LUCIANA ALVES DE FÁTIMA

Análise diferencial da expressão gênica e proteica no corpo lúteo de bovinos submetidos a tratamentos com eCG

São Paulo

2012

LUCIANA ALVES DE FÁTIMA

Análise diferencial da expressão gênica e proteica no corpo lúteo de bovinos submetidos a tratamentos com eCG

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa

Coorientador:

Prof. Dr. Mario Binelli

São Paulo

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

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA USP 15 1 P 112

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2642	Fátima, Luciana Alves de
FMVZ	Análise diferencial da expressão gênica e proteica no corpo lúteo de bovinos submetidos a tratamentos com eCG / Luciana Alves de Fátima 2012. 176 f. : il.
	Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2012.
	Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.
	Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.
	Orientador: Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa.
	Coorientador: Prof. Dr. Mario Binelli.
	1. eCG. 2. Corpo lúteo. 3. Progesterona. 4. Esteroidogênese. 5. FSH. 1. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Análise diferencial da expressão gênica e protéica no corpo lúteo de bovinos submetidos a tratamentos com eCG", utilizando 21 (vinte e um) bovinos, protocolado sob o nº1638/2009, sob a responsabilidade da Profa Dra Paula de Carvalho Papa, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/04/09.

We certify that the Research "Differential analysis of gene and protein expression in bovine corpus luteum submitted to treatment with eCG", utilizing 21 (twenty one) bovine, protocol number 1638/2009, under the responsibility Profa Dra Paula de Carvalho Papa, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 04/22/09.

São Paulo, 23 de abril de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni Vice-Presidente da Comissão de Bioética FMVZ/USP



Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87 Cidade Universitória "Armando de Salles Oliveira" São Paulo/SP - Brasil 05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757 fore: + 55 11 3091-7671/7676 E-mail: 5nvz@usp.br http://www.fmvz.osp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FÁTIMA, Luciana Alves

Título: Análise diferencial da expressão gênica e proteica no corpo lúteo de bovinos submetidos a tratamentos com eCG

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data___/___/

Banca Examinadora

Prof. Dr		
Instituição:	Julgamento:	
Prof. Dr		
Instituição:	Julgamento:	
Prof. Dr		
Instituição:	Julgamento:	
Prof. Dr		
Instituição:	Julgamento:	
Prof. Dr		
Instituição:	Julgamento:	

O sucesso é a soma de pequenos esforços- repetídos día sím, e no outro día também...

Robert Collier

DEDICATÓRIA

Ao meu companheiro **Sandro**, por estar sempre ao meu lado, pelo amor, respeito e incentivo, pela dedicação e ajuda a qualquer hora, e paciência e sabedoria para transmitir seu conhecimento e experiência. Você faz parte deste trabalho e por isto o dedico a você com todo meu amor e carinho. Te amo-muito!

Aos meus país, **Irení** e **José María**, que sempre se esforçaram para passar à família a importância de estudar e de sonhar com um futuro maís promíssor. Que mesmo com a distância acompanham a realização deste sonho com muito amor e carinho

Amo vocês!

AGRADECIMENTO MAIS QUE ESPECIAL.....

Gostaría de agradescer a **Deus** de todo meu coração por me mostrar um camínho de luz....em busca da sabedoría....e encher o meu coração de paz e amor.....

Obrígada.....por guíar os meus passos

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À mínha orientadora, **Profa**. **Dra**. **Paula de Carvalho Papa**, que proporcionou a oportunidade de estar aquí e seguir por este caminho tortuoso. Com seu jeito às vezes meigo, outras vezes mais durão ela consegue passar seu conhecimento e proporcionar o crescimento profissional e pessoal essencial ao aluno de pósgraduação. Obrigada pela confiança!!!

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento desta tese contou com a colaboração de inúmeras pessoas, sem as quais isso não sería possível...

A **mínha família** pelo apoío em todos os momentos. É complicado estar longe de todos...

A **Faculdade Medícína Veterínária e Zootecnía da Universídade de São Paulo** por disponibilizar infraestrutura de qualidade para o desenvolvimento técnico, científico e pessoal.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Marío Binellí, pelos ensinamentos.

Aos Professores do setor de Anatomía, **Dra. María Angélica Míglino,** Francisco Javier H. Blasquez, José Roberto Kfoury Júnior, Pedro Primo Bombonato, pelo aprendizado durante as aulas de Pós-Graduação, e por terem disponibilizado seus laboratórios para execução dos experimentos.

Ao Professor **Píetro Sampaío Barusellí** pela ajuda imprescindível na formulação do delineamento experimental, e por ter disponibilizado seus alunos para nos ajudar na aplicação dos protocolos.

A **Lídsay Gímenes** por ter dísponíbilízado tempo para realização dos protocolos hormonais aquí utilízados.

Prof. **Francisco Paula Rennó**, por disponibilizar as dependências de seu laboratório para a manutenção dos animais durante a execução deste trabalho.

Aos **funcionários do setor de Anatomía Maicon e Jackelíne, Díogo, Edinaldo (Índío) e Ronaldo** pela consideração, simpatía e auxilio durante a minha estada neste programa.

A Liza amiga e companheira de todos os días por ter ajudado em muitos momentos e principalmente na finalização deste trabalho.

Agradescimento especial aos amigos e colegas de laboratório, **Vanessa Uemura, Renata Sílva e Valdír Pavanelo,** pela ajuda durante a realízação deste trabalho, pela companhia e amizade. Aos também amigos e colegas de laboratário <mark>Antenor Bonfin, Giuliano</mark> Lesnau, Gabriela, Jaqueline. e Juliana

À professora e amiga **Dra. Danila** pelas conversas, ensinamentos, paciência e dedicação.

Aos amígos, sempre amígos **Regina Bolína**, **Paulo Herrínque e Lucíana Isquíerdo** pela força, amízade e pacíência.

Aos **amígos e colegas de pós-graduação** com os quais compartilhei novas experiências e conhecimentos.

À **Fundação de Amparo à Pesquísa do Estado de São Paulo (FAPESP)** e a esta coordenadoría pelo indíspensável suporte financeiro concedido através de bolsa de Doutorado (Processo: 2008/58839-8) e de Auxílio Financeiro (Processo: 2008-58837-5).

RESUMO

FÁTIMA, L. A. Análise diferencial da expressão gênica e proteica no corpo lúteo de bovinos submetidos a tratamentos com eCG. [Differential analysis of the gene and protein expression in bovine corpus luteum under eCG treatments]. 2012. 176 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A gonadotrofina coriônica equina (eCG) tem sido utilizada em programas de sincronização para inseminação artificial em tempo fixo e normalmente promove o aumento do volume do corpo lúteo e a da produção de progesterona. Além disso, esta mesma gonadotrofina pode ser utilizada para superovulação. Desse modo, hipóteses relativas aos mecanismos pelos quais gonadotrofinas exógenas alteram as funções celulares nos corpos lúteos resultantes foram formuladas. Para testar tais hipóteses, 18 vacas (Bos indicus) foram divididas em grupos: controle (n=5), estimulado (n=6) e superovulado (n=7) e a ovulação das mesmas foi sincronizada usando um protocolo já estabelecido com dispositivo de progesterona. Os animais estimulados receberam 400 UI de eCG no dia de remoção do dispositivo de progesterona e os animais superovulados 4 dias antes. No dia 7 após injeção de GnRh, os animais foram abatidos para a coleta de CLL e sangue. Análises de peso e volume de CL, concentração de progesterona (P4), bem como da expressão gênica e proteica de fatores angiogênicos e de proteínas esteroidogênicas foram realizadas. Além disso, o transcriptoma foi analisado por microarranjo. Foi observado que o volume do CL foi maior nos animais do grupo estimulado (1177,37 \pm 167,07 mm³) e ainda maior nos do superovulado (1495,18 \pm 137,01 mm³) quando comparados ao grupo controle (830,33 \pm 234,99 mm³; p = 0,03). A concentração média de progesterona por CL nos animais do grupo estimulado foi maior que nos animais do grupo controle $(5,95 \pm 0,17 \text{ vs } 3,69 \pm 0,72 \text{ ng/ml}; p = 0,03)$ e que nos superovulados (4,11 \pm 0.73; p = 0,01). Além disso, os tratamentos com eCG aumentaram a expressão do FGFR2 e também da STAR nos animais estimulados e superovulados (p < 0,05). Quanto aos resultados do microarranjo, no total 242 transcritos foram aumentados e 111 foram diminuídos nos animais estimulados e 111 foram aumentados e 113 diminuídos nos animais superovulados em relação aos animais controle (~1,5 vezes, $p \le 0.05$). Entre os genes diferencialmente expressos, muitos estavam envolvidos na síntese de lipídios e na produção de progesterona, tais como: PPARG, HMGCR, STAR, receptores de prolactina e folistatina. Estes achados demonstraram que os tratamentos com eCG modularam a expressão gênica diferencialmente, dependendo do tratamento, e que nossos dados contribuem para entender as vias relacionadas ao aumento do volume do CL e da produção de progesterona observada após os tratamentos. Em um segundo experimento, foi realizado análises da influência do FSH na expressão de VEGF no cultivo de células da granulosa. Neste experimento foi possível observar que o FSH aumentou a expressão gênica e proteica do VEGF, colaborando com a ideia de que as gonadotrofinas têm propriedades angiogênicas.

Palavras-chave: eCG. Corpo lúteo. Progesterona. Esteroidogênese

ABSTRACT

FÁTIMA, L. A. **Differential analysis of the gene and protein expression in bovine corpus luteum under eCG treatments**. [Análise diferencial da expressão gênica e proteica no corpo lúteo de bovinos submetidos a tratamentos com eCG]. 2012. 176 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Equine chorionic gonadotropin (eCG) has been widely used in synchronization protocol to artificial insemination program and usually promote corpus luteum (CL) volume increases and stimulates progesterone production. Furthermore the same gonadotropin can be used to superovulation protocols. Thus, hypotheses concerning the mechanisms by which exogenous gonadotropins alter cellular functions in resulting corpora lutea were formulated. To test that hypothesis, 18 (Bos indicus) cows were divided into control (n=5), stimulated (n=6) and superovulated groups (n=7). Ovulation was synchronized using a progesterone device-based protocol. Stimulated animals received 400 IU of eCG of device removal and superovulated animals received 2000 IU of eCG 4 days prior. Corpora lutea (CLL) and blood samples were collected seven days after GnRH administration. Analyses of CL weight and volume, progesterone (P4) concentration, as well as the gene and protein expression of angiogenic and steroidogenic proteins were performed. Furthermore, the transcriptome was evaluated by microarray. The CL volume was higher in superovulated (1495.18 ± 137.01) than in stimulated (1177.37 \pm 167.07) cows and higher in stimulated than in the control (830.33 \pm 234.99) cows, and the P4 concentration per CL was higher in stimulated ($5.95 \pm 0.17 \text{ ng/ml}$) animals than in the control (3.69 \pm 0.72 ng/ml) and superovulated (4.11 \pm 0.73 ng/ml; P = 0.01) animals. Overall, 242 transcripts were up-regulated and 111 transcripts were downregulated in stimulated cows ($P \le 0.05$) and 111 were up-regulated and 113 down-regulated in superovulated cows in relation to the control (1.5 fold, $P \le 0.05$). Among the differentially expressed genes, many were involved in lipid biosynthesis and progesterone production, as PPARG, HMGCR, STAR, prolactin receptors and follistatin. In conclusion, eCG modulates gene expression differently depending on the treatment. Our data contribute to the understanding of the pathways involved in increased CL volume and progesterone levels observed after eCG treatment. In a second experiment, analyzes were performed about the influence of FSH on the expression of VEGF in the culture of granulosa cells. In this experiment it was observed that FSH increases the expression of the VEGF gene and protein, these finding collaborate with the idea that gonadotrophins have angiogenic properties.

Keywords: eCG. Corpus luteum. Progesterone. Steroidogenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Modelo esquemático dos tratamentos utilizados nos animais controle, estimulado e superovulado. D = dia; T = tempo; BE = benzoato de estradiol; PGF2 α = Prostaglandina 2 α ; P4 = progesterona; n = número de animais
Figura 2 - Eletroferograma com respectivo número RIN de cada amostra. Os dois picos principais representam as bandas ribossomais 18 e 28 S
 Figura 3 – Imagem do CL e seu respectivo fluxo sanguíneo (porção colorida na imagem) de gravações do exame ultrassonográfico com Doppler realizado no dia 5 após a ovulação. A – grupo controle; B – grupo estimulado. Gráfico representando o valor da razão pixel/área
Figura 4 – Gráficos representando o volume (A) e peso (B) dos CLL dos animais dos grupos controle, estimulado e superovulado no dia seis após a ovulação. Os valores estão expressos em média e erro padrão da média. Diferentes letras significam diferença significativa
Figura 5 – Gráficos representando o volume (A) e peso (B) dos CLL dos animais dos grupos controle, estimulado e superovulado no dia 7 após injeção de GnRh. Os valores estão expressos em média e erro padrão da média. Diferentes letras significam diferença significativa para p < 0,05
Figura 6 – Diagrama de Venn Diagram – número de genes com a expressão aumentada e diminuída 1,5 vezes (P ≤ 0.05) nos animais estimulados e superovulados em relação ao controle e o estimulado em relação ao superovulado. Estim – grupo estimulado; Sup – grupo superovulado
Figura 7 – Interação entre alguns dos genes que foram analisados por PCR. Esta interação entre os genes é construída pelo programa IPA a partir dos resultados do microarranjo. Em vermelho – mais aumentados; em branco – sem alteração
Figura 8 - Expressão relativa do mRNA da STAR (A), HSD3B (B) e CYP11A1 (C) no corpo lúteo dos animais dos grupos controle, estimulado e superovulado no dia 7 após injeção de GnRh. Os dados são representados por média e erro padrão. Diferentes letras significam diferença significativa para P < 0,05. Tubulina, alfa foi usado como gene de referência
Figura 9 - Expressão relativa do mRNA do VEGF (A), FLT1 (B), KDR (C), FGF2 (D), FGFR1(E) e FGFR2 (F) no corpo lúteo bovino dos animais dos grupos controle, estimulado e superovulado no dia 7 após injeção de GnRh. Dados são representados por média e erro padrão
Figura 10 - Expressão gênica em corpo lúteo bovino nos animais do grupo controle, estimulado

Figura 10 - Expressão gênica em corpo lúteo bovino nos animais do grupo controle, estimulado e superovulado no dia 7 após injeção de GnRh determinado por qPCR em tempo real do genes: *CD36*, *FABP5*, *PPARG*; *CYP27A*, *ACSF2*, *HMGCR* e *NCEH1*. Resultados

expressos em média ± erro padrão; barras com letras diferentes correspondem a diferencas significativas (P < 005) entre os grupos. GAPDH e tubulina, alfa foram Figura 11 - Expressão gênica em corpo lúteo bovino nos animais dos grupos controle, estimulado e superovulado no dia 7 após injecão de GnRh determinado por qPCR em tempo real dos genes: PRLRS, PRLRL, folistatina e TGFB2. Resultados expressos em média \pm EPM; barras com letras diferentes correspondem a diferenças significativas (P < 005) entre os grupos. GAPDH e tubulina, alfa foram usados como genes de referência......79 Figura 12 - Fotomicrografias da localização da proteína VEGF no corpo lúteo bovino. A controle, B - estimulado (400 UI de eCG), C - superovulado (2000 UI de eCG) e D controle negativo. Observar a reação citoplasmática positiva nas células grandes e pequenas (seta preta), pericito (seta vermelha) e do estroma (seta amarela). Barra: Figura 13 - Fotomicrografias da localização da proteína FLT1 no corpo lúteo bovino. A controle, B - estimulado (eCG), C - superovulado e D - controle negativo. Observar a reação citoplasmática positiva nas células grandes e pequenas (seta preta), pericitos Figura 14 - Fotomicrografias da localização da proteína KDR no corpo lúteo bovino. A controle, B - estimulado (eCG), C - superovulado e D - controle negativo. Observar a reação citoplasmática positiva nas células grandes e pequenas (seta preta), pericitos Figura 15 - Fotomicrografias da localização da proteína da P450scc no corpo lúteo bovino. A (controle), B estimulado (eCG), C superovulado, D Controle negativo. Observar a reação citoplasmática positiva nas células luteínicas grandes (seta amarela) e pequenas Figura 16 - Fotomicrografias da localização da proteína da enzima HSD3B no corpo lúteo bovino. A – controle: B – estimulado (eCG), C – superovulado, D – controle negativo. Observar a reação citoplasmática positiva nas células luteínicas grandes (seta amarela) Figura 17 - Expressão das proteínas STAR, Folistatina e HMGCR no corpo lúteo bovino coletado no dia 7 após injeção de GnRh pela técnica de imunofluorescência. Sinal positivo (vermelho para STAR e HMGCR ou verde para folistatina) pode ser observado no citoplasma das células grandes (setas cheias) e pequenas (setas vazias) nos animais do grupo controle, estimulado e superovulado. (CN) controle negativo. Figura 18 - Expressão das proteínas VEGF (A), FLT1 (B) e KDR (C) em corpo lúteo bovino dos animais do grupo controle, estimulado e superovulado, no dia 7 após injeção de GnRh. Imagens da eletroforese são representativas de 3 experimentos independentes. Os dados foram normalizados pela expressão da actina, beta e estão expressos como media \pm erro padrão; barras com letras diferentes correspondem a diferenças significativas (P < 0.05)

- Figura 23 Morfologia das células da granulosa (CG) em cultivo. A CG controle (dia 2 após o início do cultivo). B CG controle (dia 3 após o início do cultivo). Notar aspecto arredondado das células e colônias (setas vazias) e projeções citoplasmáticas (seta preta). C- CG Controle (dia 7 após o início do cultivo). D- CG –controle (dia 8 após o início do cultivo). Notar aspecto fibroblástico acentuado das células (seta amarela). Barra = 20 μm.

Figura 26 - Expressão gênica relativa do VEGF nas células da granulosa de folículos pequenos, no dia 5 do cultivo (24 h após a adição de LH). F0: livre de FSH; F10: FSH 10ng/ml e F100: FSH 100ng/ml. Asteriscos indicam diferença significativa entre as diferentes concentrações de FSH. Letras diferentes indicam diferença significativa em determinada concentração de FSH após a adição de LH nas concentrações de 250 e 400 ng/ml (p < 0,05).

