.; RAWLINGS, N.C. Follicular waves and circulating gonadotrophins in 8-month-old prepubertal heifers, **Journal of Reproduction and Fertility**, v.100, p.27-33, 1994.

ANDERSON, E.; LEE, G.Y. The participation of growth factors in simulating the quiescent, proliferative, and differentiative stages of rat granulosa cells grown in a serum-free medium, **Tissue Cell**, v.25, p.49-72, 1993.

ANGELASTRO, J.M.; KLIMASCHEWSKI, L.; TANG, S.; VITOLO, O.V.; WEISSMAN, T.A.; DONLIN, L.T.; SHELANSKI, M.L.; GREENE, L.A. Identification of diverse nerve growth factor-regulated genes by serial analysis of gene expression (SAGE) profiling. **Proceedings in the National Academy of Sciences USA**, v.97 (19), p.10424-10429, 2000b.

ANGELASTRO, J.M.; KLIMASCHEWSKI, L.; VITOLO, O.V. Improved NlaIII digestion of PAGE-purified 102 bp ditags by addition of a single purification step in both the SAGE and microSAGE protocols. **Nucleic Acids Research**, v.28 (12), p.E62i-iii, 2000a.

ANISIMOV, S.V.; TARASOV, K.V.; TWEEDIE, D.; STERN, M.D.; WOBUS, A.M.; BOHELER, K.R. SAGE identification of gene transcripts with profiles unique to pluripotent mouse R1 embryonic stem cells. **Genomics**, v.79 (2), p.169, 2002.

ARMOSTRONG D.G.; BAXTER, G.; GUTIERREZ, C.G.; HOGG, C.O.; GLAZYRIN, A.L.; CAMPBELL, B.K.; BRAMLEY, T.A.; WEBB, R. Insulin-like growth factor binding protein -2 and -4 messenger ribonucleic acid expression in bovine ovarian follicles: effect of gonadotropins and developmental status, **Endocrinology**, v.139, p.2146-2154, 1998.

AUDIC, S.; CLAVERIE, J.M. The significance of digital gene expression profiles, **Genome Research**, v.7, p.986-995, 1997.

AUSTIN, E.J.; MUHM, M.; EVANS, A.C.O.; KNIGHT, P.G.; IRELAND, J.L.H.; IRELAND, J.J.; ROCHE, J.F. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle, **Biology of Reproduction**, v.64, p.839-848, 2001.

BADINGA, L.; DRAIN COURT, M.A.; SAVIO, J.D.; WOLFESON, D.; DROST, M.; DE LA SOTA, R.L.; THATCHER, W.W. Endocrine and ovarian responses associated with the first wave dominant follicle in cattle, **Biology of Reproduction**, v.47, p.871-883, 1992.

BAGAVANDOSS, P.; SAGE, E.H.; VERNON, R.B. Secreted protein, aciodic and rich in cysteine (SPARC) and thrombospondin in the developing follicle and corpus luteum of the rat, **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.46, p.1043-1049, 1998.

BAHRENBURG, G.; BRAUERS, A.; JOOST, H.G.; JAKSE, G. Reduced expression of PSCA, a member of the LY-6 family of cell surface antigens, in bladder, esophagus, and stomach tumors. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v.275 (3), p.783-788, 2000.

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.

BASHIARDES, S.; LOVETT, M. cDNA detection and analysis. Current opinion in Chemical Biology, v.5, p.15-20, 2001.

BASRAI, M.A.; VELCULESCU, V.E.; KINZLER, K.W.; HIETER, P. NORF5/HUG1 is a component of the MEC1-mediated checkpoint response to DNA damage and replication arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v.19 (10), p.7041-7049, 1999.

BERGFELT, D.R.; KOT, K.; GINTHER, O.J. Intrafollicular injection of an aromatase inhibitor in mares, **Theriogenology**, v.51, p.297 (resumo), 1999.

BERTHIER, D.; QUERE, R.; THEVENON, S.; BELEMSAGA, S.; PIQUEMAL, D.; MARTI, J.; MAILLARD, J.C. Serial analysis of gene expression (SAGE) in bovine trypanotolerance: preliminary results, **Genetics, Selection and Evolution**, v.35 Supl.1, p.S35-S47, 2003.

BLOMBERG, L.A.; ZUELKE, K.A. Serial analysis of gene expression (SAGE) during porcine embryo development, **Reproduction Fertility and Development**, v.16, p.87-92, 2004.

BOON, K.; CARON, H.N.; VAN ASPEREN, R.; VALEN TIJN, L.; HERMUS, M.C.; VAN SLUIS, P.; ROOBEEK, I.; WEIS, I.; VOUTE, P.A.; SCHWAB, M.; VERSTEEG, R. N-myc enhances the expression of a large set of genes functioning in ribosome biogenesis and protein synthesis. **European Molecular Biology Organization (EMBO) Journal**, v.20 (6), p.1383-1393, 2001.

CAMPBELL, B.K.; SCARAMUZZI, R.J.; WEBB, R. Induction and maintenance of oestradiol and immunoreactive inhibin production with FSH by ovine granulosa cells cultured in serum-free media, **Journal of Reproduction and Fertility**, v.106, p.7-16, 1996.

CHEN, C.L.; CHANG, C.C.; KRIEGER, D.T.; BARDIN, C.W. Expression and regulation of proopiomelanocortin-like gene in the ovary and placenta: comparison with the testis, **Endocrinology**, v.118, p.2382-2389, 1986.