- Figura 28- Expressão proteica relativa das isoformas 165 e 121 do VEGF nas células da granulosa de folículos pequenos, no dia 8 do cultivo, nos grupos controle e tratados com FSH e LH. Blots ilustrativos e gráficos representando o conteúdo das proteínas expressos em UA/50 μg em relação à actina, beta (ACTB). Os dados são representados por média ± desvio padrão. F0: sem FSH; F10: FSH 10ng/ml; F100: 100ng/ml......120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resultado do micro	oarranjo para os gene	s analisador por qPCR.	74

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no qPCR em tempo real pelo	
método Taqman. S= sense, A = antissense e P= probe (sonda)	60
Quadro 2 – Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no qPCR em tempo real pelo método Syber.	61
Quadro 3 – Anticorpos utilizados nas técnicas de imuno-histoquímica, imunofluorescência e Western blotting	65
Quadro 4 - Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no qPCR em tempo real. S=	
sense, A = antissense e P= probe (sonda).	111

LISTA DE ABREVIATURA

°C – graus Celsius µl – microlitro A – antisense ACSF - acil-CoA sintase, membro da família 2 ADAMS- Desintegrina e metaloproteínases ADAMST - ADAMS com motivo trombospondina ANOVA – análise de variância ANPT – angiopoetinas ARPE-19 - retinal pigment epithelium A - 19 aRNA - ácido ribonucleico de ativação BE - benzoato de estradiol BMPs – proteínas morfogenéticas ósseas BSA – Albumina sérica bovina cAMP - adenosina monofosfato cíclica CD36 - cluster de diferenciação 36 cDNA - ácido desoxirribonucleico complementar CL - corpo lúteo CLL – corpos lúteos CYP11A1 – gene da enzima P450 CYP27A – gene hidoxilase 27 D – dia DAB - diaminobenzidine DAPI-4'6-diamidino-2-fenilindol DEPC – dietilpirocarbonato DMEM - dulbeco's modified eagle medium DNA – ácido desoxirribonucléico DNAse - enzima degradação ácido desoxirribonucléico dNTP - desorribonucleotídeo trifosfatado DTT – dithiothreitol eCG - gonadotrofina coriônica equina ECM -matriz extracelular ECL – Enhanced Chemiluminescence EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético EGF – fator de crescimento epidermal EPM - erro padrão da média FABP5 – proteína de ligação de ácido graxo 5 FGF - fator de crescimento fibroblástico FGFR - receptor para o fator de crescimento fibroblástico FITC - isotiocianato de fluoresceína

FLT – Fms- like tyrosine kinase

FMVZ - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

FSH - hormônio folículo estimulante

FST – folistatina

g – força g

GDF-9 - fator de diferenciação do crescimento

GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofina

GAPDH – Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

hCG –gonadotrofina coriônica humana

HCl - ácido clorídrico

HDL – Lipoproteína de alta densidade

HMGCR - 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coa redutase

HSD3B - hidroxiesteróide-dehidrogenase 3B

IATF - inseminação artificial em tempo fixo

IGF-1 – fator de crescimento semelhante à insulina

IgG –imunoglobulina G

IGFBPs - proteínas ligadoras de fatores de crescimento insulínicos

IPA – Ingenuity Pathways analysis

Kd – quilodaltons

kDa – kilodaltons

KDR – kinase insert domain containing region

LDL - Lipoproteínas de baixa densidade

LH – hormônio luteinizante

LHR- receptor de LH

M-mol

min – minutos

ml– mililitro

mg – miligrama

mM – micromol

MMP – metaloproteinases de matriz

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

NCEH - hidrolase de ésteres de colesterol neutra 1

nm - nanomolar

P4-progesterona

P21 – inibidor do ciclo celular 21

P27 – inibidor do ciclo celular 27

NTPs – ribonucleotídeos trifosfato

P – probe

P450 – citocromo 450

P450c17 – enzima citocromal

P450scc – cytochrome P450 cholesterol side-chain

PBS – solução tampão fosfato PCR – reação em cadeia pela polimerase PGF2α – prostaglandina 2 alfa pH - potencial hidrogênio iônico

PKA – proteína quinase A

PMSF-phenylmethanesulfonylfluoride

PPARG - receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama

PPARs - receptores ativados por proliferadores de peroxissoma

PRLR – receptor de prolactina

qPCR - reação em cadeia pela polimerase quantitativo

RI – região de interesse

RIN – RNA integrity number

RNA – ácido ribonucléico

RT – transcrição reversa

RTKs - receptores tirosina-quinase

S-sense

SDS – dodecil sulfato de sódio

SAM – análise da significância das análises de microarranjo

STAR - proteína esteroidogênica regulatória aguda

SYBR – corante assimétrico de cianina

T-tempo

TE - trasnferência de embrião

TBS - fator de transformação

TGF – fatore de crescimento de transformação

TGFB – fator de transformação de crescimento beta

TIMPs - tecidos inibidores de metaloproteinases

TRIS – tampão base trifosfato

UA – unidades arbritrárias

UI – unidades internacionais

USP – Universidade de São Paulo

 $v/v - concentração \ em \ volume$

VEGFA - fator de crescimento endotelial vascula

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	28
2 REVISÃO DE LITERATURA	31
2.1 CICLO OVARIANO	31
2.2 FORMAÇÃO DO CORPO LÚTEO E REGULAÇÃO DA FUNÇÃO LUTEÍNICA	32
2.3 SÍNTESE DE PROGESTERONA NO CORPO LÚTEO	36
2.4 FATORES DE CRESCIMENTO NO CORPO LÚTEO	38
2.5 TRATAMENTOS DE SUPEROVULAÇÃO E ESTIMULAÇÃO OVARIANA COM GONADOTROFINAS E SUAS INFLUÊNCIAS NO CL	41
CAPÍTULO 1 -ANÁLISE DIFERENCIAL DA EXPRESSÃO GÊNICA PROTEICA NO CORPO LÚTEO DE BOVINOS SUBMETIDO A TRATAMENTOS COM eCG	E)S 46
3 INTRODUÇÃO	46
4 HIPÓTESE	49
5 MATERIAL E MÉTODOS	51
5.1 TRATAMENTOS	51
5.2 EXAME ULTRASSONOGRÁFICO COLOR-DOPPLER	53
5.3 MENSURAÇÕES DOS CLL	53
5.4 DOSAGEM DE PROGESTERONA	54
5.5 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E TRANSCRIÇÃO REVERSA	54
5.6 ANÁLISES DE MICROARRANJO	56
5.7 TRANSCRIÇÃO REVERSA	57
5.8 PCR EM TEMPO REAL	58
5.9 IMUNO-HISTOQUÍMICA	61
5.10 IMUNOFLUORESCÊNCIA	62
5.11 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA WESTERN BLOTTING	63
5.12 WESTERN BLOTTING	64
5.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	66

6 RESULTADOS	
6.1 FLUXO SANGUÍNEO NO CLL	68
6.2 MENSURAÇÕES DOS CLL	69
6.3 CONCENTRAÇÕES DE PROGESTERONA PLASMÁTICA	70
6.4 ANÁLISE DO MICROARRANJO	71
Valores sublinhados significam genes aumentados ou diminuídos (1.5 fold, $P < 0.05$).	74
6.5 VALIDAÇÃO DOS GENES POR PCR EM TEMPO REAL	74
6.6 IMUNO-HISTOQUÍMICA	80
6.7 IMUNOFLUORESCÊNCIA	
6.8 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA	85
7 DISCUSSÃO	91
CAPÍTULO 2 - INFLUÊNCIA DO FSH NA EXPRESSÃO DO VE CÉLULAS DA GRANULOSA BOVINAS LUTEINIZAI CULTIVO	GF EM DAS EM 102
8 INTRODUÇAO	102
9 HIPÓTESE	
10 MATERIAL E MÉTODOS	
10.1 CULTIVO DE CÉLULAS DA GRANULOSA	
10.2 EXTRAÇAO DE RNA E TRANSCRIÇÃO REVERSA	109
10.2 EXTRAÇAO DE RNA E TRANSCRIÇÃO REVERSA 10.3 PCR EM TEMPO REAL	109 110
10.2 EXTRAÇAO DE RNA E TRANSCRIÇÃO REVERSA 10.3 PCR EM TEMPO REAL 10.4 WESTERN BLOTTING	109 110 111
10.2 EXTRAÇAO DE RNA E TRANSCRIÇÃO REVERSA 10.3 PCR EM TEMPO REAL 10.4 WESTERN BLOTTING 10.4 IMUNOCITOQUÍMICA	109 110 111 112
 10.2 EXTRAÇÃO DE RNA E TRANSCRIÇÃO REVERSA 10.3 PCR EM TEMPO REAL 10.4 WESTERN BLOTTING 10.4 IMUNOCITOQUÍMICA 10.5 ANÁLISES ESTATÍSTICA	109 110 111 112 112
 10.2 EXTRAÇÃO DE RNA E TRANSCRIÇÃO REVERSA 10.3 PCR EM TEMPO REAL 10.4 WESTERN BLOTTING 10.4 IMUNOCITOQUÍMICA 10.5 ANÁLISES ESTATÍSTICA 10 RESULTADOS 	
 10.2 EXTRAÇÃO DE RNA E TRANSCRIÇÃO REVERSA 10.3 PCR EM TEMPO REAL 10.4 WESTERN BLOTTING 10.4 IMUNOCITOQUÍMICA 10.5 ANÁLISES ESTATÍSTICA 10 RESULTADOS 10.1 CULTIVOS CÉLULAS DA GRANULOSA DE FOLÍCULOS PEQUENOS 	
 10.2 EXTRAÇÃO DE RNA E TRANSCRIÇÃO REVERSA 10.3 PCR EM TEMPO REAL	
 10.2 EXTRAÇÃO DE RNA E TRANSCRIÇÃO REVERSA	
 10.2 EXTRAÇÃO DE RNA E TRANSCRIÇÃO REVERSA	

12 CONCLUSÃO	
REFERÊNCIAS	
APÊNDICE A	

1 INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO GERAL

Com o intuito de melhorar o desempenho reprodutivo nos rebanhos bovinos (BARUSELLI et al., 2004), bem como de outros animais domésticos como búfalos (CARVALHO et al., 2002) e ovelhas (FORCADA et al., 2011) protocolos hormonais são utilizados para manipular o ciclo estral, o desenvolvimento folicular, o número de embriões produzidos, e principalmente aumentar as taxas de concepção. Em bovinos, estas estratégias são importantes a fim de minimizar prejuízos em relação ao fracasso de uma gestação, diminuir os problemas relacionados ao anestro pós-parto, bem como aumentar a disseminação de animais geneticamente superiores (SALES et al., 2001; AMBROSE et al., 1999; HANSEN et al., 2001; BARUSELLI et al., 2011).

O corpo lúteo é uma glândula endócrina com a capacidade de produzir progesterona (P4), hormônio essencial para a manutenção inicial da gestação, sendo um órgão fundamental para o sucesso da função reprodutiva (GRAHAM; CLARKE, 1997; MANN, 1999; GREEN et al., 2005) e um importante alvo das técnicas de reprodução assistida. Nas técnicas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF; tratamento estimulatório), por exemplo, nas quais a gonadotrofina coriônica equina (eCG) é amplamente empregada, foram observados aumento tanto no volume do corpo lúteo (CL) quanto na produção de progesterona (SALES et al., 2011; SÁ FILHO et al., 2010). Outro tratamento no qual a eCG também pode ser utilizada é o de superovulação; no entanto, o hormônio folículo estimulante (FSH) tem sido o mais utilizado, o qual causa importantes alterações nos CLL formados, tais como o aumento da expressão de fatores angiogênicos e da vascularização, bem como o aumento da produção de progesterona (PAPA et al., 2007; FATIMA; 2008). Contudo, a eCG vem mostrando grande vantagem em relação ao FSH, por apresentar resultados satisfatórios após única aplicação (BARUSELLI et al., 2011). Assim, o presente estudo foi delineado para tentar elucidar os mecanismos celulares e moleculares desencadeados por tratamentos com gonadotrofinas no corpo lúteo bovino, de forma a contribuir trazendo avanços para as técnicas biotecnológicas.

Tendo em vista as diferentes abordagens deste trabalho em relação aos tratamentos com a utilização de gonadotrofinas, ele será apresentado em dois capítulos distintos. No capítulo um, o foco está direcionado a hipóteses relacionadas à influência dos tratamentos de

estimulação do folículo pré-ovulatório e superovulação com o uso da eCG na expressão de genes que estejam direta ou indiretamente relacionados com a angiogênese, desenvolvimento do CL e com a produção de P4. A seguir, no capítulo dois, um modelo *in vitro* foi delineado para avaliar os efeitos do FSH na regulação da expressão gênica e proteica do VEGF em células da granulosa bovina provenientes de folículos pequenos e grandes, contextualizando com relatos existentes na literatura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta seção serão revisados alguns conceitos importantes para a compreensão das hipóteses e objetivos do presente trabalho, bem como da discussão dos resultados, os quais serão apresentados nas seções subsequentes.

2.1 CICLO OVARIANO

Os ovários dos mamíferos são tecidos muito dinâmicos de forma geral, nos quais ocorrem mudanças cíclicas como maturação folicular, ovulação, formação do corpo lúteo, e na ausência de prenhez a involução desse corpo lúteo. Esses processos estão submetidos ao controle endócrino, principalmente, pelas gonadotrofinas pituitárias, como o FSH e o LH; estes induzem numerosas interações extracelulares e intracelulares. Em síntese, o FSH promove o crescimento dos folículos que subsequentemente produzirão estrógenos, enquanto o LH induzirá o desenvolvimento do corpo lúteo com subsequente produção de progesterona (NISWENDER et al., 2000; STOCCO, C.; TELLERIA; GIBORI, 2007; STOCCO, C., 2011).

O ciclo estral é caracterizado por várias mudanças que ocorrem nas concentrações de hormônios que regulam a reprodução. Essas ocorrências o dividem em quatro estágios ou períodos: estro (período de aceite do macho), metaestro (período que cessa o estro e começo do desenvolvimento do corpo lúteo), diestro (período que pleno funcionamento do corpo lúteo) e proestro (período que vai da regressão do corpo lúteo até o começo do estro) (RATHBONE et al., 2001). Fêmeas *Bos indicus* apresentam geralmente duração mais curta do período do estro (em torno de 10 horas), dificultando sua detecção e ampliando necessidade da aplicação de técnicas de sincronização de cio (BARUSELLI et al., 2006). O desenvolvimento folicular ovariano é um processo dinâmico caracterizado pela emergência de ondas sucessivas, sendo que em cada onda de crescimento folicular um número de folículos são recrutados de um "pool" de folículos antrais dependentes de gonodotrofina. Durante o

ciclo estral uma onda de folículos emerge entre os dias 1 e 3 após o estro. Seu numero geralmente entre 10 e 50, e nos dias subsequentes, parte desses folículos crescem sendo que 2 a 5 folículos maiores do grupo continuarão a crescerem enquanto os outros regridem. Dos folículos remanescentes pelo menos um continua a crescer e torna-se dominante, e este momento é denominado divergência (BO et al., 1994). Os bovinos podem apresentar uma, duas ou três ondas de crescimento folicular por ciclo estral, dependendo da duração da fase luteínica sendo cada onda precedida de aumento da concentração plasmática de FSH. Contudo, em zebuínos existem relatos que descrevem maior incidência de 3 ondas, sendo notificada a presença de até 4 ondas de crescimento folículo dominante coincide com o declínio da onda estimulatória de FSH, e a presença de receptores para LH nas células da granulosa de folículos dominantes, após a divergência folicular, sugere efetiva participação deste hormônio na fase final do desenvolvimento e maturação folicular (FIGUEIREDO et al., 1997).

O desenvolvimento do CL tem início com a ovulação de um folículo dominante. Durante a maior parte do ciclo estral em bovinos, a progesterona e o 17β -estradiol inibem a secreção de LH por meio de retroalimentação negativa sobre o hipotálamo e a hipófise. Durante a luteólise, ocorre queda nas concentrações plasmáticas de progesterona e a retroalimentação negativa deixa de existir, permitindo um aumento lento na frequência e na amplitude dos pulsos de LH. Neste período do ciclo estral, a secreção de 17β -estradiol pelo folículo dominante é estimulada pela maior secreção de LH, e o primeiro passa a exercer retroalimentação positiva sobre o hipotálamo, induzindo o pico pré-ovulatório de LH (KARSCH et al., 1977).

2.2 FORMAÇÃO DO CORPO LÚTEO E REGULAÇÃO DA FUNÇÃO LUTEÍNICA

A preparação do folículo para ovulação se inicia anteriormente a ovulação, com o surgimento do pico de LH pré-ovulatório. Dentro das células do folículo, ocorre a dispersão da cromatina nuclear concomitantemente com o aumento do número de polirribossomos (MCCLELLAN et al., 1975). As junções GAP entre as células da granulosa também

começam a desaparecer. O número de retículos endoplasmáticos lisos nas células da granulosa aumenta drasticamente, as mitocôndrias começam a ficar mais arredondadas (MCCLELLAN et al., 1975; SMITH, M. F.; MCINTUSH; SMITH, 1994). O pico de LH préovulatório também induz mudanças na atividade e na concentração de enzimas esteroidogênicas nas células do folículo pré-ovulatório resultando na perda de sua habilidade de produzir estrógenos. As mudanças que ocorrem nestas células em processo de luteinização depois do pico de LH são tanto quantitativas como qualitativas, a expressão gênica é alterada para produção de P4. Esta mudança também é quantitativa uma vez que a quantidade de P4 produzida pelas células luteínicas é muito maior que a quantidade de estrógeno produzido pelas células do folículo. Aproximadamente 15-20 horas depois do pico de LH a concentração do mRNA da aromatase, a principal enzima para produção de estradiol cai drasticamente (VOSS; FORTUNE, 1993). É interessante que imediatamente após o pico de LH não ocorre aumento detectável no mRNA das enzimas essenciais para a produção de P4 sugerindo que o aumento pré-ovulatório da produção de P4 é transitório. No entanto, 72 horas depois do pico de LH, o mRNA das enzimas P450scc e HSD3B aumentam significantemente (VOSS; FORTUNE, 1993).

O CL é composto pelas células da teca e granulosa que sofreram luteinização, transformação esta que envolve dois processos simultâneos: extensivo remodelamento do tecido resultando na formação do CL e aquisição da função luteínica. Primeiramente uma reprogramação celular é iniciada, seguida de remodelamento tecidual, regulação da proliferação celular e hipertrofia. As células da teca do folículo ovulado luteinizam e começam rapidamente a proliferar como células luteínicas pequenas (FARIN et al., 1986). Uma proliferação celular rápida também ocorre em outras populações celulares não esteroidôgenicas, como as células endoteliais durante a formação da rede vascular, e outras células pequenas, como os fibroblastos (ALILA; HANSEL, 1984; ZHENG et al., 1994). Em contrapartida, as células da granulosa luteinizadas como células luteínicas grandes interrompem a proliferação e sofrem maciça hipertrofia. (ALILA; HANSEL, 1984; ZHENG et al., 1994; SCHAMS; BERISHA, 2004). O pico de LH induz parada da célula no ciclo celular não somente pela elevação dos inibidores do ciclo celular p27 e p21, mas também pela completa supressão do ativador ciclina D2 (ROBKER; RICHARDS, 1998). A desfosforilação de proteínas durante a luteinização pode suprimir a atividade das ciclinas D e E levando a suprimir a passagem da célula pela fase G e a transição da fase G1 para S do ciclo celular (ROBKER; RICHARDS, 1998; JOHNSON; WALKER, 1999). Desta forma, as células da granulosa luteinizadas permanecem presas a um estado não proliferativo durante toda a existência do CL, sendo sua hipertrofia a maior causa do aumento da massa do CL em comparação ao folículo do qual ele foi derivado (ENDERS, 1973). O tamanho celular é aumentado devido a modulação da expressão de componentes do citoesqueleto (KHAN-DAWOOD; YUSOFF DAWOOD; TABIBZADEH, 1996).

A formação estrutural do CL também requer modificação da matriz extracelular (ECM) e de interações celulares com a ECM. Luck e Zhao (LUCK; ZHAO, 1993) demonstraram uma mudança no tipo de colágeno durante a formação do CL. O tipo IV encontrado na membrana basal é substituído por colágeno fibrilar (tipo I), o qual começa a ser o principal componente da matriz extracelular luteínica. A expressão e a atividade de enzimas que degradam a matriz extracelular encontram-se elevadas durante o extensivo remodelamento associado com a luteinização. Muitas proteases têm sido identificadas com uma função importante no remodelamento luteínico, incluindo o sistema plasmina-plasminogênio e metaloproteinases com motivos de trombospondina (ADAMST), metaloproteinases de matrix (MMP) e seus inibidores, assim como inibidores de MMP (TIMPs) (LIU et al., 1997; CURRY; OSTEEN, 2003; NOTHNICK, 2003; YOUNG; STOUFFER, 2004).

Em resposta aos sinais angiogênicos que ocorrem durante o processo pré-ovulatório, o endotélio ovariano maduro mantém sua capacidade de crescimento rápido, pois a formação de novos vasos sanguíneos é essencial para a formação e a função do CL. A proliferação das células endoteliais é um requisito para a neovascularização durante o desenvolvimento luteal e resulta em uma extensiva formação de redes de capilares sangüíneos (REDMER; REYNOLDS, 1996). De um modo análogo, esses eventos também ocorrem no CL em resposta aos sinais extracelulares. Embora o CL seja um tecido transitório, ele é um dos mais vascularizados no organismo (BRUCE; MOOR, 1976), tendo um percentual de células endoteliais superior a 50% em relação ao total de células (O'SHEA; RODGERS; D'OCCHIO, 1989; CHRISTENSON; STOUFFER, 1996; REYNOLDS; GRAZUL-BILSKA; REDMER, 2002). Os capilares estão presentes na teca interna e externa, porém estão ausentes na camada de células da granulosa, uma vez que a membrana basal atua como uma barreira para a vascularização. Após a ovulação, as células da teca interna que estão associadas a capilares atravessam a membrana basal, que se degradou, e invadem a camada da granulosa e do tecido folicular remanescente, o que leva ao desenvolvimento do corpo lúteo e início da produção de progesterona em altas concentrações (NISWENDER et al., 2000). Desta forma, uma

formação apropriada do CL é fundamental para o sucesso do estabelecimento e manutenção inicial da prenhez.

Inicialmente, ocorre a formação de uma estrutura denominada de corpo hemorrágico. O corpo hemorrágico se reorganiza para formar o CL sob influência de vários fatores angiogênicos e mitogênicos como FGF2, fator de crescimento I semelhante à insulina (IGF-1; Suh et al, 1992), fator de crescimento semelhante à heparina (GRAZUL-BILSKA et al., 1992), VEGF-A (REDMER; REYNOLDS, 1996), entre outros. As organelas, substratos e enzimas contidas nas células do CL determinarão sua capacidade em sintetizar P4 (NISWENDER et al., 2000).

A formação do CL e seu desenvolvimento também são regulados por uma série de outros fatores. Já foi relatado que fatores de transcrição estão envolvidos nos mecanismos relacionados às alterações na expressão gênica das células da granulosa luteinizadas. Estes fatores medeiam a transdução dos sinais hormonais, incluindo os decorrentes de lípidos, para alvos no DNA. Um grupo de fatores de transcrição, os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) alfa e gama, são os reguladores chaves na homeostase de lipídios dentro das células (KLIEWER et al., 1997). Além disso, o PPARG tem a função de auxiliar a parada das células luteínicas no ciclo celular para manter as células em seu estado diferenciado (VIERGUTZ et al., 2000). O PPARG regula a expressão de genes que codificam enzimas da via de síntese do colesterol tais como a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintase (RODRIGUEZ et al., 1994), 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMGCR) (BAKER et al., 2010) e as lipoproteínas lipase (SCHOONJANS et al., 1996). Além dessas, o PPRG está associado a regulação da sintese de enzimas esteroidogênicas como a STAR (BAILLARGEON et al., 2004), HSD3B (YILMAZ et al., 2005), P450c17 (RUBENSTRUNK et al., 2007) e P450aromatase (KUŞCU et al., 2002). No ovário de ruminantes, o PPARG é fortemente expresso nas células da granulosa e menos expresso nas células da teca e no CL (GASIC et al., 1998; KOMAR et al., 2001; FROMENT et al., 2003). Adicionalmente, várias proteases como a metaloproteinase de matrix 9 e o plasminogênio, os quais tem uma função importante no processo de ruptura dos folículos e ajudam no remodelamento do tecido, são reguladas pelo PPARG dos folículos (KATO et al., 1999; SHU et al., 2000).

Além de serem reguladas por gonadotrofinas hipofisárias, a foliculogênese e a formação do CL são também moduladas por outros fatores de crescimento como os fatores de crescimento de transformação (TGF) alfa e beta, fator de crescimento epidermal (EGF),
proteínas ligadoras de fatores de crescimento insulínicos (IGFBPs), fator de diferenciação do crescimento (GDF-9), proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), inibinas, ativinas e folistatinas (WEBB et al., 1999).

A folistatina é uma proteína glicolisada de cadeia única com uma similaridade funcional aos membros da superfamília do TGFB2, (ESCH et al., 1987; ROBERTSON et al., 1987) (ROBERTSON et al., 1987). O papel da folistatina na função ovariana é relacionado à maneira pela qual ela interage com outros membros da superfamília do TGFB que são as ativinas, o GDF-9 e as BMPs. As células da granulosa são as células do ovário responsáveis pela produção e secreção de folistatina de muitas espécies. É importante observar que o nível de expressão do mRNA da folistatina no ovário depende do estágio de desenvolvimento dos folículos. A expressão do mRNA da folistatina aumenta com a maturação folicular e declina durante o processo de atresia (ROBERTS, V. J. et al., 1993; LINDSELL; MISRA; MURPHY, 1994). Além disso, a proteína folistatina parece estar presente nos folículos somente após o desvio folicular (NAKATANI et al., 1991). A extensão da diferenciação das células da granulosa pode influenciar a produção de folistatina em resposta ao FSH, LH e ativina A. Camudongos mutantes deficientes em folistatina morrem logo após o nascimento tornando difícil o estudo das funções ovarianas neste modelo (MATSUYAMA; TAKAHASHI, 1995), no entanto, a super expressão da folistatina em camundongos transgênicos resulta em defeitos reprodutivos (Guo et al., 1998). No CL de bovinos a expressão da folistatina foi observada principalmente no momento de intenso desenvolvimento da glândula no diestro (SINGH; ADAMS, 1998b).

2.3 SÍNTESE DE PROGESTERONA NO CORPO LÚTEO

O colesterol é o precursor para a produção de P4, ele é sintetizado principalmente no fígado (KRISANS, 1996) e transportado na forma de lipoproteínas para todos os tecidos esteroidogênicos. As lipoproteínas podem ser de alta densidade (HDL) ou de baixa densidade (LDL) e são as fontes mais comuns de colesterol para a produção dos hormônios esteróides no CL (PATE; CONDON, 1982). O colesterol disponibilizado no citosol passa a ser utilizado

como substrato para a esteroidogênese. Nas células bovinas, a ligação do LH com seu receptor específico na membrana celular ativa a adenilato ciclase que aumenta as concentrações de adenosina monofosfato cíclica (AMPc). O AMPc é responsável pela ativação da proteína kinase A (PKA), que em concentração aumentada, favorece a conversão de ésteres de colesterol em colesterol e ácidos graxos, evento que contribui para uma maior disponibilidade destes lipídeos no citoplasma (BROWN; GOLDSTEIN, 1986). O transporte do colesterol para o interior da membrana mitocondrial é realizado principalmente pela STAR. Este transporte é dependente da fosforilação da proteína STAR, evento que pode ser estimulado pelo LH através da ativação da PKA. Ao longo do diestro, o CL aumenta em tamanho e capacidade de sintetizar P4. A proteína citocromo P450scc está ligada à membrana mitocondrial interna, e é o primeiro componente do complexo enzimático que cliva a cadeia lateral do colesterol para formar a pregnenolona. Depois disso, a pregnenolona é convertida em P4 pela HSD3B que está associada ao retículo endoplasmático liso (NISWENDER, 2002). Durante o desenvolvimento do CL as concentrações séricas de P4 estão associadas às concentrações de RNAm das proteínas que participam nas diversas etapas de produção da P4, incluindo os fatores de crescimento, STAR, enzimas esteroidogênicas (CYP11A1 e HSD3B) e receptores para HDL. As concentrações de tais componentes ao longo do ciclo estral definem diferentes padrões na síntese de P4 (NISWENDER et al., 2000).

A função chave da P4 no estabelecimento e manutenção da prenhez já foi dscrita por vários autores (GRAHAM; CLARKE, 1997; MANN, 1999; GREEN et al., 2005). O aumento da P4 também está associado ao aumento da taxa de sobrevivência do embriões (LAMMING; DARWASH; BACK, 1989). Muitos dos efeitos positivos da P4 na prenhez estão ligados ao seu efeito sobre a expressão gênica do útero. Forde e colaboradores (2009) utilizaram microarranjo de DNA para identificar genes diferencialmente regulados no ínicio da prenhez pela progesterona entre grupos de vacas com progesterona alta e com produção normal de P4. Um grande número de genes diferencialmente expressos foi identificado nas fases iniciais da prenhez, muitos dos quais envolvidos nos processos de metabolismo e transporte de proteínas. Neste mesmo trabalho, foram identificados genes relacionados a regulação da produção de energia podendo ser esta uma das vias pela qual a P4 contribui para o estabelecimento da prenhez, uma vez que é crucial uma fonte potencial de energia para o desenvolvimento do concepto até o estágio de blastocisto em bovinos (FORDE et al., 2009).

A progesterona também age de uma maneira parácrina/autócrina. Receptores de progesterona foram identificados no núcleo das células luteínicas grandes e pequenas como

também nas células endoteliais vasculares (SAKUMOTO et al., 2010). No CL a progesterona parece ter uma grande função luteotrófica. No CL maduro, tratamento das células luteínicas com um antagonista de P4 inibiu a ocitocina e estimulou a secreção de PGF indicando que a progesterona inibe a secreção de P4 no meio do ciclo (PATE, 1988). A P4 também pode estimular a síntese de receptores de LH nas células e reprimir o início da apoptose via um mecanismo progesterona receptor dependente dentro do CL bovino demonstrando ainda mais a função luteotrófica da P4 (JONES; OTTOBRE; PATE, 1992; RUEDA et al., 2000).

A prolactina tem um papel importante na manutenção e na produção de P4 no CL de roedores (RISK MC, 2001) mas em outros animais sua função no CL é controversa. Ela exerce sua ação através da ligação a receptores de membrana específicos. As isoformas longa, curta e intermediária de seu receptor são codificadas por um único gene (GOFFIN et al., 1999) produzido por " splicing" alternativo (BIGNON et al., 1997). Apesar de alguns autores relatarem que a prolactina não parece ser essencial para a função normal do CL durante o ciclo estral em vacas, a expressão do mRNA e da proteína dos receptores longo e curto são regulados de acordo com a fase do CL (SAKUMOTO et al., 2010). Além disso, a expressão dos receptores é maior em CL de vacas prenhes quando comparado ao CL maduro, indicando mais uma vez a importância da prolactina na função do CL bovino (SAKUMOTO et al., 2010).

2.4 FATORES DE CRESCIMENTO NO CORPO LÚTEO

Os fatores VEGF e FGF2 promovem proliferação das células endoteliais vasculares, migração, formação de capilares e permeabilidade vascular (HAZZARD; STOUFFER, 2000). Yamashita et al., (YAMASHITA et al., 2008) demonstraram que quando um anticorpo para o VEGF e o FGF foi introduzido localmente, imediatamente após a ovulação, o CL bovino não se desenvolveu adequadamente e ocorreu uma diminuição significativa na secreção de P4 comparado ao CL normal (Yamashita et al., 2008). Já foi reportado por outros autores que o FGF2 e o VEGF aumentam a secreção de progesterona pelas células luteínicas em várias espécies indicando que o FGF2 e o VEGF estão envolvidos na formação do CL e controle da secreção de P4.

Outros fatores com função importante na angiogêneses são as angiopoetinas (ANPT-1 e 2). Geralmenteo ANPT1 promove estabilidade dos vasos, enquanto que a ANPT-2 trabalha como um antagonista promovendo o remodelamento da vascularização (YANCOPOULOS et al., 2000). O balaço dos fatores angiogênicos parece ser essencial para o desenvolvimento do sistema vascular do CL, o que é essencial para aquisição da função luteínica das células.

O VEGF desempenha importante papel regulador no desenvolvimento vascular fisiológico, sendo que tanto a diminuição nos seus níveis quanto a sua ausência provocam danos na formação vascular sistêmica. Assim sendo, outras funções fisiológicas que dependem de angiogênese são prejudicadas quando da supressão ou ausência de VEGF, como a reparação tecidual de feridas (NISSEN et al., 1998) o crescimento ósseo (GERBER et al., 1999) e a ovulação (FERRARA et al., 1998).

O VEGF age através dos receptores FLT1 (*Fms-like tyrosine kinase* – 1) (DE VRIES et al., 1992) e o KDR (*Kinase insert domain containing region*) (TERMAN et al., 1992). São receptores tirosina-quinase (RTKs) caracterizados por possuírem sete domínios imunoglobulina – miméticos em sua porção extracelular, uma região transmembrânica única e uma seqüência tirosina-quinase interrompida pelo domínio de inserção a quinase em sua porção intracelular(SHIBUYA et al., 1990). O FLT4 (*Fms-like tyrosine kinase* – 4) outro membro da mesma família de RTKs age como receptor dos VEGF-C e VEGF-D(KARKKAINEN; ALITALO, 2002). Estes receptores são expressos em células endoteliais, mas alguns outros tipos celulares podem expressar um ou ambos os receptores. O VEGF se liga ao FLT1 com uma constante de dissociação (Kd) de aproximadamente 10-20pM (DE VRIES et al., 1992). Entretanto, o KDR tem uma menor afinidade com o VEGF, e a Kd é estimada em aproximadamente 75-125pM (TERMAN et al., 1992).

Em CL de bovinos são encontrados níveis de mRNA do *VEGF* e do receptor *KDR* mais elevados durante as fases inicial e média quando comparados com o último estágio luteínico (BERISHA et al., 2000). Segundo Wulff e colaboradores (WULFF et al., 2000) o nível aumentado da expressão do mRNA do VEGF durante a primeira fase é devido à intensa angiogênese vista neste momento. Análises semiquantitativas por PCR mostraram, em humanos, expressão do mRNA do *FLT1* e *KDR* em todas as fases com um decréscimo bem acentuado na última fase. Essas proteínas foram localizadas principalmente no citoplasma de células da granulosa luteinizadas (ENDO et al., 2001). Papa e colaboradores PAPA et al.,2007) quantificaram a expressão da proteína do VEGF e seus receptores em CL de búfalas por meio de imuno-histoquímica e PCR em tempo real e observaram forte reação positiva

para o VEGF, FLT1 e KDR em células luteínicas e endoteliais a partir do dia 2 pós-ovulação assim como maior expressão do mRNA na fase luteínica média.

Sabe-se que o 17b-estradiol é necessário para o desenvolvimento do CL e a manutenção de suas funções durante a prenhez aumentando a expressão do VEGF em células granulosas luteinizadas (GARRIDO; SAULE; GOSPODAROWICZ, 1993). Por um lado, a inibição do VEGF ou FLT1 *in vivo* durante a fase luteínica média em primatas não humanos impede a angiogênese luteínica e suprime a secreção de progesterona (WULFF et al., 2000). Por outro lado, a PGF_{2α} influencia negativamente a expressão do sistema VEGF (VONNAHME et al., 2005).

OS FGFs são uma família de proteínas composta de 25 membros (FGF-1 a 25) (KATOH; KATOH, 2005) que participam dos processos celulares de proliferação, diferenciação e angiogênese, mediante a ativação de receptores de alta afinidade codificados por cinco genes distintos (FGFR-1 a 5) (SLEEMAN et al., 2001).

O FGF2 estimula a proliferação de células (GRAZUL-BILSKA et al., 1995) e a secreção de progesterona em ruminantes (MIYAMOTO et al., 1992) e inibe a secreção de relaxina em células de suínos em cultura (TAYLOR; CLARK, 1992).

Em CL de bovinos a expressão do FGF2 é alta durante a primeira fase luteínica (1-2 dias), decrescendo significativamente nos dias 5-7 do ciclo estral e aumentando novamente durante a última fase luteínica. Ocorre uma dramática mudança na localização do FGF2 durante o ciclo estral em bovinos. No início da fase luteinica (dias 1-3) o FGF2 foi detectado intensamente no citoplasma das células endoteliais dos capilares e em células do músculo liso das artérias. Já na fase luteínica média, nos dias 8-12 após o pico de LH, a maioria das células vasculares não se mostraram positivas para o FGF2 e a proteína foi localizada exclusivamente no citoplasma das células. (SCHAMS et al., 1994)

Alta expressão do gene FGFR1 foi encontrada em células do CL fase luteínica inicial de ovelhas (DORAISWAMY et al., 1998). Também em ovelhas a expressão proteicae do mRNA do FGFR2 foi mais alta nos últimos estágios luteínicos quando comparados aos estágios inicial e médio do desenvolvimento do CL (DORAISWAMY et al., 1998). O mesmo padrão de expressão também foi encontrado para o FGFR2b em CL de bovinos, sugerindo que o aumento da expressão do FGFR2 pode desempenhar uma função durante a apoptose e ou remodelamento do tecido no CL em regressão (CASTILHO et al., 2008).