CHEN, J.-J.; ROWLEY, J.D.; CLARK, T.; LEE, S.; ZHOU, G.; BECK, C.; ROWLEY, J.D.; WANG, S.M. The pattern of gene expression in mouse Gr-1⁺ myeloid progenitor cells. **Genomics**, v.77, p.149, 2001.

CHEN, J.-J.; ROWLEY, J.D.; WANG, S.M. Generation of longer cDNA fragments from serial analysis of gene expression tags for gene identification. **Proceedings in the Academy of Sciences USA**, v.97, p.349-353, 2000.

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

CLARK, B.J.; WELLS, J.; KING, S.R.; STOCCO, D.M. The purification, cloning and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR), **Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.28314-28322, 1994.

COLLINS, F.S. Microarrays and macroconsequences. **Supplement to Nature Genetics**, v.21, p.2, 1999.

CROWE, M.A.; KELLY, P.; DRIANCOURT, M.A.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Effects of follicles stimulating hormone with and without luteinizing hormone on serum hormone concentrations, follicle growth, and intrafollicular estradiol and aromatase activity in gonadotropin-releasing hormone-immunized heifers, **Biology of Reproduction**, v.64, p.368-374, 2001.

DE LUCIA, R.F.S. **Avaliação e caracterização da fisiologia ovariana e da fertilidade de novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*) de linhagem precoce**, Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 66p., 2002.

DE WAARD, V.; VAN DEN BERG, B.M.; VEKEN, J.; SCHULTZ-HEIENBROK, R.; PANEKOET, H.; VAN ZONNEVELD, A.J. . Serial analysis of gene expression to assess the endothelial cell response to an atherogenic stimulus. **Gene**, v.226, p.1-8, 1999.

DI CLEMENTE, N.; GOXE, B.; REMY, J.J.; CATE, R.; JOSSO, N.; VIGIER, B.; SALESSE, R. Inhibitory effect of AMH upon the expression of aromatase and LH receptors by cultured granulosa cells on rat and porcine immature ovaries, **Endocrine**, v.2, p.553-558, 1994.

DRIANCOURT, M.A.; GUET, P.; REYNAUD, K.; CHADLI, A.; CATELLI, M. Presence of an aromatase inhibitor, possibly heat shock protein 90 in dominant follicles of cattle, **Journal of Reproduction and Fertility**, v.115, p.45-58, 1999.

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

DUNCAN, M.R.; FRAZIER, K.S.; ABRAMSON, S.; WILLIAMS, S.; KLAPPER, H.; HUANG, X.; GROTEENDORST, G.R. Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor β -induced collagen synthesis: down regulation by cAMP, **FASEB J**, v.13, p.1774-1786, 1999.

EGUCHI, T.; KUBOTA, S.; KONDO, S.; SHIMO, T.; HATTORI, T.; NAKANISHI, T.; KUBOKI, T.; YATANI, H.; TAKIGAWA, M. Regulatory mechanism of human connective tissue growth factor (CTGF/Hs24) gene expression in a human chondrocytic cell line, HCS-2/8, **Journal of Biochemistry**, v.130, p.79-87, 2001.

EL-MEANAWY, M.A.; SCHELLING, J.R.; POZUELO, F.; CHURPEK, M.M.; FICKER, E.K.; IYENGAR, S.; SEDOR, J.R. Use of serial analysis of gene expression to generate kidney expression libraries. **American Journal of Physiology Renal Physiology**, v.279 (2), p.F383-F392, 2000.

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

FAN, W.H.; PECH, M.; KARNOVSKY, M.J. Connective tissue growth factor (CTGF) stimulates vascular smooth muscle cell growth and migration in vitro, **European Journal of Cellular Biology**, v.79, p.915-923, 2000.

FERGUSON, A.T.; EVRON, E.; UMBRIGHT, C.B.; PANDITA, T.K.; CHAN, T.A.; HERMEKING, H.; MARKS, J.R.; LAMBERS, A.R.; FUTREAL, P.A.; STAMPFER, M.R.; SUKUMAR, S. High frequency of hypermethylation at the 14-3-3 sigma locus leads to gene silencing in breast cancer **Proceedings in the National Academy of Sciences USA**, v. 97 (11), p.6049-6054, 2000.

FITZPATRICK, S.L.; RICHARDS, J.S. Regulation of cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid and activity by steroids and gonadotropins in rat granulosa cells, **Endocrinology**, v.129, p.1452-1462, 1991.

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

FOSTER, D.L. Puberty in the sheep. In: **The Physiology of Reproduction**, 2 ed., E. KNOBIL & J.D. NEILL, Raven Press, NY, p.411-451, 1994.

FREKING, F.; NAZAIRIANS, T.; SCHLINGER, B.A. The expression of the sex steroid-synthesizing enzymes CYP11A1, 3 β -HSD, CYP17, and CYP19 in gonads and adrenals of adult and developing zebra finches, **General and Comparative Endocrinology**, v.119, p.140-151, 2000.

FUJIWARA, H.; HONDA, T.; UEDA, M.; NAKAMURA, K.; YAMADA, S.; MAEDA, M.; MORI, T. Laminin suppresses progesterone production by human luteinizing granulosa cells via interaction with integrin $\alpha_6\beta_1$, **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.82, p.2122-2128, 1997.

GEORGES, M. Recent Progress in Livestock Genomics and potential impact on breeding programs, **Theriogenology**, v.55, p.15-221, 2001.

GINTHER, O.J.; KASTELIC, J.P.; KNOPF, L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine oestrus cycle, **Animal Reproductive Science**, v.20, p.187-200, 1989.

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

GOING, J.J.; GUSTERSON, B.A. Molecular Pathology and Future Developments, **European Journal of Cancer**, v.35, n. 14, p.1895-1904, 1999.

GOPPELT-STRUEBE, M.; HAHN, A.; IWANCIW, D.; REHM, M.; BANAS, B. Regulation of connective tissue growth factor (ccn2; ctgf) gene expression in human mesangial cells: modulation by HMG CoA reductase inhibitors (statins), **Molecular Pathology**, v.54, p.176-179, 2001.

GOWDA, M.; JANTASURIYARAT, C.; DEAN, R.A.; WANG, G.L. Robust-LongSAGE (RL-SAGE): a substantially improved LongSAGE method for gene discovery and transcriptome analysis, **Plant Physiology**, v.134, p.890-897, 2004.

GREENWAY, F.L.; SMITH, S.R. The future of Obesity Research, **Nutrition**, v.16, p.976-982, 2000.

GUILBAULT, L.A.; ROUILLIER, P.; MATTON, P.; GLENACROSS, R.G.; BERAD, A.J.; KNIGHT, P.G. Relationships between the level of atresia and inhibin contents (α subunit and α - β dimer) in morphologically dominant follicles during their growing and regression phases of development in cattle, **Biology of Reproduction**, v.48, p.268-276, 1993.

GURGEL, .A.S.A. Análise do polimorfismo de loci microssatélites em eqüinos da raça quarto de milha brasileiros. **Tese de Mestrado**, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1998.

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

GYGI, S.P.; ROCHON, Y.; FRANZA, B.R.; AEBERSOLD, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast, **Molecular and Cellular Biology**, v.19 (3), 1999.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Ciclos reprodutivos. In: **Reprodução Animal**, 7 ed., E.S.E. HAFEZ & B. HAFEZ, Editora Manole, Barueri S.P., p.55-67, 2004a.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Foliculogênese, maturação ovocitária e ovulação. In: **Reprodução Animal**, 7 ed., E.S.E. HAFEZ & B. HAFEZ, Editora Manole, Barueri

S.P., p.69-82, 2004b.

HALEY, C. S. Livestock QTLs - bringing home the bacon? **Trends in Genetics**, v.11, n. 12, p.488-492, 1995.

HARLOW, C.R.; DAVIDSON, L.; BURNS, K.H.; YAN, C.; MATZUK, M.M.; HILLIER, S.G. FSH and TGF- β superfamily members regulate granulosa cell connective tissue growth factor gene expression *in vitro* and *in vivo*, **Endocrinology**, v.143, p.3316-3325, 2002.

HARLOW, C.R.; HILLIER, S.G. Connective tissue growth factor in the ovary paracrine system, **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.187, p.23-27, 2002.

HASHIMOTO, S.; SUZUKI, T.; DONG, H.Y.; YAMAZAKI, N.; MATSUSHIMA, K. Serial analysis of gene expression in human monocytes and macrophages. **Blood**, v.94 (3), p.837-844, 1999.

HASHIMOTO, S.I.; SUZUKI, T.; NAGAI, S.; YAMASHITA, T.; TOYODA, N.; MATSUSHIMA, K. Identification of genes specifically expressed in human activated and mature dendritic cells through serial analysis of gene expression. **Blood**, v.96 (6), p.2206-2214, 2000.

HE, T.C.; CHAN, T.A; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Cell**, v.99 (3), p.335-345, 1999.

HIBI, K.; LIU, Q.; BEAUDRY, G.A.; MADDEN, S.L.; WESTRA, W.H.; WEHAGE, S.L.; YANTG, S.C.; HEITMILLER, R.F.; BERTELSEN, A.H.; SIDRANSKY, D.; JEN, J. Serial analysis of gene expression in non-small cell lung cancer. **Cancer Research**, v.58, p.5690-5694, 1998.

HILLIER, S.G.; MIRO, F. Local regulation of primate granulosa cells aromatase activity, **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.44, p.435-439, 1993.

HOUGH, C.D.; SHERMAN-BAUST, C.A.; PIZER, E.S.; MONTZ, F.J.; IM, D.D.; ROSENSHEIN, N.B.; CHO, K.R.; RIGGINS, G.J.; MORIN, P.J. Large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer. **Cancer Research**, v.60 (22), p.6281-6287, 2000.

HUBBARD, C.J.; GREENWALD, G.S. Morphological changes in atretic graafian follicles during induced atresia in the hamster, **Anatomy Record**, v.212, p.353-357, 1985.

HUET, C.; MONGET, P.; PISSELET, C.; HENNEQUET, C.; LOCATELLI, A.; MONNIAUX, D. Chronology of events accompanying follicular atresia in hypophysectomized ewes. Changes in levels of steroidogenic enzymes, connexin 43, insulin-like growth factor II/mannose 6 phosphate receptor, extracellular matrix components, and matrix metalloproteinases , **Biology of Reproduction**, v.58, p.175-185, 1998.

HUET, C.; MONGET, P.; PISSELET, C.; MONNIAUX, D. Changes in extracellular matrix components and steroidogenic enzymes during growth and atresia of antral ovarian follicles in the sheep, **Biology of Reproduction**, v.56, p.1025-1034, 1996.