2.5 TRATAMENTOS DE SUPEROVULAÇÃO E ESTIMULAÇÃO OVARIANA COM GONADOTROFINAS E SUAS INFLUÊNCIAS NO CL

Muitos protocolos hormonais foram desenvolvidos para manipulação folicular ovariana com o objetivo de facilitar o manejo reprodutivo e evitar perdas na gestação (BARUSELLI et al., 2011b). Programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) so eficientes para superar a imprecisão na detecção do estro, uma limitação importante na indústria de gado. O protocolo mais comum consiste no uso de GnRH ou 17b-estradiol e tambem dispositivos de progesterona e prostaglandina F2 alfa. Além disso, tratamentos com gonadotrofinas associados aos protocolos de IATF revelaram aumento das taxas de concepção, provavelmente devido ao aumento das concentrações plasmáticas de P4 (BINELLi et al., 2001; BÓ et al., 2002; SALES et al., 20011; SÁ FILHO et al., 2010). Tratamentos com eCG asão uma ferramenta importante para aumentar o tamanho folicular e as taxas de prenhez em programas de IATF, principalmente para rebanhos com alta prevalência de vacas em anestro ou com baixa condição corporal (BARUSELLI et al., 2004). A eCG estimula o crescimento contínuo do folículo em vacas que exibem uma deficiência na liberação de gonadotrofinas. Estudos prévios demonstraram que fêmeas tratadas com eCG exibiram aumento no crescimento folicular final, aumento do folículo dominante e das taxas de ovulação, além de apresentarem também aumento do volume do CL e da P4 circulante (SALES et al., 2010; SÁ FILHO et al., 2010a; SÁ FILHO et al., 2011) minimizando falhas no reconhecimento da gestação e aumentando a eficiência da transferência de embriões (BINELLI et al., 2001).

O eCG é um fármaco de meia vida longa (até 3 dias), produzido nos cálices endometriais da égua prenhe (40 a 130 dias) (MURPHY; MARTINUK, 1991) que se liga aos receptores de FSH e LH dos folículos e aos receptores de LH do corpo lúteo (STEWART; ALLEN, 1981; CAVALIERI et al., 1997). Em eqüinos, o eCG resulta na ovulação ou luteinização de folículos durante a gestação, com conseqüente aumento da progesterona circulante (MURPHY; MARTINUK, 1991)

O FSH é o hormônio mais comum nos protocolos superovulatórios (HESSER; MORRIS; GIBBONS, 2011). Entretanto, a meia-vida do FSH exógeno em bovinos tem duração de 5 horas, e então, requer duas aplicações diárias, o que aumenta a possibilidade de falhas devido ao uso incorreto e erros na administração. Além disso, a aplicação frequente das injeções pode causar indevidamente estresse nas fêmeas, com consequente diminuição da resposta superovulatória e alterações no pico pré-ovulatório de LH (BO et al., 2010). O emprego da eCG pode ser uma importante alternativa, pela sua ação de LH e FSH e meia vida longa, podendo ser aplicado em dose única. Estudo realizado por (BARUSELLI et al., 2008) apresentou o tratamento com eCG na dose de 2000UI que alcançou a mesma eficiência que os animais superovulados com FSH, com vantagens significativas quanto ao manejo das doadoras e aos programas de transferência de embriões e IATF. A superovulação seguida pela IA são técnicas que produzem um grande número de embriões por doadora. E estas técnicas associadas a trasnferência de embriões para vacas receptoras, são potentes ferramentas para disseminar a alta qualidade genética e aumentar a performance reprodutiva (MURPHY; MRTINUK, 1991).

Entende-se, dessa maneira que os resultados da estimulação com o uso do eCG (crescimento folicular, ovulação e concepção) são duas vezes maiores em relação a estimulação com FSH, devido ao seu tempo maior de atuação no organismo (SALES et al., 2011) Bó et al. (BO et al., 2002) verificaram que a utilização de 400UI de eCG no momento da emergência da onda de crescimento folicular determinou apenas 2% de dupla ovulação em receptoras, e ainda formou corpos lúteos únicos e maiores, ao que foi atribuido o incremento na taxa de concepção e de prenhez. Posteriormente, demostrou que a dose de 400UI de eCG é suficiente para obtenção de resultados satisfatórios em vacas receptoras (SÁ FILHO et al., 2010).

Em um estudo realizado por nosso grupo avaliando aspectos morfofisiologicos dos CLL coletados após os tratamentos de superovulação e estimulação com eCG (RIGOGLIO et al., 2012) os resultados mostraram um aumento no numero de células luteínicas pequenas e no diâmetro das células luteínicas grandes (hipertrofia) além de ter sido observado também um aumento do volume mitocondrial nas vacas superovuladas. Já nas vacas estimuladas o número de células luteínicas grandes foi aumentado bem como a densidade das mitocôndrias esféricas nas celulas luteinicas quando comparados com vacas sem tratamento. O aumento na densidade mitocondrial esférica junto com o número de células luteínicas grandes em vacas estimuladas contribui diretamente com a concentração de P4 plasmática (FIELDS; FIELDS, 1996). As células luteínicas grandes são as principais células produtoras de P4 no CL (FIELDS; FIELDS, 1996; NISWENDER et al., 2000) e características esteroidogênicas tais como aumento da capacidade mitocondrial para a produção de pregnenolona após o tratamento com eCG já foram descritas (TUCKEY; ATKINSON, 1989). Em nosso estudo, o

tratamento estimulatório induziu mudanças morfológicas que permitiu ao CL produzir mais P4 em relação ao volume total deste órgão. Por outro lado, o tratamento superovulatório induziu alterações relacionadas ao aumento do volume, tal como aumento do número de células luteínicas pequenas.

Assim, a superestimulação ou estimulação ovariana provocam alterações morfológicas e funcionais importantes no CL e, consequentemente, no ambiente uterino. O estabelecimento e a manutenção da gestação, bem como o crescimento embrionário em bovinos, estão correlacionados à habilidade do CL em secretar P4 (FIELDS; FIELDS, 1996), hormônio intimamente relacionado com o ambiente tubário e uterino.

Segundo Moura (MOURA, 2003) e Papa e colaboradores (PAPA et al., 2007), o CL de búfalas superovuladas com FSH apresentou densidade vascular maior do que CL de búfalas não manipuladas. Além disso, houve uma intensa imunoreatividade das células endoteliais para o VEGF e seus receptores, demonstrando uma maior expressão deste sistema em resposta ao tratamento superovulatório. Altas concentrações de progesterona (PAPA et al., 2007) como também de estradiol (MISRA et al., 1998) são encontradas em búfalas superovuladas.

As células de animais superovulados apresentam características que refletem maior atividade de síntese protéica, como o aumento na quantidade de retículo endoplasmático rugoso e de mitocôndrias (SMITH, C. J. et al., 1991) além de alterações no formato do núcleo e na condensação da cromatina (ARTONI et al., 2004).

Trabalhos realizados por Shweiki e colaboradores (SHWEIKI et al., 1993) mostraram que em primatas e ratos, com ovários hiperestimulados, ocorre uma elevação dos níveis do mRNA do VEGF, predominantemente após uma onda de LH. Um aumento do LH resulta em maior expressão do mRNA do VEGF pelas células da granulosa do folículo ovariano (HAZZARD et al., 1999). Além disso, o FSH estimula a proliferação de células endoteliais em CL de macacos (CHRISTENSON; STOUFFER, 1996) e também estimula a expressão do mRNA do VEGF em células da granulosa. Christenson e Stouffer (CHRISTENSON; STOUFFER, 1997) demonstraram que a síntese e a secreção da proteína VEGF em células da granulosa de macacos é aumentada oito vezes em resposta a gonadotrofina coriônica humana (hCG). Após estimulação de ratas com hCG também foi observado um aumento da expressão do mRNA do VEGF e aumento da permeabilidade vascular no ovário. Quando comparados, os efeitos estimulatórios do LH, FSH e hCG demonstraram que o LH e FSH tem um efeito menor na indução da permeabilidade vascular (GOMEZ et al., 2003).

CAPÍTULO 1

ANÁLISE DIFERENCIAL DA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA NO CORPO LÚTEO DE BOVINOS SUBMETIDOS A TRATAMENTOS COM eCG

CAPÍTULO 1 -ANÁLISE DIFERENCIAL DA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA NO CORPO LÚTEO DE BOVINOS SUBMETIDOS A TRATAMENTOS COM eCG

3 INTRODUÇÃO

Biotecnologias para aumentar a eficiência reprodutiva são amplamente utilizadas em rebanhos bovinos, principalmente direcionadas para estimulação do crescimento dos folículos ovarianos e aumento das taxas de concepção. Diferentes estratégias têm sido propostas com o objetivo de melhorar a eficiência das técnicas de sincronização para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) como o uso da gonadotrofina coriônica equina (eCG) para estimular o crescimento do folículo pré-ovulatório, aumentar a produção de progesterona (P4) pelo corpo lúteo (CL) resultante e melhorar as taxas de concepção (BO et al., 2002; SA FILHO et al., 2010; SALES et al., 2011). Além disso, a mesma gonadotrofina pode ser utilizada para a superovulação (BARUSELLI et al., 2011), técnica que possibilita gerar um grande número de embriões por vaca doadora, sendo um poderoso aparato para disseminar a alta qualidade genética e melhorar o desempenho reprodutivo (AMBROSE et al., 1999; HANSEN et al., 2001)

A eCG é uma glicoproteína que se liga aos receptores do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo estimulante (FSH) e pode ativar muitas vias de transdução de sinal nos tecidos alvo (MURPHY; MARTINUK, 1991). O uso da eCG nas técnicas de IATF pode aumentar o tamanho folicular (folículo dominante) e, consequentemente, o volume do CL, o que tem sido associado ao aumento da produção de progesterona (SÁ FILHO et al., 2010a; SALES et al., 2011; FIELDS et al., 2012). A progesterona tem papel importante nos eventos reprodutivos associados com o estabelecimento e manutenção da prenhez através da indução de mudanças no transcriptoma do endométrio (CLEMENTE et al., 2009). Em ruminantes e primatas, o CL é largamente dependente da ação do LH através da via cAMP/proteína quinase A (NISWENDER et al., 2000), e em roedores e coelhos, está estabelecido que a prolactina e o 17β-estradiol são hormônios luteotróficos essenciais (STORMSHAK; ZELINSKI-WOOTEN;

ABDELGADIR, 1987). Além disso, os hormônios FSH e LH podem modular a síntese de citocinas e fatores de crescimento, como o fator de crescimento do endotélio vascular A (VEGF-A) (PAPA et al., 2007).

A maquinaria esteroidogênica das células luteínicas deve ser altamente eficiente, e o primeiro passo no processo enzimático da síntese de progesterona é a conversão do colesterol para pregnenolona, catalisada pela citocromo P450 (P450scc/CYP11A1) localizada na membrana mitocondrial interna (MILLER, 1988; NISWENDER et al., 1994; NISWENDER; NETT, 1994). Em seguida, a pregnenolona é convertida em progesterona pela enzima 3betahidroxiesteróide desidrogenase (HSD3B) presente no retículo endoplasmático liso (LABRIE et al., 1992). No entanto, o primeiro desafio para a esteroidogênese é a obtenção do precursor de colesterol, e o passo limitante é a transferência do colesterol da membrana mitocondrial externa para a interna. Este processo é controlado pela proteína reguladora aguda da esteroidogênese (STAR) (STOCCO; CHEDRESE; DEIS, 2001). A obtenção de colesterol pelas células luteínicas ocorre via endocitose das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) ou, também, pela capitação seletiva de ésteres de colesterol derivados das lipoproteínas de alta densidade (HDL) (BRANNIAN; STOUFFER, 1993). Além disso, a síntese de novo do colesterol também pode contribuir para o aumento do colesterol intracelular e esta síntese pode ser controlada por hormônios luteotróficos (GOLOS; STRAUSS, 1988). A homeostase do colesterol é muito importante para a adequada função do CL. A regulação deste fenômeno pode envolver fatores de transcrição como os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs), os quais têm uma função central no metabolismo dos lipídios (KLIEWER et al., 1997; KOTA; HUANG; ROUFOGALIS, 2005).

Diante do exposto, podemos dizer que uma função ótima do CL requer uma ação coordenada entre hormônios luteotróficos, fatores de crescimento, proteínas esteroidogênicas (NISWENDER, 2002), bem como a biossíntese e homeostase dos lipídios dentro da célula luteínica. Como os tratamentos com o uso do eCG podem promover mudanças importantes no CL, as quais levam ao aumento na produção de progesterona, isso implica na formulação de hipóteses relativas aos mecanismos pelos quais as gonadotrofinas exógenas alteram as funções celulares no CL. Deste modo, este estudo busca analisar as influências dos tratamentos de estimulação folicular e superovulação com o uso da eCG na expressão de genes que estejam direta ou indiretamente relacionados a angiogênese, desenvolvimento do CL e, principalmente, com a produção de P4.

4 HIPÓTESE

4 HIPÓTESE

Os tratamentos de estimulação e superovulação folicular com o uso de eCG influenciam a morfofisiologia do CL e a expressão de genes relacionados a angiogênese, ao desenvolvimento do CL e a produção de P4.

Para testar as hipóteses acima descritas foram formulados os seguintes objetivos:

- Determinar as concentrações de progesterona plasmática no dia 7 após injeção de GnRh em vacas tratadas ou não com eCG.
- 2. Determinar o fluxo sanguíneo no CL no dia 6 após injeção de GnRh através do exame Ultrassonográfico Color-Doppler dos animais tratados ou não com eCG.
- Determinar o número, o volume e o peso dos CLL coletados no dia 7 após injeção de GnRh dos animais tratados ou não com eCG.
- 4. Analisar a expressão gênica e proteicados fatores angiogênicos VEGF-A, FLT1, KDR, FGF2, FGFR1 e FGFR2 e das proteínas esteroidogênicas STAR, HSD3B e p450scc (*CYP11A1*) no corpo lúteo dos animais tratados ou não com eCG coletados no dia 7 após injeção de GnRh.
- Identificar genes diferencialmente expressos com microarranjo de mRNA no corpo lúteo de animais tratados ou não com eCG coletados no dia 7 após injeção de GnRh.
- 6. Após as análises do microarranjo, selecionar genes diferencialmente expressos nos grupos tratados com eCG que possam estar relacionados com a angiogênese, o desenvolvimento do CL e/ou a esteroidogênese para serem validados tanto na proteína quanto no gene.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento *in vivo* foi realizado utilizando-se 18 vacas (*Bos indicus*) divididas em 3 grupos: grupo controle (animais apenas sincronizados, n=5), grupo estimulado (animais tratados com 400 UI de eCG no dia 8 após inicio da sincronização, n=6), e grupo superovulado (animais tratados com 2000UI de eCG no dia 4 após inicio da sincronização, n=7). Anteriormente ao período experimental, os animais foram avaliados quanto à condição ovariana, por palpação retal conforme Madureira e colaboradores (MADUREIRA, 2004), e ultra-sonografia, sendo selecionados aqueles que apresentaram condição ovariana adequada (presença de folículos e CL). No dia anterior ao abate todos os animais foram submetidos a exames ultrassonográficos com aparelho color-Doppler (MyLab 30, Pie Medical, Itália) com os objetivos de verificar quais animais haviam ovulado bem como realizar mensurações dos fluxos sanguíneos nos CLL dos animais dos grupos controle e estimulado. No dia sete após injeção do GnRH todos os animais foram abatidos no abatedouro-escola da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) daUSP. Os CLL foram coletados, pesados, mensurados e congelados em nitrogênio liquido ou fixados em solução de paraformaldeído tamponado a 4% por 24 horas. Além disso, amostras de sangue para dosagem hormonal foram coletadas no momento da sangria.

5.1 TRATAMENTOS

Neste experimento as fêmeas foram distribuídas aleatoriamente em três grupos: controle (n = 5), estimulado (n = 6) e superovulado (n = 7; Figura 1). Resumidamente, no dia 0 (dia aleatório do ciclo estral) todos os animais receberam um dispositivo intravaginal contendo 1 g de P4 (dispositivo intravaginal bovino; progesterona: 1g; Primer, Technopec Brasil) e uma injeção intramuscular de 2mg de benzoato de estradiol (Estrogin, Farmavet, São Paulo, Brasil). No dia 8 os dispositivos intravaginas foram removidos nas vacas do grupo controle e estimulado, e 0,150 mg de d-cloprostenol (PGF2 α , Prolise, Arsa, Buenos Aires, Argentina) foram adiministrados. Os animais do grupo controle não receberam eCG (gonadotrofina coriônica eqüina, Novormon, Syntex, Buenos Aires, Argentina), enquanto que aqueles do grupo estimulado receberam 400 UI no dia 8. Querenta e oitos horas após a remoção do dispositivo de P4 os animais controles e estimulados receberam 0,025 mg de Lecirelina (GnRH; Gestran Plus, Arsa, Buenos Aires, Argentina). Os animais superovulados receberam 2000 UI de eCG no dia 4 e 0,150 mg de PGF2 α no dia 6. No dia 7, os dispositivos de P4 foram removidos e uma outra dose de PGF2 α foi adiministrada e 12 horas depois, 0,025mg de GnRH foi administrado.

Figura 1- Modelo esquemático dos tratamentos utilizados nos animais controle, estimulado e superovulado. D = dia; T = tempo; BE = benzoato de estradiol; PGF2α = Prostaglandina 2α; P4 = progesterona; n = número de animais



5.2 EXAME ULTRASSONOGRÁFICO COLOR-DOPPLER

O fluxo sanguíneo no CL foi determinado com o auxílio de um ultrassom Doppler (MyLab 30, Pie Medical, Itália) equipado com uma probe linear de 7.5 Mhz multifrequencial. No modo color-Doppler, os sinais coloridos foram utilizados para determinar os sinais de fluxo sanguíneo do CL. O ganho do foco e ajustes de cor do ultrassom Doppler foram os mesmos durante todos os exames. O máximo tamanho da caixa de detecção do fluxo sanguíneo ou Região de Interesse (RI) foi escolhido. O exame ultrassonográfico com o modo color-Doppler foi efetuado no dia 6 após a injeção de GnRH. Imagens do B-mode/color-Doppler foram gravadas com o auxílio de software do próprio equipamento e posteriormente foi realizada a análise dos pixels. Uma imagem de cada CL e seu respectivo fluxo sanguíneo (porção colorida na imagem) foi selecionada por apenas um medico veterinário sem conhecimento prévio dos grupos experimentais a partir das imagens de gravações do exame ultrassonográfico de Doppler efetuada nos 18 animais. As imagens foram selecionadas baseadas no maior diâmetro do CL e na qualidade da imagem do fluxo sanguíneo detectado pelo Doppler. O número de pixels coloridos nas imagens selecionadas foi determinado como descrito anteriormente (GINTER, 2004). A mesma escala de cor foi utilizada como controle positivo na seleção dos pixels coloridos em todas as imagens. A porcentagem do fluxo sanguíneo do CL foi calculada dividindo-se o número total de pixels coloridos pelo número de pixels não coloridos como descrito anteriormente (GINTHER et al., 2007).