INADERA, H.; HASHIMOTO, S.; DONG, H.Y.; SUZUKI, T.; NAGAI, S. YAMASHITA, T.; TOYODA, N.; MATSUSHIMA, K. WISP-2 as a novel estrogen-responsive gene in human breast cancer cells **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v.275 (1), p.108-114, 2000.

IRVING-RODGERS, H.F.; MUSSARD, M.L.; KINDER, J.E.; RODGERS, R.J. Composition and morphology of the follicular basal lamina during atresia of bovine antral follicles, **Reproduction**, v.123, p.97-106, 2002.

IVELL, R.; TILLMANN, G.; WANG, H.; NICOL, M.; STEWART, P.M.; BARTLICK, B.; WALTHER, N.; MASON, J.I.; MORLEY, S.D. Acute regulation of the bovine gene for the steroidogenic acute regulatory protein in ovarian theca and adrenocortical cells, **Journal of Molecular Endocrinology**, v.24, p.109-118, 2000.

IWAHASHI, M.; MURAGAKI, Y.; OOSHIMA, A.; NAKANO, R. Type VI collagen expression during growth of human ovarian follicles, **Fertility and Sterility**, v.74, p.343-347, 2000.

JIN, D.F.; MUFFLY, K.E.; OKULICZ, W.C.; KILPATRICK, D.L. Estrous cycle- and pregnancy-related differences in expression of the proenkephalin and proopiomelanocortin genes in the ovary and uterus, **Endocrinology**, v.122, p.1466-1471, 1988.

KAL, A.J.; VAN ZONNEVELD, A.J.; BENES, V.; VAN DEN BERG, M.; KOERKAMP, M.G.; ALBERMANN, K.; STRACK, N.; RUIJTER, J.M.; RICHTER, A.; DUJON, B.; ANSORGE, W.; TABAK, H.F. Dynamics of gene expression revealed by comparison of serial analysis of gene expression transcript profiles from yeast grown on two different carbon sources. **Molecular Biology of the Cell**, v.10 (6), p.1859-1872, 1999.

KARAGIANNIS, E.D.; POPEL, A.S. A theoretical model of type I collagen proteolysis by matrix metalloproteinase (MMP) 2 and membrane type 1 MMP in the presence of tissue inhibitor of metalloproteinase 2, **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.39105-39114, 2004.

KASTELIC, J.P.; KO, J.C.H.; GINTHER, O.J. Suppression of dominant and subordinate ovarian follicles by a proteinaceous fraction of follicular fluid in heifers, **Theriogenology**, v.34, p.499-509, 1990.

KENZELMANN, M.; MUHLEMANN, K. Substantially enhanced cloning efficiency of SAGE (serial analysis of gene expression) by adding a heating step to the original protocol. **Nucleic Acids Research**, v.27, p.917-918, 1999.

KENZELMANN, M.; MUHLEMANN, K. Transcriptome analysis of fibroblast cells immediate-early after human cytomegalovirus infection. **Journal of Molecular Biology**, v.304 (5), p.741-751, 2000.

KNECHT, M.; CATT, K.J. Modulation of cAMP-mediated differentiation in ovarian granulosa cells by epidermal growth factor and platelet-derived growth factor, **Journal of Biological Chemistry**, v.258, p.2789-2794, 1983.

KO, J.C.H.; KASTELIC, J.P. DEL CAMPO, M.R.; GINTHER, O.J. Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrus cycle in heifers, **Journal of Reproduction and Fertility**, v.91, p.511-519, 1991.

KUHN, E. From library screening to microarray technology: strategies to determine gene expression profiles and to identify differentially regulated genes in plants. **Annals of Botany**, v.87, p.139-155, 2001.

KURAMASU, M.; KUBOTA, Y.; MATSUMOTO, K.; NAKAJIMA, T.; SUN, X-M.; WATANABE, T.; SAITO, H.; OHTSU, H. Identification of novel mast cell genes by serial analysis of gene expression in cord blood-derived mast cells. **FEBS Letters**, v.498, p.37-41, 2001.

LANE, T.F.; SAGE, E.H. The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions, **FASEB Journal**, v.8, p.163-173, 1994.

LAVRANOS, T.C.; RODGERS, H.F.; BERTONCELLO, I.; RODGERS, R.J. Anchorage-independent culture of bovine granulosa cells: the effects of basic fibroblast growth factor and dibutyl camp on cell division and differentiation, **Experimental Cellular Research**, v.211, p.245-251, 1994.

LORENZ, W.W.; DEAN, J.F. SAGE profiling and demonstration of differential gene expression along the axial development gradient in lignifying xylem in loblolly pine (*Pinus taeda*), **Tree Physiology**, v.22, p.301-310, 2002.

LUCK, M.R.; ZHAO, Y.; SILVESTER, L.M. Identification and localization of collagen types I and IV in the ruminant follicle and corpus luteum, **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.49, p.517-521, 1995.

MADDEN, S.L.; ZHOU, W.; VELSULESCU, V.E.; KERN, S.E.; HRUBAN, R.H.; HAMILTON, S.R.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. SAGE transcript profiles for p53-dependent growth regulation. **Oncogene**, v.15, p.1079-1085, 1997.

MARGULIES, E.H.; INNIS, J.W. eSAGE: managing and analysing data generated with Serial Analysis of Gene Expression (SAGE). **Bioinformatics**, v.16 (7) p.650-651, 2000.

MARTIN, K.J.; PARDEE, A.B. Principles of differential display. **Methods in Enzymology**, v. 303, p.234-258, 1999.