5.3 MENSURAÇÕES DOS CLL

Os CLL dos animais dos grupos controle, estimulado e superovulado foram pesados e em seguida foram realizadas três medidas (A- altura, B- largura, C- espessura) com a utilização de um paquímetro. Para calcular o volume do CL foi utilizada a fórmula de volume de uma elipse $3/4x(\pi x(A/2)(B/2)(C/2))$. Os CLL das vacas superovuladas foram contados e 3 CLL de cada animal foram utilizados para mensurações de volume e peso.

5.4 DOSAGEM DE PROGESTERONA

As amostras de sangue para dosagem hormonal foram coletadas no momento do abate dos animais tanto em tubos heparinizados quanto em não heparinizados e imediatamente centrifugadas por 10 min. a 3000 x g para separação do plasma e do soro respectivamente. Após centrifugação, o plasma/soro foi colocado em tubos de 1,5 mL e armazenado a -20°C.

A concentração de progesterona foi determinada utilizando-se um KIT comercial (COAT-A-COUNT[®] Progesterone; Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, USA). Um método de quantificação de progesterona em fase sólida, designado para quantificação direta em soro ou plasma, utilizando-se como elemento traçador o I¹²⁵. Os coeficientes intraensaios baixo e alto foram de 2.11% e 5.91%, respectivamente.

5.5 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E TRANSCRIÇÃO REVERSA

A extração do RNA total foi realizada a partir do protocolo de Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, o RNA foi purificado com o uso do RNAeasy mini kit e tratado com DNase para eliminar a contaminação genômica (Qiagen, Valencia, CA, USA). A quantificação foi realizada no aparelho NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Hudson, USA). As amostras de RNA passaram por uma análise de qualidade no aparelho Agilent 2100 Bioanalyzer, o qual consiste em uma plataforma baseada em microfluídica para o dimensionamento, quantificação e controle de qualidade de RNA, DNA, proteínas e células. Para tanto, foi utilizado o kit Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) e os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente: O kit utilizado no Bioanalyzer era constituído *de RNA Nano Chip* e os reagentes *Gel Matrix, Dye Concetrated, Marker* and *RNA ladder* (RNA controle). Durante o preparo do *Chip*, 1 µL do corante (*Dye Concetrated*) foi adicionado em 65 µL de Gel (*Gel Matrix*). Com a ajuda de uma estação de preparação, os canais do *Chip* foram preenchidos com o gel misturado ao corante e 5µl de *Marcador* foi então adicionado em cada canal do *Chip*. 12 amostras (1µl cada) na faixa de

concentração entre 25-250 ng/ul de RNA foram colocadas nos canais do *Chip*. Finalmente, 1µl de *RNA ladder* foi adicionado no canal atribuido a ele. O *Chip* foi centrifugado e analisado no Agilent 2100 Bioanalyzer. Como princípio, este instrumento detecta as biomoléculas pela fluorescência induzida pelo laser a 270-700nm de absorbância. Uma imagem de eletroferograma foi gerada e a qualidade das amostras foi dada pelo RNA Integrity Number (RIN) (Figura 2).

A qualidade do RNA é o fator mais importante na determinação do resultado na análise de microarranjo. O RNA total para ser usado deve estar intacto (não degradado) e livre de contaminações por proteínas e DNA. Os RINs dados pelo aparelho Agilent2100Bioanalyzer variam de 1 (RNA totalmente degradado) a 10 (RNA intacto). Somente RNAs de alta qualidade com RIN superior a 8 podem ser utilizados no microarranjo. Os resultados obtidos estão expressos em um eletroferograma onde são mostrados dois picos principais que representam as bandas 18 e 28S e seu respectivo numero RIN. O número RIN das amostras foi em média 9,3, indicando um RNA de alta qualidade, sem degradação.





5.6 ANÁLISES DE MICROARRANJO

As análises de microarranjo foram realizadas no McGill University and Génome Québec Innovation Centre, Montreal, Canada. Resumidamente, primeiro foi realizado a transcrição reversa do RNA alvo para cDNA utilizando o primer T7 oligo(dT), que sintetiza cDNA contendo a sequência promotora T7. Em seguida o cDNA já purificado foi utilizado como modelo para a transcrição in vitro com o objetivo de sintetizar o aRNA Biotinamodificado utilizando o kit IVT labeling master mix, gerando assim múltiplas cópias do aRNA modificado por biotina. Em seguida, para melhorar a estabilidade do aRNA, ele foi purificado para remover NTPs não incorporados, sais, enzimas e fosfato inorgânico. O aRNA foi então fragmentado e hibridizado no chip Affymetrix GeneChip Bovine Genome Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) que contém 23.000 conjunto de sondas e escaneado no GeneChip® Scanner 3000 (Affimetrix, Santa Clara, CA). Nestes experimentos foram utilizados 3 amostras de cada grupo. As análises dos dados foram realizadas utilizando o FlexArray Software V1.3 (Genome Quebec Innovation Center, Montreal, Canada, http://genomequebec.mcgill.ca/FlexArray/). O pacote de dados affx Bioconductor (http://bioconductor.org/) versão 1.1.0 foi utilizado para a normalização e processamento dos dados. Listas contendo a expressão referente a cada gene foram geradas para cada animal e em seguida estas listas foram comparadas entre os grupos controle, estimulado e superovulado. Desta forma, foram geradas três listas com genes aumentados ou diminuídos em \geq 1,5 vezes e o valor de P \leq 0,05. As listas de genes foram em seguida analisadas no programa Ingenuity Pathway Analysis 7 (IPA, Ingenuity Systems, San Francisco, CA; http://www.ingenuity.com/). Este programa interpreta os dados no contexto das vias e das funções biológicas comuns utilizando informações presentes na literatura. O IPA seleciona as principais vias e funções biológicas com maior número de genes presente.

5.7 TRANSCRIÇÃO REVERSA

Para a reação de transcrição reversa (RT), foi utilizado o "Kit SuperScript III (Life Tecnologies, Carlsband, USA) cujo protocolo iniciou-se pela adição em tubo estéril de 9 μ l da solução de RNA total tratado com DNAse (Life Tecnologies, Carlsband, USA) 1 μ l de oligonucleotídeos iniciadores Oligo (dt) (500 μ g/ml), 1 μ l de dNTP Mix (10 nM) e 3 μ l de água DEPC. Essa solução foi incubada a 65° C por 5 minutos e, em seguida, sofreu uma segunda incubação em gelo por 1,5 minutos. Após essas etapas, foram adicionados à solução 4µl de tampão, 1µl de DTT (0,1M) e 1µl de "RNAse OUT Inhibitor"(40 Unidades/ µl), na seqüência, foi acrescido de 1 µl (200 UI) de SuperScript III (transcriptase reversa) e iniciou-se a incubação, primeiramente a 50° C por 50 minutos, depois a 70° por 15 minutos e finalmente a 4 ° C por 2 minutos. O cDNA foi armazenado a -20° C até o momento da amplificação dos genes-alvo pela técnica de PCR em tempo real.

5.8 PCR EM TEMPO REAL

Independentemente dos resultados do microarranjo, primeiramente foi realizado o qPCR em tempo Real para os genes *VEGF*, *FLT1*, *KDR*, *FGF2*, *FGFR1*, *FGFR2*, *HSD3B*, *CYP11A1 e STAR* e o gene de referência *tubulina*, *alfa*. Para estes genes foi utilizado o metódo taqman (TaqMan Universal PCR Master Mix, Life Tecnologies, Carlsband, USA). A reação foi preparada pela adição de 6,25 µl de tampão Universal PCR Máster, 0,5 µl de primers sense, antissense (concentração final de 900 mM) e sonda (concentração final de 250 mM), 2,5µl de cDNA e 3,25µl e água ultrapura autoclavada. As especificações dos primers e probes utilizados estão descritos no quadro 1.

Após as análises dos resultados do microarranjo, o qPCR foi realizado para os genes molécula CD36 (*CD36*), proteína ligadora de ácido graxo 5 (*FABP5*), receptor gama ativado por proliferadores de peroxissoma (*PPARG*); citocromo P450, família 27, subfamília A, polipeptídio 1(*CYP27A1*), acil-CoA sintase, membro da família 2 (*ACSF*), 3-hidroxi-3metilglutaril-Coa redutase (HMGCR); hidrolase de ésteres de colesterol neutra 1 (*NCEH1*), receptor da prolactina curto (*PRLR*) e longo (*PRLRL*), folistatina (*FST*) e fator de crescimento transformador, beta 2 (*TGFB2*). O *GAPDH* e a *tubulina, alfa* foram utilizados como genes de referência. Para estes genes, foi utilizado o tampão SYBR Green (SYBR Green; Life Technologies, Carlsband, USA). A reação foi preparada pela adição de 10 µl do Sybr Green, 2,5 µl de primers sense e 2,5 µl de primers antissense (concentração final de 300mM) mais 10µl de cDNA para um volume final de 25µl. As especificações dos primers utilizados estão descritos no quadro 2. Nestes experimentos as condições de amplificação utilizadas foram: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C e 40 ciclos por 15 segundos à 95°C e 60°C por 1 minuto. No experimento utilizando o Sybr Green, foram necessários, para a curva de dissociação, 15 segundos à 95°, 1 minuto à 60°C e 15 segundos à 95°C.

Pata testar a eficiência da amplificação para cada par de primers, foi feita uma mistura de cDNA contendo o mesmo volume de cDNA de cada amostra. Esta mistura foi utilizada para fazer uma diluição seriada em água ultrapura de 1:2 até 1:64.

O cálculo da eficiência dos genes estudados foi realizado através do programa LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003). Para isso, considerou-se a eficiência média com base na curva de amplificação individual de cada amostra. O cálculo da quantificação relativa dos genes-alvo foi feito através da fórmula de Pfaffl (PFAFFL, 2001).

<u>Gene alvo</u>	<u>Primers</u>	Número da seqüencia no GeneBank
FGF2	S CCGGTCAAGGAAATACTCCAGTTG A GGTCCTGTTTTGGGTCCAAGTTTAT P TATGTGGCACTGAAACGA	NM_174216
FGFRI	S GGATGGCACCGGAGGC A CCAAGACCACACGTCACTCT P CTTGTTTGACCGGATCTAC	BC134637
FGFR2	S TCGGAATGTAACTTTTGAGGATGCT A TCAACCATGCAGAGTGAAAGG P CTTGGCGGGTAATTC	X94263
VEGF	S GCCCACTGAGGAGTTCAACAT A CTGGCTTTGGTGAGGTTTGATC P FAM-CACCATGCAGATTATGMGBNFQ	NM_174216
FLTI	S GCCTGAAATCTACCAGATCATGTTG ATTCCACAAGCTCCACGAATCTT P FAM-ACAAAGACCCAAAAGAAA	X94263
KDR	S ACTGCAGTGATGGCGTCTT A CTTGTAGGCTCCAGTATCATTTCCA P FAM-CTGTAAGATGCTCACAATTT	X94298
HSD3B	S GCTAGACAAAGTCTTCAGACCAGAA A CAGCAGGGTCAGCTTGATCTT P FAM CTGGAGCTTAGAAAATT	NM_001034696
CYP11A1	S CCCTTTCCACCAATCCAGCTAA GGACTGAGCGAGCAATGGAP FAMATGGCCCCACCCCCTC	NC_007319
STAR	S NFQ A ATGTGCGCAGCATGAAGGGGCTGCA P NFQ	NM_174189.2
Tubulina	S TGTTCGCTCAGGTCCTTTTGG A CCCTTGGCCCAGTTGTTG P CCCGGACTGACCAAAA	BT_0323101

Quadro 1 - Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no qPCR em tempo real pelo método Taqman. S= sense, A = antissense e P= probe (sonda).

<u>Gene Alvo</u>	Primer Sense	Primer Ant-sense	nº GenBank
ACSF2	CACAGTCATCTCGGTGGATG	GTCATGGCAGGACAGGAACT	<u>NM_001078112.1</u>
CD36	TCAGAAATCAAGTGACTGGGAAAA	ACCACACCAACACTGAGCAAGA	<u>NM_174010.2</u>
CYP27	AGCTGTTGGTGCAAGGCTAC	GTGCATCTGAGGCCCTACTC	<u>NM_001083413.1</u>
FABP5	CACAGCTGATGGCAGAAAGA	TCCCATCTTCCAGTTTTCTTG	NM_174315.3
GAPDH	GCGATACTCACTCTTCTACTTTCGA	TCGTACCAGGAAATGAGCTTGAC	AB098985
Folistatina	TTTCTGTCCAGGCAGCTCTA	GTCACTCCATCATTCCCACA	<u>NM 175801.2</u>
HMGCR	GAAATGGAACTCCCTGTGGA	TGGGATATGCTTTGCATTGA	NM_001105613.1
NCEH1	CCAGAAGAGCCTCTGAAACG	TGGTTGTGCACAGTTCATCAT	NM_001123034.1
PPARG	CACTCCGCACTATGAGGACA	ACAGGCTCCACTTTGATTGC	NM_181024.2
PRLRL	TTGATGTTCATCTGCTGGAGAAG	GCAAGTCCTCGCAGTCAGAA	<u>NM 001039726.1</u>
PRLRS	GCCTTCTCGCCTTGTGTCTATG	GCAAGTCCTCGCAGTCAGAA	<u>NM 001039726.1</u>
TGFB2	GCCGAGTTCAGAGTCTTTCGTTT	GCGCTGGGTTGGAGATGTTA	NM_001113252.1
Tubulina, alpa	TGTTCGCTCAGGTCCTTTTGG	CCCTTGGCCCAGTTGTTG	BT_0323101

Quadro 2 - Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no qPCR em tempo real pelo método Syber.

5.9 IMUNO-HISTOQUÍMICA

A técnica de imuno-histoquímica foi utilizada para localização das proteínas VEGF, FLT1, KDR, HSD3B e P450scc.

Após a fixação, o material foi processado na rotina histológica para inclusão em parafina e seccionado em cortes de 5 µm de espessura. As secções de tecido foram desparafinizadas em xilol e reidratados em uma série de etanol com concentrações decrescentes. A recuperação antigênica foi realizada pela imersão das lâminas em tampão

citrato (10 mM, pH 6.0) seguida de fervura no microondas (3 x 5 minutos). A peroxidade endógena foi bloqueada utilizando 1% (v/v) de peróxido de hidrogênio em metanol por 20 minutos. Para reduzir as ligações inespecíficas, os cortes foram incubados por 30 minutos em solução de bloqueio Protein block serum-free (DAKO, X0909, Califórnia-USA). Em seguida os cortes foram incubados com os anticorpos primários (Quadro 3), diluídos em PBS, overnight a 4°C nas seguintes diluições: VEGF (1:100); FLT1(1:500) KDR (1:100) HSD3B (1:200) e P450scc (1:300). O próximo passo foi a incubação com Dako LSAB System-HRP and DAB chromogen System (Dako, Carpinteria, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, os cortes foram contra corados com hematoxilina de Harris por 15 segundos e as lâminas fechadas com Permount. O controle negativo foi obtido substituindo-se o anticorpo primário por TBST.

5.10 IMUNOFLUORESCÊNCIA

A técnica de imunofluorescência foi utilizada para localização das proteínas STAR, FABP5, HMGCR e Folistatina.

O material foi processado como descrito acima, até o bloqueio com PBS + 5% BSA e incubados overnight a 4°C. Em seguida, as secções foram incubadas novamente overnight a 4°C com o anticorpo contra as proteínas em estudo de acordo com as seguintes diluições: STAR (1:300), FABP5 (1:500), HMGCR (1:50), Folistatina (1:200). As especificações dos anticorpos estão descritas no quadro 3. O próximo passo foi a incubação com o segundo anticorpo CY^{TM3} - Cabra anticoelho (Jackson Immuno Research Laboratories, Ontário, Canada) na diluição de 1:300 (STAR, HMGCR) ou FITC-conjugado anticoelho (Milipore, Temeluca, CA,USA) também na diluição de 1:300 (Folistatina) por 1 hora a temperatura ambiente. No final as lâminas foram incubadas com DAPI (Sigma- Aldrich, St.Louis, MO, USA) na diluição de 1:1000 por 5 minutos e montadas com PermaFlourTM Aqueous Mounting Medium (Thermo Scientific Waltham, Ma, USA). O controle negativo foi obtido substituindo-se o anticorpo primário por IgG de coelho ou camundongo (sc-2027 ou sc-2025; Santa Cruz Biotecnologies) na mesma diluição utilizada para o anticorpo primário,

procedimento sugerido pelo fabricante. A distribuição de cada proteína nos CLL foi observada no microscópio para florescência Olympus Fluoview 1000 system e no programa Fluoview version 1.7.

5.11 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA WESTERN BLOTTING

Para a determinação das proteínas VEGF, STAR, HSD3B, PPARG, FABP5, HMGCR, Folistatina e receptores da prolactina foi realizado a extração de proteínas totais. Os CLL foram homogeneizados em Polytron PT 3000 KINEMATICA® (Brinkman, Westbury, USA) em tampão de lise hipotônico contendo 10 mM de TRIS/HCl 5 mM de EDTA, pH 7.4, na presença de uma mistura de inibidores de proteases, tais como benzamidina (20 μ g/ml), pepstatina (1 μ g/ml), leupeptina (0,5 μ g/ml), apoproteína (0,1 μ g/ml) e PMSF (phenylmethanesulphonylfluoride, 100 μ g/ml). O homogenato foi centrifugado a 1000 x g durante dez minutos a 4°C. O sobrenadante foi então transferido para tubos de 1,5ml e armazenados a -20°C.