MATSUMURA, H.; NIRASAWA, S.; TERAUCHI, R. Technical advance: transcript profiling in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings using serial analysis of gene

expression (SAGE), **Plant Journal**, v.20, p.719-726, 1999.

MCARTHUR, M.E.; IRVING-RODGERS, H.F.; BYERS, S.; RODGERS, R.J. Identification and immunolocalisation of decorin, versican, perlecan, nidogen, and chondroitin sulfate proteoglycans in bovine small ovarian follicles, **Biology of Reproduction**, v.63, p.913-924, 2000.

MCINTUSH, E.W.; SMITH, M.F. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in ovarian function, **Rev Reprod**, v.3, p.23-30, 1998.

MCRAE, R.S.; JOHNSTON, H.M.; MIHM, M.; O'SHAUGHNESSY, P.J. Changes in mouse granulosa cell gene expression during early luteinization, **Endocrinology**, v.146, p.309-317, 2005.

MEREDITH JR, J.A.; FAZELI, B.; SCHWARTZ, M.A. The extracellular matrix as a cell survivor factor, **Molecular Biology of the Cell**, v.4, p.853-961, 1993.

MICHELIS, E.; OUSSOREN, E.; VAN GROENIGEN, M.; PAUWS, E.; BOSSUYT, P.M.M.; VOUTE, P.A.; BAAS, F. Genes differentially expressed in medulloblastoma and fetal brain. **Physiology Genomics**, v.1 (2), p.83-91, 1999.

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

MIHM, M.; AUSTIN, E.J. The final stages of dominant follicle selection in cattle, **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.155-166, 2002b.

MILLER, W.L. Molecular biology of steroid hormone synthesis, **Endocr Rev**, v.9, p.295-318, 1988.

NAKADA, K.; MORIYOSHI, M.; NAKAO, T. Changes in peripheral levels of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in prepubertal heifers after estradiol treatment, **Journal of Reproduction Development**, v.47, 2001

NEILSON, L.; ANDALIBI, A.; KANG, D.; COUTIFARIS, C.; STRAUSS, J.F.^{3RD}; STANTON, J.A.; GREEN, D.P. Molecular phenotype of the human oocyte by PCR-SAGE. **Genomics**, v.63 (1), p.13-24, 2000.

NILSSON, E.; PARROTT, J.A.; SKINNER, M.K. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis, **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.175, p.123-130, 2001.

NOGUEIRA, G.P. **Puberdade em novilhas Nelore**. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 89p., 2003.

OTSUKA, M.; KISHI, H.; ARAI, K.; WATANABE, G.; TAYA, K.; GREENWALD, G.S. Temporal changes in inhibin, steroid hormones, and steroidogenic enzymes during induced follicular atresia in the hypophysectomized cyclic hamster, **Biology of Reproduction**, v.56, p.423-429, 1997.

PAUWS, E.; MORENO, J.C.; TIJSEN, M.; BAAS, F.; DE VIJLDER, J.J.; RISTALPERS, C.. Serial analysis of gene expression as a tool to assess the human thyroid expression profile and to identify novel thyroidal genes. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.85 (5), p.1923-1927, 2000.

PEREIRA, R.C.; DURANT, D.; CANALIS, E. Transcriptional regulation of connective tissue growth factor by cortisol in osteoblasts, **American Journal of Physiology**, v.279, p.E570-E576, 2000.

POLYAK, K.; XIA, Y.; ZWEIER, J.L.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. A model for p53 induced apoptosis. **Nature**, v.389, p.300-305, 1997.

POWELL, J. Enhanced concatemer cloning - a modification to the SAGE (serial analysis of gene expression) technique. **Nucleic Acids Research**, v.26, p.3445-3446, 1998.

REICH, R.; TSAFRIRI, A.; MECHANIC, G.L. The involvement of collagenolysis in ovulation in the rat, **Endocrinology**, v.116, p.522-527, 1985.

ROBERTS, R.D.; ELLIS, R.C. Mitogenic effects of fibroblast growth factors on chicken granulosa and theca cells in vitro, **Biology of Reproduction**, v.61, p.1387-1392, 1999.

RODGERS, R.J.; IRVING-RODGERS, H.; RUSSELL, D.L. Extracellular matrix of the developing ovarian follicle, **Reproduction**, v.126, p.415-424, 2003.

RODGERS, R.J.; VAN WEZEL, I.L.; IRVING-RODGERS, H.F.; LAVRANOS, T.C.; IRVINE, C.M.; KRUPA, M. Roles of extracellular matrix in follicular development, **Journal of Reproduction and Fertility Suppl.**, v.54, p.343-352, 1999.

RYO, A.; SUZUKI, Y.; ICHIYAMA, K.; WAKATSUKI, T.; KONDOH, N.; HADA, A.; YAMAMOTO, M.; YAMAMOTO, N. Serial analysis of gene expression in HIV-1-infected T cell lines, **FEBS Letters**, v.462, p.182-186, 1999.

SAHA, S.; SPARKS, A.B.; RAGO, C.; AKMAEV, V.; WANG, C.J.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W.; VELCULESCU, V.E. Using transcriptome to annotate the genome, **Nature Biotechnology**, v.19, p.508-512, 2002.

SEGALOFF, D.L.; WANG, H.; RICHARDS, J.S. Hormonal regulation of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor mRNA in rat ovarian cells during follicular development and luteinization, **Molecular Endocrinology**, v.4, p.1856-1865, 1990.