Para quantificação dos receptores FLT1 e KDR, foi realizada extração de proteínas de membrana. Os CLL foram homogeneizados em tampão de homogeneização (TRIS HCL 10mM; EDTA 1,0 mM; sacarose 250 mM) em proporção de 1:6 (peso volume). Em seguida, foi realizada uma centrifugação de 1000 x g durante 10 min a 4°C. O sobrenadante foi separado e o precipitado ressuspenso em tampão (1/3 do volume inicial) e submetido à nova centrifugação de 1000 x g por 10 minutos a 4°C. Juntos os dois sobrenadantes foram submetidos a uma ultracentrifugação de 150.000 x g durante 75 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então desprezado e o sedimento ressuspenso em tampão de homogeneização e estocado a -20° C.

A concentração de proteína das amostras foi analisada através do método de Bradford (BRADFORD, 1976) (Protein Assay Kit; Bio-Rad, Califórnia, USA), comparando as medidas obtidas para as amostras com a curva padrão de albumina lida a 595 nm.

64

A mesma quantidade de amostras (50ug) de proteínas totais foram desnaturadas pelo tratamento com tampão Laemmli (15 % glicerina, 0.05M Tris, 0.05 % azul de bromofenol, 9% SDS) contendo 6 % β-mercaptoetanol(1:1) e aquecidas a 95°C por 5 minutos. Em seguida as amostras foram separadas eletroforeticamente em gel de SDS-poliacrilamida em concentrações entre 6 e 17% de acordo com o peso molecular de cada proteína estudada. Após a separação, as proteínas foram transferidas para uma membrana de polivinilideno difluoreto (PVDF; Bio-Rad Laboratories, Inc, Califórnia, USA), sob corrente constante de 120 mA, durante 2 horas, a 4°C, em tampão Tris-HCL (Tris-HCL 12,5 mM glicina 95 mM, 1% sds e 20% de metanol). Após a transferência ocorreu o bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos, que foi realizado por meio de uma mistura contendo TBS com o detergente tween 20 (TBS-T; 1% tween 20) e leite desnatado (5%) por 2 horas em temperatura ambiente (20-25°C) com agitação constante. As membranas então foram incubadas com um anticorpo primário diluído em TBS-T e 3% de albumina a 4°C por 12 horas com agitação constante nas seguintes diluições: STAR (1:300), HSD3B (1:200), HMGCR (1:200), PPARG (1:200) Folistatina (1:800), receptores de prolactina (1:50) e FABP5 (1:500). As especificações dos anticorpos estão descritas no quadro 3. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário em TBS-T 1% de albumina por 2 horas em temperatura ambiente com agitação constante. Como anticorpos secundários foram utilizados anticorpos conjugados à peroxidase (IgG anticamundongo ou anticoelho, ECL, Amersham Biosciences, NJ; USA) na diluição de 1:5000. Como controle endógeno foi utilizada a actina, beta e o anticorpo utilizado foi actina, beta HRPconjugado anticamundongo (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), diluído 1:50,000 em solução de bloqueio por 30 minutos. O sinal foi detectado pela adição de um substrato para peroxidase (ECL, Amersham Biosciences, Buckinghahmshire, UK) por 2 minutos, o qual produziu uma reação de luminescência no local de ligação do segundo anticorpo. As membranas foram expostas a um filme fotográfico (Filme RX_A IBF Filmes do Brasil, São Paulo, Brasil), a temperatura ambiente, entre 1 e 15 minutos. O filme foi revelado com solução reveladora e reforçadora GBX (IBF Filmes do Brasil, São Paulo). As bandas referentes a cada proteína estudada foram quantificadas por densitometria no programa ImageJ (ImageJ, NIH, Bethesda USA) e a expressão proteicafoi dada em UA em relação a actina, beta.

Anticorpos	Isotipo	Epítopo	Firma (nºcatalogo)
VEGF	Coelho policlonal IgG	Terminação N do VEGF-A humano	Santa Cruz (sc-152)
FLT1	Coelho policlonal IgG	Terminação carboxila do Flt-1 humano	Santa Cruz (sc-316)
KDR	Coelho policlonal IgG	Terminação carboxila do KDR murino	Santa Cruz (SC-315)
STAR	Coelho policlonal IgG1	1-285 STAR humana	Santa Cruz (sc-25806)
HSD3B	Camundongo polyclonal IgG1	HSD3B humano completo	Santa Cruz (sc- 100466)
P450scc	Coelho policlonal IgG	421-441 CYP11A1 camundongo	Abcam (ab78416)
HMGCR	Coelho policlonal IgG	camundongo	Santa Cruz (sc-33827)
Folistatina	Coelho policlonal IgG	C-terminal do camundongo	Santa Cruz (sc-315)
PPARG	Coelho policlonal IgG	8-109 PPARG humano	Santa Cruz (sc-7196)
PRLR	Camundongo monolclonal IgG1	Porção extracellular do PRLR de rato	Abcam (ab2772)
FABP5	Coelho policlonal IgG	1-100 FABP5 humano	Abcam ab84028

Quadro 3 - Anticorpos utilizados nas técnicas de imuno-histoquímica, imunofluorescência e Western blotting

As análises estatísticas dos dados do microarranjo foram determinadas de acordo com o modelo de variância aleatório de Wright e Simon [análise da significância das análises de microarranjo (SAM)] (WRIGHT; SIMON, 2003). Para os outros dados, primeiro foi realizado o teste de normalidade (Anderson-Darling test) e os dados quando não apresentaram distribuição normal, foram transformados em logaritmo. Em seguida os dados foram submetidos ao teste ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Os resultados foram apresentados por média \pm erro padrão da média. Resultados foram considerados diferentes significativamente se p < 0,05.

6 RESULTADOS

6 RESULTADOS

6.1 FLUXO SANGUÍNEO NO CLL

O fluxo sanguíneo nos CLL dos animais dos grupos controle e estimulado foi determinado com o auxílio de um ultrassom Doppler. O fluxo sanguíneo no grupo superovulado não foi mensurado devido ao número de CLL o que impossibilita a visualização de um único CL. Foi observado que o tratamento estimulatório com eCG (dose de 400UI) não alterou o padrão de fluxo sanguíneo, pois nenhuma diferença dada em pixels/área do CL foi observada (P = 0.9; Figura 3).

Figura 3 – Imagem do CL e seu respectivo fluxo sanguíneo (porção colorida na imagem) de gravações do exame ultrassonográfico com Doppler realizado no dia 5 após a ovulação. A – grupo controle; B – grupo estimulado. Gráfico representando o valor da razão pixel/área



Os CLL dos animais dos grupos controle, estimulado e superovulados foram mensurados quanto ao volume e ao peso, e também foi avaliado o número de CLL produzidos por ovário nos animais superovulados.

O número de CLL produzidos pelos animais superovulados variou bastante dentro do grupo sendo a média de 19 CLL com mínimo de 6 e máximo de 36 CLL por animal.

O volume médio do CL foi maior nos animais do grupo estimulado quando comparado aos animais do grupo controle (1177 x 830 mm³; P=0,03) e maior ainda no grupo superovulado (1495 mm³) comparando aos outros dois grupos (p = 0,01; Figura 4A).

O peso médio do CL foi de 2,11 g nos animais do grupo controle, de 2,5 g nos animais do grupo estimulado e 2,77 g nos animais superovulados. Porém, nenhuma diferença significativa foi observada (P = 0,84, Figura 4B).





6.3 CONCENTRAÇÕES DE PROGESTERONA PLASMÁTICA

As concentrações de progesterona plasmática foram mensuradas em todos os animais. A concentração média de progesterona nos animais do grupo estimulado (5,94 ng/ml) foi significantemente maior quando comparada aos animais do grupo controle (3,69 ng/ml, p = 0,03) e aos animais superovulados (4,11 ng/ml; p = 0,01; Figura 5). A média da concentração de progesterona total nos animais superovulados foi de 85,12 ng/ml, sendo o valor mínimo 47,3 ng/ml e o máximo 184,7 ng/ml.

Quando foi calculada a quantidade de P4 em relação ao volume do CL, foi observado um aumento significativo nos animais estimulados comparado com os animais superovulados, porém nenhum dos grupos tratados foi diferente do controle (Figura 5B).

Foi observada uma correlação positiva entre o volume do CL e a concentração de progesterona nos animais estimulados (r = 0,61, p = 0,05), como também entre o número de CLL e a concentração de P4 nos animais superovulados (r = 0,76, p = 0,04).





6.4 ANÁLISE DO MICROARRANJO

As análises de microarranjo foram realizadas comparando a expressão gênica no corpo lúteo dos três grupos estudados. Deste modo, três listas com genes aumentados ou diminuídos significativamente mais que 1,5 vezes ($P \le 5$) foram geradas. O número de genes regulados presentes em cada lista está representado nos diagramas de Venn (Figura 6). A lista completa dos genes regulados (aumentados e diminuídos) nos animais estimulados e superovulados estão no anexo A.

Figura 6 – Diagrama de Venn Diagram – número de genes com a expressão aumentada e diminuída 1,5 vezes (P ≤ 0.05) nos animais estimulados e superovulados em relação ao controle e o estimulado em relação ao superovulado. Estim – grupo estimulado; Sup – grupo superovulado.



As três listas de genes foram analisadas em mapas de vias conhecidas usando o programa IPA. De acordo com o número de genes presentes em cada via e função biológica, o programa seleciona aquelas com o maior número de genes alterados de cada grupo. Nos

71
animais estimulados o maior número de genes expressos diferencialmente são pertencentes às vias relacionadas a morte celular, metabolismo de carboidratos e lipídios e desenvolvimento tecidual. No caso dos animais superovulados, as principais vias listadas foram relacionadas a sinalização célula-célula, resposta inflamatória, morfologia celular, ciclo celular, crescimento celular e proliferação, e metabolismo de lipídios.

Para os genes diferencialmente expressos nos animais estimulados comparados aos animais superovulados as principais vias estavam relacionadas com metabolismo de lipídios, modificações pós-traducionais, morte celular, sinalização célula-célula e enovelamento de proteínas. Além de classificar os genes diferencialmente expressos dentro das funções biológicas este programa também desenha redes relacionadas à interação entre os genes de acordo com uma função. Dentre as redes que embasaram a seleção dos genes a serem validados estão as de metabolismo de lipídios, crescimento e proliferação celular. Na figura 7, observa-se a interação entre os genes aqui estudados criada pelo programa IPA de acordo com a literatura, mas não necessariamente estas interações acontecem no CL. Além dos genes contidos nesta rede específica, outros genes foram escolhidos por estarem relacionados com a o metabolismo de lipídios (ACSF2 e NHCH) e a esteroidogênese (STAR, HSD3B e CYP11A).

Vale ressaltar que para os fatores de crescimento aqui listados como alvo de nosso estudo (FLT1, KDR, FGF2, FGFR1 e FGFR2) nenhuma alteração na expressão gênica foi detectada pela técnica de microarranjo. Somente o gene do VEGFA apresentou diminuição nos animais do grupo superovulado comparado aos animais controle (Tabela 1).

Figura 7 - Interação entre alguns dos genes que foram analisados por PCR. Esta interação entre os genes é construída pelo programa IPA a partir dos resultados do microarranjo. Em vermelho - mais aumentados; em branco - sem alteração.



- Enzima
- S & Receptor nuclear ligante dependente
- Y Receptor transmembrânico
- Transportador
- 🌱 Citocina/fator de crescimento
- 🔘 Coplexo-grupo
- Outro



	Estimulado x Controle		Superovulado x Controle	
Nome dos Genes	Vezes mudado	Valor de P	Vezes mudado	Valor de P
ACSF2	<u>1.89</u>	0.0001	-1.02	0.76
HSD3B1	-1.06	0.23	-1.10	0.13
CYP27A	<u>1.60</u>	<u>0.01</u>	<u>1.19</u>	0.04
CYP11A1	-1.02	0.78	-1.04	0.56
VEGFA	-1.10	0.46	- <u>1.52</u>	0.01
TGFB2	<u>1.52</u>	<u>0.03</u>	1.40	0.05
FST	<u>2.52</u>	0.002	1.50	0.21
NCEH	<u>-3.93</u>	0.001	-5.57	0.001
HMGCR	1.24	0.06	1.07	0.59
CD36	<u>1.56</u>	0.002	1.07	0.49
FABP5	<u>3.02</u>	<u>0.01</u>	<u>2.05</u>	<u>0.01</u>
PPARG	1.64	<u>0.01</u>	<u>1.53</u>	<u>0.03</u>
PRLR	<u>2.44</u>	<u>0.01</u>	-1.18	0.19
STAR	1.01	0.89	-1.05	0.57

Tabela 1- Resultado do microarranjo para os genes analisador por qPCR.

Valores sublinhados significam genes aumentados ou diminuídos (1.5 fold, P < 0.05).

6.5 VALIDAÇÃO DOS GENES POR PCR EM TEMPO REAL

A expressão do mRNA das enzimas esteroidogênicas HSD3B, CYP11A1 e STAR bem como dos fatores angiogênicos VEGF, FLT1, KDR, FGF2, FGFR1 e FGFR2, foi analisada em todos os grupos.

A expressão do mRNA da *STAR* foi maior tanto no grupo estimulado quanto no superovulado (p<0.01) em relação ao controle, porém, nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos estimulado e superovulado (Figura 8A). Já a expressão das enzimas *HSD3B* (P = 0,5) e *CYP111A* (P = 0,22) não foram influenciadas pelos tratamentos (Figura 8B e 8C).

Observou-se que não houve diferença significativa na expressão do mRNA do VEGF (P = 0.8) e seus receptores *FLT1* (P = 0,3) e *KDR* (P = 0,17) quando comparamos os grupos controle, estimulado e superovulado (Figura 9A, 9B e 9C).

Também não foi observada nenhuma diferença na expressão do *FGF2* e seu receptor *FGFR1* (P = 0,9). No entanto, a expressão do *FGFR2* foi maior nos animais do grupo estimulado quando comparado aos animais do grupo controle (P = 0,04) e também tendeu a ser maior nos animais do grupo superovulado em relação ao controle (P = 0,06) (Figura 9D, 9E e 9F).

Figura 8 - Expressão relativa do mRNA da STAR (A), HSD3B (B) e CYP11A1 (C) no corpo lúteo dos animais dos grupos controle, estimulado e superovulado no dia 7 após injeção de GnRh. Os dados são representados por média e erro padrão. Diferentes letras significam diferença significativa para P < 0,05. Tubulina, alfa foi usado como gene de referência.



Figura 9 - Expressão relativa do mRNA do VEGF (A), FLT1 (B), KDR (C), FGF2 (D), FGFR1(E) e FGFR2 (F) no corpo lúteo bovino dos animais dos grupos controle, estimulado e superovulado no dia 7 após injeção de GnRh. Dados são representados por média e erro padrão.





O qPCR em tempo real foi realizado para validação dos genes selecionados de acordo com as análises de microarranjo. Deste modo foram selecionados genes diminuídos ou aumentados (1,5 p \leq 0,05) no CL dos animais estimulados comparado aos animais controle: *ACSF*, CD36, PPARG, *CYP27A1*, *TGFB2*, receptor da prolactina (*PRLR*). Como também foram selecionados genes aumentados ou diminuídos tanto nos animais estimulados como também nos animais superovulados em relação aos animais do grupo controle: *FABP5*, *NCEH1*, folistatina (Figuras 11 e 12).

Nos animais estimulados, os resultados obtidos no qPCR foram, na maioria dos casos, iguais aos resultados do microarranjo. Nos animais superovulados a variância entre os resultados das duas técnicas foi maior, provavelmente devido a grande variabilidade na resposta ao tratamento. Para o gene *PPARG*, nenhuma diferença foi observada nos resultados do microarranjo e este gene encontra-se aumentando nos animais superovulados de acordo com os resultados do qPCR (P < 0.05).

O gene *HMGCR* também foi analisado pela técnica de qPCR devido a sua importância para síntese de colesterol. Nos animais estimulados e superovulados, a expressão foi aumentada comparada aos animais do grupo controle, o que não reflete completamente os resultados do microarranjo, uma vez que nenhuma diferença na expressão deste gene foi observada para os animais superovulados nesta técnica (Figuras 10 e 11).

Figura 10 - Expressão gênica em corpo lúteo bovino nos animais do grupo controle, estimulado e superovulado no dia 7 após injeção de GnRh determinado por qPCR em tempo real do genes: *CD36, FABP5, PPARG; CYP27A, ACSF2, HMGCR* e *NCEH1.* Resultados expressos em média ± erro padrão; barras com letras diferentes correspondem a diferenças significativas (P < 005) entre os grupos. *GAPDH e tubulina, alfa* foram usados como genes de referência.



Figura 11 - Expressão gênica em corpo lúteo bovino nos animais dos grupos controle, estimulado e superovulado no dia 7 após injeção de GnRh determinado por qPCR em tempo real dos genes: *PRLRS*, *PRLRL*, folistatina e *TGFB2*. Resultados expressos em média \pm EPM; barras com letras diferentes correspondem a diferenças significativas (*P* < 005) entre os grupos. *GAPDH* e *tubulina*, *alfa* foram usados como genes de referência.



As proteínas VEGF, FLT1, KDR, HSD3B e P450scc foram detectadas no corpo lúteo bovino pela técnica de imuno-histoquímica.

Os fatores angiogênicos VEGF, FLT1 e KDR foram localizados no citoplasma tanto das células grandes e pequenas quanto das células do estroma e pericitos, em todos os grupos estudados. Não foi possível observar nenhuma diferença expressiva na intensidade do sinal das proteínas dentre os diferentes grupos estudados. Porém nas células pequenas dos animais superovulados a expressão desta proteína parece aumentada (Figuras 12, 13 e 14).

A imunolocalização das proteínas P450scc e HSD3B (Figuras 15 e 16) mostrou a presença destas proteínas no citoplasma das células grandes e pequenas. Porém, nenhuma diferença na intensidade do sinal foi detectada entre os grupos. Uma reação positiva mais intensa foi observada nas células pequenas, principalmente nos animais tratados com eCG independentemente da dose. Nenhuma reação positiva foi observada nas células do estroma e pericitos. Nenhuma reação positiva foi observada nos controles negativos.

Figura 12 - Fotomicrografias da localização da proteína VEGF no corpo lúteo bovino. A - controle, B - estimulado (400 UI de eCG), C - superovulado (2000 UI de eCG) e D - controle negativo. Observar a reação citoplasmática positiva nas células grandes e pequenas (seta preta), pericito (seta vermelha) e do estroma (seta amarela). Barra: 50μm



Figura 13 - Fotomicrografias da localização da proteína FLT1 no corpo lúteo bovino. A - controle, B - estimulado (eCG), C – superovulado e D - controle negativo. Observar a reação citoplasmática positiva nas células grandes e pequenas (seta preta), pericitos (seta vermelha), e do estroma (seta amarela). Barra: 50µm



Figura 14 - Fotomicrografias da localização da proteína KDR no corpo lúteo bovino. A - controle, B - estimulado (eCG), C – superovulado e D - controle negativo. Observar a reação citoplasmática positiva nas células grandes e pequenas (seta preta), pericitos (seta vermelha) e do estroma (seta amarela). Barra: 50µm



Figura 15 - Fotomicrografias da localização da proteína da P450scc no corpo lúteo bovino. A (controle), B estimulado (eCG), C superovulado, D Controle negativo. Observar a reação citoplasmática positiva nas células luteínicas grandes (seta amarela) e pequenas (seta preta). Barra: 50µm.