SETH, A.; LEE, B.K.; QI, S.; VARY, C.P. Coordinate expression of novel genes during osteoblast differentiation. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.15 (9), p.1683-1696, 2000.

SILCOX, R.W.; POWELL, K.L.; KISER, T.E. Ability of dominant follicles to respond to exogenous GnRH administration is dependent on their stage of

development, **Journal of Animal Science**, v.71, suppl.1, p.219, 1993.

SILVA, J.M.; PRICE, C.A. Effect of follicle-stimulating hormone on steroid secretion and messenger ribonucleic acids encoding cytochromes P450 aromatase and cholesterol side-chain cleavage in bovine granulosa cells *in vitro*, **Biology of Reproduction**, v.62, p.186-191, 2000.

SILVA, J.M.; PRICE, C.A. Insulin and IGF-I are necessary for FSH-induced cytochrome P450 aromatase but not cytochrome P450 side-chain cleavage gene expression in oestrogenic bovine granulosa cells *in vitro*, **Journal of Endocrinology**, v.174, p.499-507, 2002.

SKINNER, M.K.; COFFEY JR, M.J. Regulation of ovarian cell growth through the local production of transforming growth factor-alpha by theca cells, **Endocrinology**, v.123, p.2632-2638, 1988.

SLEE, R.B.; HILLIER, S.G.; LARGUE, P.; HARLOW, C.R.; MIELE, G.; CLINTON, M. Differentiation-dependent expression of connective tissue growth factor and lysyl oxidase messenger ribonucleic acids in rat granulosa cells, **Endocrinology**, v.142, p.1082-1089, 2002.

SPICER, L.J.; STEWART, R.E. Interactions among basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin, and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cell numbers and steroidogenesis of bovine thecal cells: role of IGF-I receptors, **Biology of Reproduction**, v.54, p.255-263, 1996.

ST CROIX, B.; RAGO, C.; VELCULESCU, V.; TRAVERSO, G.; ROMANS, K.E.; MONTGOMERY, E.; LAL, A.; RIGGINS, G.J.; LENGAUER, C.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Genes expressed in human tumor endothelium. **Science**, v.289 (5482), p.1197-1202, 2000.

STEINKAMPF, M.P.; MENDELSON, C.R.; SIMPSON, E.R. Regulation by follicle-stimulating hormone of the synthesis of aromatase cytochrome P-450 in human granulosa cells, **Molecular Endocrinology**, v.1, p.465-471, 1987.

STERKY, F.; LUNDEBERG, J. Sequence analysis of genes and genomes. **Journal of Biotechnology**, v.76, p.1-31, 2000.

STOCCO, D.M.; CLARK, B.J. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells, **Endocrine Reviews**, v.17, p.221-244, 1996.

SUZUKI, T.; HASHIMOTO, S.I.; TOYODA, N.; NAGAI, S.; YAMAZAKI, N.; DONG, H.Y.; SAKAI, J.; YAMASHITA, T.; KUKIWA, T.; MATSUSHIMA, K. Comprehensive gene expression profile of LPS-stimulated human monocytes by SAGE. **Blood**, v.96 (7), p.2584-2591, 2000.

THOMSON, M. Molecular and cellular mechanisms used in the acute phase of stimulated steroidogenesis. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells, **Hormones and Metabolism Research**, v.30, p.16-28, 1998.

TILLY, J.L.; BILLIG, H.; KOWALSKI, K.I.; HSUEH, A.J. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism, **Molecular Endocrinology**, v.6, p.1942-1950, 1992.

VAN DEN BERG, A.; VAN DER LEIJ, J.; POPPEMA, S. Serial analysis of gene expression: rapid RT-PCR analysis of unknown SAGE tags. **Nucleic Acids Research**, v.27 (17), e17, 1999.

VELCULESCU, V.E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Serial analysis of gene expression. **Science**, v.270, p.484-487, 1995.

VELCULESCU, V.E.; ZHANG, L.; ZHOU, W.; VOGELSTEIN, J.; BASRAI, M.A.; BASSETT, D.E.; HIETER, P.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Characterization of the yeast transcriptome. **Cell**, v.88, p.243-251, 1997.

VERNON, R.K.; SPICER, L.J. . Effects of basic fibroblast growth factor and heparin on follicle-stimulating hormone-induced steroidogenesis by bovine granulosa cells, **Journal of Animal Science**, v.72, p.2696-2702, 1994.

VIETOR, I.; HUBER, L.A. In search of differentially expressed genes and proteins. **Biochimica and Biophysica Acta**, v.1359, p.187-199, 1997.

VIRLON, B.; CHEVAL, L.; BUHLER, J.M.; BILLON, E.; DOUCET, A.; ELALOUF, J.M. Serial microanalysis of renal transcriptomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.96 (26), p.15286-15291, 1999.

WANDJI, S.A.; GADSBY, J.E.; BARBER, J.A.; HAMMOND, J.M. Messenger ribonucleic acids for MAC25 and connective tissue growth factor (CTGF) are inversely regulated during folliculogenesis and early luteogenesis, **Endocrinology**, v.141, p.2648-2657, 2000.

WANG, S.M.; ROWLEY, J.D. A strategy for genome-wide gene analysis: Integrated procedure for gene identification. **Proceedings in the National Academy of Sciences USA**, v.95, p.11909-11914, 1998.

WELLE, S.; BHATT, K.; THORNTON, C.A. High-abundance mRNAs in human muscle: comparison between young and old. **Journal of Applied Physiology**, v.89 (1), p.297-304, 2000.

WELLE, S.; BHATT, K.; THORNTON, C.A. Inventory of high-abundance mRNAs in skeletal muscle of normal men. **Genome Research**, v.9 (5), p.506-513, 1999.

WOLFE, M.W.; ROBERSON, M.S.; STUMPF, T.T.; KILTOK, R.J.; KINDER, J.E. Modulation of luteinizing hormone and follicle-stimulating opioids and oestradiol during the peripubertal period in heifers, **Journal of Reproduction and Fertility**, v.96, p.165-174, 1992.

WOMACK, J. E., The goals and status of the bovine gene map. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p.1199- 1203, 1993.

XU, L.L.; SHANMUGAN, N.; SEGAWA, T.; SESTERHENN, I.A.; MCLEOD, D.G.; MOUL, J.W.; SRIVASTAVA, S. A novel adrogen-regulate3d gene, PMEPA1, located on chromosome 20q13 exhibits high level expression in prostate. **Genomics**, v.66 (3), p.257-263, 2000.

XU, Z.; GARVERICK, H.A.; SMITH, G.W.; SMITH, M.F.; HAMILTON, S.A.; YOUNGQUIST, R.S. Expression of messenger ribonucleic acid encoding cytochrome P450 side-chain cleavage, cytochrome P450 17 α -hydroxylase, and cytochrome P450 aromatase in bovine follicles during the first follicular wave, **Endocrinology**, v.136, p.981-989, 1995.

YAMAMOTO, M.; WAKATSUKI, T.; HADA, A.; RYO, A. Use of serial analysis of gene expression (SAGE) technology. **Journal of Immunological Methods**, v.250, p.45-66, 2001.

YAMASHITA, T.; HASHIMOTO, S.; KANSKO, S.; NAGAI, S.; TOYODA, N.; SUZUKI, T.; KOBAYASHI, K.; MATSUSHIMA, K. Comprehensive gene expression profile of a normal human liver. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.269 (1), p.110-116, 2000.

YAMASHITA, T.; KANEKO, S.; HASHIMOTO, S.I.; SATO, T.; NAGAI, S.; TOYODA, N.; SUZUKI, T.; KOBAYASHI, K.; MATSUSHIMA, K. Serial analysis of gene expression in chronic Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.282, p.647-654, 2001.

YING, S.Y.; BECKER, A.; LING, N.; VENO, N.; GUILLEMIN, R. Inhibin and beta type transforming growth factor (TGF β) have opposite modulating effects on the follicle stimulating hormone (FSH) induced aromatase activity of cultured rat granulosa cells, **Biochemican and Biophysical Research Communications**, v.139, p.969-975, 1986.

ZAGO *et al.*, 1994 *apud* GURGEL, .A.S.A. ,1998, p.6

ZHANG, L.; ZHOU, W.; VELCULESCU, V.E.; KERN, S.E.; HRUBAN, R.H.; HAMILTON, S.R.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Gene expression profiles in normal and cancer cells. **Science**, v.276, p.1268-1272, 1997.

ZHAO, Y.; LUCK, M.R. Gene expression and protein distribution of collagen, fibronectin and laminin in bovine follicles and corpora lutea, **Journal of Reproduction and Fertility**, v.104, p.115-123, 1995.

8 Anexo

ANEXO - Reagentes utilizados e suas formulações

Reagente	Formulação
0.1 M Dithiothreitol (DTT)	Em água DEPC
Acetato de Amônio 7,5 M	Em água DEPC
Adaptador A	<i>double-strand</i> DNA 40 ng/μl em LoTE
Adaptador B	<i>double-strand</i> DNA 40 ng/μl em LoTE
Antibiótico Zeocin™	100 mg/ml em água
BSA 100X	BSA 10 mg/ml em: Fosfato de potássio 20 mM, pH 7 NaCl 50 mM EDTA 0.1 mM Glicerol 5% (m/v)
<i>Bsm</i> F I	2 U/μl em: NaCl 50 mM Tris-HCl 10 mM, pH 7.4 EDTA 0.1 mM DTT 1 mM BSA 200 μg/ml Glicerol 50% glycerol (m/v)
<i>Control HeLa Total RNA</i>	500 ng/μl em água tratada com DEPC
Control Template I-SAGE™	20 pg/ml em água DEPC
Ditag Primer-1 (DTP-1)	175 ng/μl em água DEPC
Ditag Primer-2 (DTP-2)	175 ng/μl em água DEPC
DNA Controle pUC19	10 pg/μl em Tris-HCl 5 mM, EDTA 0.5 mM, pH 8

DNA Ligase de <i>E. coli</i>	10 U/μl em: Tris-HCl 10 mM, pH 7.4 KCl 50 mM EDTA 0.1 mM DTT 1m M BSA 200 μg/ml Glicerol 50% (m/v) Triton® X-100 0.1%
DNA Ligase T4	Weiss 4.0 unidades/μl em: Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 <i>potassium chloride</i> 50 mM DTT 1 mM Glicerol 50% (m/v)
DNA Polimerase de <i>E. coli</i>	10 U/μl em: fosfato de potássio 50 mM, pH 7.4 KCl 100 mM DTT 1 mM Glicerol 50% (m/v)
dNTP Mix (10 mM cada)	dATP 10 mM dGTP 10 mM dCTP 10 mM dTTP 10 mM em água DEPC
DTP-1	5.-GGATTGCTGGTGCAGTACA-3.
DTP-2	5.-CTGCTCGAATTCAAGCTTCT-3.
Dynal Oligo (dT) Magnetic Beads	5 mg/ml em PBS contendo azida sódica 0,02%
EDTA 0,5 M	EDTA 0.5 M em água deionizada
LoTE	Tris-HCl 3 mM, pH 7.5 EDTA 0.2 mM, pH 7.5