Figura 16 - Fotomicrografias da localização da proteína da enzima HSD3B no corpo lúteo bovino. A – controle;
B – estimulado (eCG), C – superovulado, D – controle negativo. Observar a reação citoplasmática positiva nas células luteínicas grandes (seta amarela) e pequenas (seta preta). Barra: 50μm



6.7 IMUNOFLUORESCÊNCIA

A técnica de imunofluorescência foi utilizada para a localização das proteínas STAR, FABP5, HMGCR e Folistatina. Para a imunolocalização da proteína STAR, HMGCR e FABP5 foi utilizado o anticorpo secundário conjugado ao fluoróforo CY3, o que possibilita a visualização da reação positiva na cor vermelha, já para a Folistatina foi utilizado o anticorpo secundário conjugado ao fluoróforo FITC que mostra uma reação positiva na cor verde.

A imunolocalização da STAR mostrou a presença desta proteína no citoplasma das células grandes e pequenas. Uma reação positiva mais intensa foi observada nas células dos animais do grupo estimulado e superovulado quando comparado ao grupo controle. Nenhuma reação positiva foi observada nas células do estroma e pericitos.

O FABP5 foi localizado nas células luteínicas grandes e pequenas e um sinal positivo mais intenso foi observado nas células luteínicas dos animais estimulados e superovulados. Para proteína HMGCR a imunolocalização positiva foi observada nas células luteinicas grandes e pequenas como também nas células endoteliais e uma diferença na intensidade do sinal foi observada entre os grupos. Para a folistatina, foi observada reação positiva nas células luteinicas grandes e pequenas e sua reação parece estar em um maior número de células no CL dos animais estimulados e superovulados Nenhuma reação positiva foi observada nos controles negativos (Figura 17). Figura 17 - Expressão das proteínas STAR, Folistatina e HMGCR no corpo lúteo bovino coletado no dia 7 após injeção de GnRh pela técnica de imunofluorescência. Sinal positivo (vermelho para STAR e HMGCR ou verde para folistatina) pode ser observado no citoplasma das células grandes (setas cheias) e pequenas (setas vazias) nos animais do grupo controle, estimulado e superovulado. (CN) controle negativo. Barras = 50 μm



6.8 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA

As proteínas VEGF, FLT1, KDR, STAR, PPARG, FABP5, HMGCR, Folistatina, PRLRS e PRLRL foram acessadas e quantificadas pela técnica de Western Blotting. A expressão relativa foi calculada normalizando os resultados com a actina, beta (42kDa) para todas as proteínas estudadas.

Para o VEGF foi observada uma banda de aproximadamente 47 kDa (Figura 18A), e nenhuma diferença na expressão desta proteína foi detectada entre os grupos. Uma banda de 200 kDa correspondente a proteína FLT1 (Figura 18B) e uma de aproximadamente 180 kDa correspondente ao KDR (Figura 18C) foram observadas em todos os grupos. Nenhuma diferença significativa foi observada na expressão destes receptores entre os diferentes grupos.

Uma banda de 37 kDa correspondente a proteína STAR (Figura 19A) e uma de aproximadamente 30 kDa correspondente a HSD3B (Figura 19B) foram observadas em todos os grupos. Para a HSD3B nenhuma diferença foi observada entre os grupos, entretanto a expressão da STAR encontra-se aumentada nos animais dos grupos estimulado e superovulado (P < 0,05).

Para as proteínas FABP5, PPARG e HMGCR foram observadas bandas de 15, 52 e 55 kDa respectivamente. As análises densitométricas indicaram aumento de ambas as proteínas nos animais estimulados e superovulados comparados aos animais controle (p < 0.05, Figura 20A, 20B e 20C). Para detectar as proteínas correspondentes aos PRLRS e PRLRL foi utilizado um anticorpo que detecta ambas as isoformas. Deste modo, foi observado uma banda de aproximadamente 40 kDa correspondente ao PRLRS (Figura 21A) e uma de 100 kDa correspondente PRLRL (Figura 21B). A expressão relativa do PRLRS foi aumentada tanto nos animais estimulados quanto nos superovulados, enquanto o PRLRL foi aumentado somente nos animais estimulados (P < 0.05).

Nas análises para a proteína folistatina foram observadas duas bandas de aproximadamente 55 kDa com expressão aumentada nos grupos estimulado e superovulado comparado ao grupo controle (P < 0.05; Figura 21C).

Figura 18 - Expressão das proteínas VEGF (A), FLT1 (B) e KDR (C) em corpo lúteo bovino dos animais do grupo controle, estimulado e superovulado, no dia 7 após injeção de GnRh. Imagens da eletroforese são representativas de 3 experimentos independentes. Os dados foram normalizados pela expressão da actina, beta e estão expressos como media ± erro padrão; barras com letras diferentes correspondem a diferenças significativas (P < 0,05) entre os grupos</p>



Figura 19 - Expressão das proteínas STAR e HSD3B em corpo lúteo bovino dos animais do grupo controle, estimulado e superovulado, no dia 7 após injeção de GnRh. Imagens da eletroforese são representativas de 3 experimentos independentes. Os dados foram normalizados pela expressão da ACTB e estão expressos como media ± erro padrão; barras com letras diferentes correspondem a diferenças significativas (P < 0,05) entre os grupos



0.5

0

Controle

Estimulado Superovulado

Figura 20 - Expressão das proteínas FABP5, PPARG e HMGCR em corpo lúteo bovino dos animais do grupo controle, estimulado e superovulado, no dia 7 após injeção de GnRh. Imagens da eletroforese são representativas de 3 experimentos independentes. Os dados foram normalizados pela expressão da actina, beta e estão expressos como média ± erro padrão; barras com letras diferentes correspondem a diferenças significativas (P < 005) entre os grupos</p>



Figura 21 - Expressão das proteínas Folistatina, PRLRS e PRLRL em corpo lúteo bovino dos animais do grupo controle, estimulado e superovulado, no dia 7 após injeção de GnRh. Imagens da eletroforese são representativas de 3 experimentos independentes. Os dados foram normalizados pela expressão da actina, beta e estão expressos como média ± erro padrão; barras com letras diferentes correspondem a diferenças significativas (P < 005) entre os grupos</p>



7 DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

Alguns estudos mostraram a importância do emprego da eCG para aumentar a eficiência dos protocolos de sincronização seguido de inseminação artificial (IA), superovulação e transferência de embriões em tempo fixo (BARUSELLI et al., 2006; SOUZA et al., 2009; SA FILHO et al., 2010), além de enfatizarem a influência desta gonadotrofina produção de progesterona, hormônio de importância primordial para a regulação do na funcionamento do sistema reprodutor feminino, produzido principalmente pelo corpo lúteo (BERISHA; SCHAMS, 2005). Corroborando com estes achados, foi observado neste trabalho que ocorreu aumento na produção de progesterona em animais que receberam o tratamento de estimulação com eCG (dose de 400 UI), porém em animais que receberam o tratamento de superovulação a concentração de progesterona produzida por CL não foi influenciada pelo eCG, somente a concentração de progesterona total devido a maior quantidade de CLL. O volume do CL foi maior nos animais estimulados em relação aos animais do grupo controle e uma correlação positiva foi observada entre o volume do CL e a concentração de progesterona nos animais do grupo controle e estimulado. Os dados obtidos estão de acordo com a literatura, onde são citadas concentrações plasmáticas de progesterona mais altas no dia 5 após inseminação artificial (IA) em animais tratados com 400UI de eCG (6,6 ng/ml para animais tratados versus 3,6 ng/ml para animais não tratados) (SÁ FILHO et al., 2010). Neste mesmo trabalho foi observado no dia 15 após a IA um maior diâmetro do CL nos animais tratados (15,5 mm tratados versus 13,8 mm não tratados). Nos observamos que o eCG aumentou o volume do CL, e este aumento provavelmente levou ao incremento da produção de progesterona nos animais estimulados. Alguns estudos demonstram que receptoras que recebem eCG durante o tratamento de sincronização apresentam aumento da taxa de ovulação, além de possuírem maiores níveis de progesterona circulante no diestro minimizando falhas no reconhecimento da gestação (BINELLI et al., 2001) e aumentando a eficiência da transferência de embriões. Existem outros trabalhos que relataram correlação positiva entre concentração plasmática de progesterona e a taxa de concepção em receptoras de embrião (MANN; LAMMING, 1995). Além disso, elevadas concentrações de P4 imediatamente após o período de concepção estão associadas com um avanço no alongamento do concepto (FORDE et al., 2009) um aumento na produção de interferon tau (IFN-tau) (SOLOFF et al., 2011) e altas taxas de prenhez (BARUSELLI et al., 2010). Em vacas, 40% da perda de concepção ocorrem no período dos dias 8-16 da prenhez (dia 0- ovulação; DISKIN; MORRIS, 2008) uma proporção desta perda pode ser atribuída à inadequada circulação de P4. No início da gestação a P4 se liga ao seu receptor no epitélio uterino e no embrião, desencadeando duas cascatas diferentes, no caso de ruminantes: na primeira há o reforço da capacidade das glândulas uterinas para secretar histotrófo e assim melhorar a nutrição do embrião e na segunda o próprio embrião, permitindo-lhe aumentar a produção de IFN-tau e consequentemente inibir a secreção de PGF2 α uterina (SOLOFF et al., 2011). Além disso, muitos dos efeitos positivos da P4 na prenhez estão associados às mudanças na expressão gênica do útero que favorecem principalmente a disponibilidade de nutrientes para o embrião (FORDE et al., 2011). Desta forma, é possível que os processos acima mencionados sejam interrompidos quando o CL não produz P4 suficiente, prejudicando a gestação.

Em relação ao tratamento superovulatório, observamos que houve grande variabilidade na resposta, uma vez que obtivemos uma produção mínima de 6 e máxima de 36 CLL por animal. A variabilidade na resposta das doadoras ao tratamento superovulatório com gonadotrofinas continua sendo um dos maiores problemas nos programas comerciais de TE (MAPLETOFT; STEWARD; ADAMS, 2002; BARUSELLI et al., 2006). Esta variação individual ao tratamento superovulatório foi relatada tanto em vacas Nelore (*Bos indicus;* BARUSELLI et al. 2006), quanto em vacas holandesas de alta produção (*Bos taurus*; (MARTINS et al., 2006).

Com o intuito de identificar genes e/ou vias correlacionadas às funções celulares que poderiam estar alteradas após os tratamentos com eCG, a expressão gênica global foi analisada no tecido luteínico dos nossos grupos experimentais por microarranjo, tentando entender as alterações observadas em nosso estudo e já relatadas em outros relativas às concentrações plasmáticas de P4 e ao volume do CL. Deste modo foram identificados com sucesso vários genes expressos diferencialmente no CL de vacas estimuladas e superovuladas entre si e em relação às vacas controle.

Vale ressaltar que os tratamentos com o eCG foram realizados no folículo e analisamos o CL formado posteriormente, indicando que as alterações observadas na maquinaria celular podem ser devidas a reprogramação do folículo levando a formação de um CL maior e mais esteroidogênico. Como já é sabido, para a formação do CL ocorre intenso remodelamento de tecido e proliferação celular, além de mudanças na expressão gênica e no ciclo celular (ROBKER; RICHARDS, 1998). Desta forma, as principais vias alteradas em

ambos os grupos tratados com eCG foram de forma geral relacionadas ao desenvolvimento de tecido, morfologia celular, ciclo celular, crescimento celular, proliferação e metabolismo de lipídios e carboidratos. Estes achados indicam que as principais alterações que ocorrem para formação do CL são reguladas pelos tratamentos com eCG, as quais colaboram com o aumento do volume do CL observado em ambos os grupos tratados. Também foi observada expressão diferencial de genes pertencentes as funções celulares referentes ao metabolismo de lipídios e carboidratos o que é um importante aparato tanto para a produção hormonal quanto para disponibilizar energia para o desenvolvimento do CL.

Paralelamente, outro estudo de nosso grupo observou (RIGÓGLIO et al., 2012) características morfológicas do CL nos animais tratados com eCG que corroboram com estes achados: aumento do número de células luteínicas grandes nos animais estimulados e aumento do número de células luteínicas pequenas e hipertrofia das células luteínicas grandes nos animais superovulados. Estes dados nos levam a inferir que de fato muitas das alterações observadas no CL veem de alterações que ocorreram nos folículos que receberam os tratamentos. Como foi observado um aumento no número de células grandes nos animais estimulados, e de acordo com a literatura (ALILA; HANSEL, 1984; SCHAMS; BERISHA, 2004) a proliferação celular cessa nas células da granulosa no momento da luteinização, possivelmente este número aumentado de células vem da proliferação induzida pelo eCG no próprio folículo. Já em relação às características referentes aos CLL dos animais superovulados, hipertrofia das células luteínicas grandes e o aumento das células pequenas, são fatos que podem ocorrer na formação do CL, sendo uma regulação que favorece a proliferação celular na luteinização (ENDERS, 1973; FARIN et al., 1986).

Considerando o aumento nas concentrações plasmáticas de P4 nos animais tratados, foi verificada a expressão de fatores chaves relacionados à atividade esteroidogênica como as proteínas P450scc, HSD3B e STAR. Observamos que tanto a expressão gênica quanto a proteica da STAR foram aumentadas pelo eCG nos animais estimulados e superovulados, a qual provavelmente contribui diretamente com o aumento das concentrações de P4. A STAR realiza o transporte do substrato colesterol para membrana mitocondrial (STOCCO, D. M.; CLARK, 1996), sendo considerada a etapa limitante na biossíntese de esteroídes (LIN et al., 1995; STOCCO, D. M.; CLARK, 1996; STRAUSS et al., 2003; MILLER, 2007). Algumas pesquisas mostraram que a expressão do mRNA e da proteína da STAR é altamente correlacionada com as concentrações de progesterona e indicam que a expressão do mRNA da STAR é a chave da regulação da esteroidogênese. Porém, o primeiro passo enzimático na produção da progesterona é a conversão de colesterol em pregnenolona pela P450scc (SIMPSON et al., 1979) e em seguida a pregnenolona é metabolizada em progesterona pela HSD3B (SIMARD et al., 2005). Apesar das células luteínicas grandes e pequenas possuírem intensa atividade das enzimas P450scc e HSD3B (WILTBANK; BELFIORE; NISWENDER, 1993; BELFIORE et al., 1994) nenhuma destas enzimas foi influenciada pelo eCG. No entanto, a análise imuno-histoquímica indicou que a expressão da P450scc aparece mais intensa nas células luteínicas pequenas nos animais tratados com eCG. O interessante é que em bovinos, após a luteinização, é descrito que as células luteínicas grandes tem expressão 2 a 3 vezes maior de P450scc (AFLALO; MEIDAN, 1993). E ainda, de acordo com Kohen et al., (2003), o aumento da transcrição da STAR, da proteína e da sua atividade juntos parecem ser suficientespara a resposta esteroidogênica aguda à estimulação trófica (KOHEN et al., 2003). Como o eCG não demonstrou incrementar a síntese das enzimas P450scc ou HSD3B, responsáveis pela produção de P4, este hormônio pode modular a síntese de P4 não pelo aumento destas enzimas esteroidogênicas, mas por facilitar a disponibilidade e o transporte de colesterol do citoplasma para a membrana mitocondrial, conforme descrito anteriormente CLARK. (STOCCO, D. M.: 1996). As alterações fisiológicas na síntese de hormônios esteróides estão intimamente relacionadas com alteração na expressão da STAR, demonstrando uma importância tecido-específica da proteína STAR, principalmente na reprodução (MANNA et al., 2009).

Adicionalmente ou alternativamente a *de novo* síntese de colesterol pode ser mais uma forma de aumentar o colesterol disponível para a esteroidogênese no CL e a enzima determinante neste processo é a HMGCR (GWYNNE; STRAUSS, 1982). Tanto a expressão gênica quanto proteicadesta proteína estavam aumentadas nos animais estimulados e superovulados, e já foi reportado que o FSH aumenta expressão do HMGCR em células da granulosa de rato (LI, Q. et al., 2009). Além disso, ela também pode ser regulada de acordo com a fase do CL, com uma diminuição em sua expressão no CL em regressão (PRIYANKA et al., 2009). Normalmente a atividade desta proteína é regulada via um "feedback" negativo, e envolve a regulação do promotor de seu gene por esteróis (GOLOS; STRAUSS, 1988). Deste modo, a regulação da produção de progesterona pelos tratamentos com eCG parece ser mediada, pelo menos em parte, pelo aumento da expressão da HMGCR, que normalmente leva um aumento da síntese de colesterol.

O PPRG regula a transcrição de muitos genes envolvidos nas funções ovarianas, como na esteroidogênese e na manutenção do CL (KOMAR, 2005), e é ativo em um grande número

de via metabólicas, incluindo o metabolismo de lipídios e do colesterol, sendo considerado o principal regulador da homeostase lipídica celular. Além disso, a ativação do PPARG pode afetar a síntese de hormônios esteróides ovarianos via aumento da expressão da STAR (SETO-YOUNG et al., 2007). Neste estudo, tanto a expressão gênica quanto a proteica do PPARG foram maiores em vacas tratadas com eCG comparadas as vacas não tratadas. Estes dados indicam que este fator de transcrição pode participar na ativação da expressão da STAR além de outros genes relacionados ao metabolismo de lipídios no CL de vacas tratadas com eCG. Entres os genes alvos do PPARG (HAUNERLAND; SPENER, 2004; CHMURZYŃSKA, 2006) envolvidos no metabolismo de lipídios, e que foram regulados pelo eCG, podemos destacar o CD36, FABP5, CYP27A1 e ACSF2.

O CD36 é um receptor multifuncional que medeia a endocitose ou a capitação seletiva de colesterol derivados das lipoproteínas LDL e HDL além de também regular a angiogênese (FEBBRAIO; HAJJAR; SILVERSTEIN, 2001). Neste estudo sua expressão gênica estava aumentada somente nos animais estimulados, e provavelmente ele pode ajudar no aumento nos níveis de P4 nestes animais via aumento do substrato disponível. Como ele é um gene que tem sua expressão aumentada em folículos pré-ovulatórios de bovinos em resposta ao LH (LI, Q. et al., 2009) é possível que ele seja mais influenciado pelo eCG no tratamento estimulatório. Apesar de ser um gene regulado no folículo pré-ovulatório sua função no ovário ainda precisa ser mais estudada.