<i>Muscel Glycogen</i>	20 mg/ml em água DEPC
<i>Nla III</i>	10 U/μl em KCl 200 mM Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 EDTA 0.1 mM DTT 1 mM BSA 500 μg/ml Glicerol 50% (m/v)
Polimerase Klenow	3–9 U/μl em: fosfato de potássio 50 mM, pH 7.0 KCl 100 mM DTT 1 mM Glicerol 50% (m/v)
Rnase H de <i>E. coli</i>	2 U/μl em: Tris-HCl 20 mM, pH 7.5 KCl 100 mM MgCl ₂ 10 mM EDTA 0.1 mM DTT 0.1 mM BSA 50 μg/ml Glicerol 50% (m/v)
RNaseOUT™	40 U/μl em: Tris-HCl 20 mM, pH 8 KCl 50 mM EDTA 0.5 mM DTT 8 mM Glicerol 50% (m/v)
SOC Medium (pode ser mantido à temperatura ambiente ou +4°C)	Tripton 2% Extrato de levedura 0.5% NaCl 10 mM KCl 2.5 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 10 mM Glicose 20 mM

<i>Sph</i> I	5 U/μl em: NaCl 100 mM Tris-HCl 10 mM, pH 7.4 EDTA 0.1 mM DTT 1 mM BSA 100 μg/ml Glicerol 50% (m/v)
Tampão 2 10X	Tris-HCl 100 mM, pH 7.9 MgCl ₂ 10 mM NaCl 50 mM DTT 1 mM
Tampão 4 10X	Tris-acetato 200 mM, pH 7.9 Acetato de magnésio 100 mM Acetato de potássio 500 mM DTT 10 mM
Tampão 4 1X	Tris acetato 20 mM, pH 7.9 Acetato de magnésio 10 mM Acetato de potássio 50 mM DTT 1 mM BSA 200 μg/ml
Tampão BV 10X	Sulfato de amônio 166 mM Tris-HCl 670 mM, pH 8.8 MgCl ₂ 67 mM β-mercaptoetanol 100 mM
Tampão da Ligase 10X	Tris-HCl 60 mM, pH 7.5 MgCl ₂ 60 mM NaCl 50 mM BSA 1 mg/ml β-mercaptoetanol 70 mM ATP 1 mM DTT 20 mM <i>spermidine</i> 10 mM
Tampão da Ligase 1X	Tampão de Ligase 10X é diluído a 1X em água DEPC
Tampão da Primeira Fita 1X	Tris-HCl 50 mM, pH 8.3 KCl 75 mM MgCl ₂ 3 mM <i>muscel glycogen</i> 10 μg/ml
Tampão da Primeira Fita 5X	Tris-HCl 250 mM, pH 8.3 KCl 375 mM MgCl ₂ 15 mM

	Transcriptase Reversa SuperScript™ II
Tampão da Segunda Fita 5X	Tris-HCl 100 mM, pH 6.9 KCl 450 mM MgCl ₂ 23 mM β-NAD ⁺ 0.075 mM sulfato de amônio 50 mM
Tampão de Lavagem A	Tris-HCl 10mM, pH 7,5 LiCl 0,15M EDTA 1 mM Lithium dodecyl sulfate 0,1% Glicogênio 10 □g/ml
Tampão de Lavagem B	Tris-HCL 10mM, pH 7,5 LiCl 150 mM EDTA 1 mM Glicogênio 10 µg/ml
Tampão de Lavagem C	Tris 5 mM, pH 7.5 EDTA 0.5 mM NaCl 1 M Dodecil sulfato de sódio 1% mussel glycogen 10 µg/ml
Tampão de Lavagem D	Tris 5 mM, pH 7.5 EDTA 0.5 mM NaCl 1 M BSA 200 µg/ml
Tampão de Ligase 10X	Tris-HCl 60 mM, pH 7.5 MgCl ₂ 60 mM NaCl 50 mM BSA 1 mg/ml β-mercaptoetanol 70 mM ATP 1 mM DTT 20 mM <i>spermidine</i> 10 mM

Tampão de Lise e Ligação	Tris-HCl 100 mM, pH 7.5 LiCl 500 mM EDTA 10 mM lithium dodecyl sulfate 1% DTT 5 mM
Tampão Klenow 10X	Tris-HCl 500 mM, pH 8.0 MgCl ₂ 100 mM NaCl 500 mM
Tampão TE	Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 EDTA 1 mM
<i>Test Inserts, Blunt Ended ϕX174 Hae III DNA</i>	20 ng/ μ l em tampão TE, pH 7.5
Transcriptase Reversa SuperScript™ II	200 U/ μ l em: Tris-HCl 20 mM, pH 7.5 NaCl 100 mM EDTA 0.1 mM DTT 1 mM Nonidet-40 0.01% (v/v) Glicerol 50% (m/v)
Tris/HCl 3 mM	Tris-HCl 3 mM, pH 7.5
Vetor pZErO®-1, <i>supercoiled</i>	1 μ g/ μ l em tampão TE, pH 7.5