FABP5 foi o gene mais aumentado entre os genes validados nos animais estimulados e também aumentado nos animais superovulados. O FABP5 é um transportador de lipídeos relacionado ao PPARG. Ele ainda transporta lipídios para gotículas de estoque, para o retículo endoplasmático, para sinalização, para a mitocôndria ou para oxidação (CHMURZYŃSKA, 2006). Adicionalmente, a diminuição da expressão do FABP5 em células ARPE-19 resulta em diminuição nos níveis de colesterol e ésteres de colesterol (WU et al., 2010). Também já foi demonstrado que a expressão do FABP5 aumenta em ovário de ratos após indução da ovulação com hCG (HENNEBOLD, 2004). Diante do exposto, pode-se sugerir uma potencial função do FABP5 no CL, podendo este estar relacionado a captação e/ou ao transporte do colesterol e outros lipídios dentro da célula luteínica. O CYP271A e ACSF2 foram outros dois genes analisados que também participam no metabolismo de lipídios e a expressão de ambos os genes estava aumentada nos animais estimulados comparados aos animais controle. O CYP27A1 catalisa a formação de 27-hidroxicolesterol, a qual pode ser regulada pela atividade esteroidogênica nas células do ovário para assegurar a disponibilidade de

precursores dos hormônios esteróides (RENNERT et al., 1990). Por outro lado, o ACSF2 pertence à família das Acil-Coa sintases de cadeia longa e catalisa a síntese de acyl-Coa, um substrato que pode participar de várias vias como síntese *de novo* de acido graxo, síntese de triacilglicerol e de fosfolipídios, β-oxidação, e esterificação do colesterol (COLEMAN et al., 2002). Como os genes CYP27A e o ACSF2 estavam aumentos somente nos animais estimulados, o metabolismo de lipídios parece ser mais regulado pelo eCG nestes animais provavelmente devido as características dos folículos no momento de aplicação do hormônio. Os folículos dominantes possuem maiores níveis de proteínas envolvidas na síntese de estrógeno e progesterona bem como elevada expressão de mRNA para receptor de FSH nas células da granulosa e para receptor de LH nas células da teca (BAO et al., 1997). Considerando todos os achados acima mencionados existe uma regulação na homeostase de lipídios nas células luteínicas e que pode ser regulada pelos tratamentos com eCG, levando por exemplo a uma maior eficiência ou magnitude da síntese de esteroides.

Uma dado interessante deste estudo foi a diminuição da expressão gênica da NCEH1 nos animais tratados com eCG. Esta proteína é importante para hidrólise de ésteres de colesterol encontrados nas gotículas de lipídios, e sua atividade pode ser regulada pelos hormônios FSH, LH e hCG (TRZECIAK et al., 1984; KRAEMER et al., 1993; ATEN; KOLODECIK; BEHRMAN, 1995). Entretanto, a NCHH1 não é dinamicamente regulada nas células luteínicas, e, portanto não limita a esteroidogênese. Chung et al., (CHUNG et al., 2001) demonstraram que a deleção de seu gene não resulta em acumulo de ésteres de colesterol nas células esteroidogênicas sugerindo a existência de genes alternativos, como por exemplo, a lípase sensível a hormônios, com atividade colesterol esterase. A regulação negativa deste gene poderia levar a um acúmulo de ésteres de cholesterol intracelulares, diminuindo o suprimento de cholesterol livre para ser utilizado pelas células luteínicas. Entretanto, as proteínas com função cholesterol esterase não são essenciais para a disponibilidade de cholesterol para a maquinaria esteroidogênica (MILLER; BOSE, 2011).

Outro gene de particular interesse regulado pelo eCG foi o receptor de prolactina, uma vez que a prolactina pode afetar a produção de progesterona (STOCCO, 2011) e a diferenciação e a proliferação celular em diversos tecidos (BOLE-FEYSOT et al., 1998). Enquanto as evidências para uma função da prolactina no ovário de bovino é controversa, em roedores a função da prolactina no CL está bem estabelecida e células do CL knockout para este gene falharam em se organizar apropriadamente e sofreram dramática apoptose (GROSDEMOUGE et al., 2003). Em nosso estudo a expressão do mRNA e da proteína dos

dois receptores de prolactina, PRLRS e PRLRL, foram aumentados nos animais estimulados, enquanto somente a proteína do PRLRS foi aumentada nos animais superovulados. Estes resultados apontam para um possível envolvimento do eCG na regulação da expressão destes receptores, e indicam que cada isoforma pode ser regulada independentemente (PICAZO et al., 2004). Além disso, o aumento na expressão do PRLRS nos animais superovulados pode estar relacionado a sua ação na proliferação celular e na estimulação da angiogênese (BOLE-FEYSOT et al., 1998; STOCCO, C., 2011) contribuindo para o desenvolvimento do CL, enquanto que o aumento na expressão do PRLRL nos animais estimulados pode estar relacionado aos efeito da prolactina na produção de progesterona no CL (STOCCO, 2011).

Além dos genes já descritos, e com a finalidade de tentar entender um pouco mais sobre a influência dos tratamentos com eCG na função do CL, os genes Folistatina e TGFB2, também foram analisados (CHAPMAN; WOODRUFF, 2001; OTSUKA et al., 2001). A folistatina pode modular as funções das células da granulosa em favor da luteinização, bem como modular diretamente a produção de P4 pelo CL (FINDLAY, 1993; HILLIER; MIRÓ, 1993; LI, R.; PHILLIPS; MATHER, 1995). Além disso, folículos dominantes de bovinos contém mais folistatina que os seus subordinados e no CL sua máxima expressão foi detectada no dia de máxima atividade do CL (SINGH; ADAMS, 1998a). Os tratamentos com eCG aumentaram a expressão gênica e proteicada folistatina tanto nos animais estimulados quanto nos animais superovulados. Como a folistatina é expressa principalmente nos folículos pré-ovulatáorios, estes resultados sugerem que a folistatina possa influenciar os estágios finais do crescimento folicular favorecendo a luteinização nos animais tratados com eCG, bem como influenciar o desenvolvimento do CL e a produção de progesterona.

O TGFB2 é um fator de crescimento multifuncional que pode mediar vários processos fisiológicos da função celular (ROBERTS, A. J.; SKINNER, 1991), incluindo o crescimento do folículo, a proliferação celular e a intensa formação da matriz extracelular (LAWRENCE, 1996). No CL o TGFB2 está expresso principalmente nas células luteínicas pequenas (SRIPERUMBUDUR; ZORRILLA; GADSBY, 2010) e nos macrófagos (MATSUYAMA; TAKAHASHI, 1995). Além disso, ele pode mediar a ação luteotrófica da prolactina no CL de rato e também aumentar a produção de progesterona pelas células da teca em bovinos (ROBERTS, A. J.; SKINNER, 1991). No entanto, as funções específicas deste fator no CL não estão bem estabelecidas. Neste estudo, sua expressão gênica apresentou-se aumentada nos animais estimulados e estes resultados fornecem informações adicionais sobre o envolvimento do TGFB2 no desenvolvimento e remodelamento do CL e uma possível regulação pelo eCG.

Como o TGFB2 é principalmente expresso em células da teca, o aumento da expressão deste gene após o tratamento de estimulação com eCG pode estar relacionado aumento da produção de progesterona pelas células da teca, corroborando com o aumento da progesterona plasmática observada neste animais.

Dentre os outros fatores de crescimento que têm uma função importante no CL podemos destacar os fatores VEGF e FGF2 uma vez que eles são conhecidos como os mais proeminentes estimuladores da angiogênese, processo crucial para o desenvolvimento do CL (BERISHA et al., 2000; ENDO et al., 2001; YAMASHITA et al., 2008). Embora a expressão de VEGF e seus receptores têm sido extensivamente estudada em CLL bovinos (BERISHA et al., 2000; WULFF et al., 2000; ENDO et al., 2001) este é o primeiro relato a avaliar a sua regulação após a exposição ao eCG. Além disso, estudos recentes mostraram que as gonadotrofinas tem propriedades angiogênicas (REISINGER et al., 2007) e podem modular o sistema vascular dos órgãos genitais, por influenciar a expressão do VEGF e seus receptores e do FGF2, bem como de outros fatores como as angiopoetinas (YANCOPOULOS et al., 2000) e o PDGF(SLEER; TAYLOR, 2007). Apesar disso, dentre o que foi estudado em relação aos fatores angiogênicos, a única influência observada exercida pelos tratamentos foi sobre a expressão gênica do FGFR2, que foi maior nos animais estimulados. Esperávamos, no entanto, que os sistemas VEGFA e FGF2 estivessem alterados, não só em vacas superovuladas, mas também nas estimuladas uma vez que o VEGF e FGF2 aumentam a secreção de P4 pelas células lúteínicas em várias espécies (GOSPODAROWICZ; MORAN; BRAUN, 1977; YAMASHITA et al., 2008) indicando que ambos os fatores estão envolvidos na formação do CL e no controle da secreção de P4. Além disso, resultados de nosso grupo demonstraram que em corpos lúteos gerados posteriormente às múltiplas ovulações induzidas pelo tratamento superovulatório em búfalas, utilizando-se doses repetidas de FSH houve aumento da expressão proteicado VEGF, e seus receptores, bem como do FGF2 e seus receptores (FATIMA, L. A., 2008), além de ter sido observado aumento na densidade vascular destes CLL (MOURA, 2003) e na produção de progesterona por CL (PAPA et al., 2007). Avaliações referentes ao fluxo sanguíneo no CL das vacas estimuladas comparado as vacas controle foram realizadas, uma vez que, de acordo com Herzog e colaboradores (2010), um fornecimento de sangue elevado para o CL representa uma pré-condição importante para a secreção de P4. Um suporte sanguíneo adequado é essencial tanto para entrega do substrato para produção hormonal (JANSON; DAMBER; AXÉN, 1981) como para a liberação da P4 produzida na circulação (ACOSTA; BEG; GINTHER, 2004). Estudos demonstraram que

quando comparadas fases de maior e menor produção de P4 pelo CL bovino (dia 12 comparado ao dia 6 do ciclo estral), foi observado um aumento no fluxo sanguíneo sem, no entanto, haver aumento do volume de vasos, sendo esta mudança observada relacionada a vasodilatação das arteríolas existentes e não a formação de uma nova vascularização (LEI et al., 2001). Vale ressaltar que o CL é um órgão muito vascularizado com uma intensa formação de rede vascular principalmente no início de sua formação e que muitos fatores que regulam a vascularização luteínica desempenham um papel importante na função luteínica (SCHAMS et al., 2001).

Os tratamentos com eCG podem ser potencialmente importantes para o desenvolvimento e manutenção do CL e para produção de progesterona. Na figura 22 confeccionamos um modelo gráfico que propõem como as interações dos genes estudados levam as alterações observadas como o aumento do volume do CL e da P4. Nos animais estimulados, o aumento do volume do CL juntamente com o aumento da expressão da STAR e dos receptores da prolactina, como também a regulação dos genes relacionados com a síntese de lipídios podem ser importantes mediadores do aumento da esteroidogênese. Além disso, a interação entre estes genes parece ser mais eficiente nestes animais, levando a um efetivo aumento no volume do CL seguido de aumento na produção de progesterona. Já nos animais superovulados, a maioria dos genes estudados também foi influenciada pelo eCG, porém, não foi observado um aumento da P4 produzida por CL. A interação entre os genes provavelmente favoreceu a proliferação celular, principalmente nas células luteínicas pequenas (RIGOGLIO et al., 2012) o que contou diretamente para o aumento do volume do CL, porém como são as células luteínicas grandes as maiores produtoras de P4 este aumento do volume do CL não refletiu em aumento da produção de P4.

Quando todos os genes em estudo são analisados conjuntamente pode-se inferir que a regulação da expressão dos genes descritos pode ter uma profunda influência nas funções do CL, afetando o substrato para a síntese de hormônios e para energia requerida para isso, além do remodelamento das estruturas necessárias para o desenvolvimento do CL, bem como proliferação celular afetando desta forma o volume do CL. É importnate ressaltar que uma adequada produção de progesterona pelo CL é essencial para o desenvolvimento do embrião. O conjunto de características observado em ambos os tratamentos aqui discutidos demonstram que os tratamentos tanto de estimulação usado em receptoras de embrião como os tratamentos superovulátorios utilizados em doadoras de embrião causam alteração na

formação do CL e consequentimente em sua função levando a uma melhora no quadro reprodutivo de vacas como um aumento na produção de embriões e nas taxas de prenhez.

Figura 22 - Esquema demonstrando nossa hipótese sobre a sequência dos eventos envolvidos no aumento do volume de CL e da P4 plasmática observados após os tratamentos com eCG. A cor das caixas de dialogo dentro do CL estão relacionadas com o tratamento utilizado uma vez que nem todos resultados observados ocorreram em ambos os tratamentos; ↑: melhorar ou promover



CAPÍTULO 2

INFLUÊNCIA DO FSH NA EXPRESSÃO DO VEGF EM CÉLULAS DA GRANULOSA BOVINAS LUTEINIZADAS EM CULTIVO

CAPÍTULO 2 - INFLUÊNCIA DO FSH NA EXPRESSÃO DO VEGF EM CÉLULAS DA GRANULOSA BOVINAS LUTEINIZADAS EM CULTIVO

8 INTRODUÇÃO

O hormônio folículo estimulante (FSH) é utilizado em protocolos de superovulação, com o objetivo de estimular o crescimento e a múltipla ovulação dos folículos antrais (ADAMS, 1992). Já foi demonstrado que a superovulação com a utilização de FSH leva a alterações hormonais como também aumento da vascularização nos CLL formados (PAPA et al., 2007; FATIMA, 2008). Além disso, vários estudos sugerem que as gonadotrofinas modulam a expressão dos fatores de crescimento (CHRISTENSON et al. 1997; LEE et al., 1997; MAYBIN E DUNCA, 2004; PIETROWSKI; KECK, 2004).

Em um processo fisiológico normal, o FSH é responsável pelo desenvolvimento das células da granulosa durante a foliculogênese, causando a proliferação e subsequente diferenciação destas células. O FSH controla o desenvolvimento do folículo pela interação com receptores específicos localizados exclusivamente nas células da granulosa (XU et al., 1995). Sua atividade biológica envolve estimulação das comunicações intercelulares, sinalização intracelular, aumento da esteroidogênese (LEVI-SETTI et al., 2004) e de fatores de crescimento (KUMAR; MATZUK, 2000). Dentre os fatores de crescimento regulados pelo FSH podemos destacar o VEGF e a importância deste fator no desenvolvimento folicular, bem como do corpo lúteo vem sendo bastante investigado (FERRARA et al., 1998; BERISHA et al., 2000; DOYLE; WALKER; DONADEU, 2010) uma vez que a administração de substâncias que inativam o VEGF bloqueiam o desenvolvimento e a função do folículo pré-ovulatório. Além disso, normalmente os níveis de 17β-estradiol e progesterona são significativamente aumentados em folículos após estimulação com gonadotrofina, mas quando a função do receptor KDR do VEGF é bloqueada, este aumento hormonal não é observado (ZIMMERMANN et al., 2003). Fazer e Lunn (FRASER; LUNN, 2001) demonstraram em primatas que a inibição da sinalização do VEGFA ocasionou distúrbios na ovulação, bloqueou a subsequente vascularização do corpo lúteo e impediu o aumento dos níveis de progesterona. Em suínos, a produção folicular do VEGF é estimulada por gonadotrofinas (MATTIOLI et al., 2001) e está positivamente relacionada com o tamanho do

folículo (GRASSELLI et al., 2002). Em bovinos, Doyle et al. (DOYLE; WALKER; DONADEU, 2010) demonstraram que o VEGF, associado ao FSH, atuou para induzir a proliferação de células da granulosa de folículos de 4 a 8 mm, o que demonstra o importante papel do VEGF no desenvolvimento vascular no interior da parede folicular e consequentemente do CL. De acordo com Sasson et al. (SASSON et al., 2003) a indução do VEGF pelo FSH está relacionada a estimulação da angiogênese e permeabilidade vascular necessárias durante a ovulação.

A transição do folículo para o corpo lúteo e a subsequente luteólise resulta em um massivo crescimento e regressão dos vasos sanguíneos, sendo o corpo lúteo um órgão com intensa angiogênese (PLENDL, 2000). Deste modo, fatores que regulam a vascularização do CL têm papel importante na função do órgão (SCHAMS et al., 2001). Sabe-se que os principais reguladores da angiogênese no CL são o VEGF (FERRARA et al., 1998; BERISHA et al., 2000) e o FGF2 (BERISHA et al., 2000). Dados de nosso grupo demonstraram que o tratamento superovulatório com doses repetidas de FSH em búfalas é capaz de aumentar a expressão proteica do VEGFA (PAPA et al., 2007) e do FGF2 e seus receptores nos CLL gerados (FATIMA, L. A. , 2008), além de ser capaz de aumentar a densidade vascular destes CLL (MOURA, 2003) e a produção de progesterona (PAPA et al., 2007). Por outro lado, o mRNA dos mesmos genes encontravam-se menos expressos. No entanto, foi observado que o tratamento de superovulação em vacas com o uso de eCG causam alterações na expressão gênica de vários genes no CL formado, porém, este tratamento não demonstrou influenciar a expressão do sistema VEGF (FATIMA, L A et al., 2011).

Sabe-se que o VEGF pode ser regulado tanto na transcrição quanto na tradução, bem como por processos pós-transcricionais e pós-traducionais relacionados à estabilidade de mRNA e proteína, respectivamente (AKIRI et al., 1998). Além disso, vários fatores são conhecidos como reguladores do VEGF. A hipóxia é um dos mais potentes estimuladores do VEGF (SHARKEY et al., 2000). O LH, hCG e IGF-1 (fator de crescimento semelhante a insulina 1) também são potentes estimuladores da expressão e da secreção da proteína VEGF em células granulosas de bovinos (SCHAMS et al., 2001). A progesterona também tem um efeito estimulatório na produção de VEGF em vários tipos celulares, tais como células cancerosas da mama (HYDER; STANCEL, 1999) e células da granulosa de rato (ISHIKAWA et al., 2003) e de bovino (ROBINSON et al., 2007). Vale ressaltar que o VEGF é considerado

um alvo do FSH, e que esta gonadotrofina tem propriedades angiogênicas (REISINGER et al., 2007).

De acordo com os dados apresentados, o tratamento superovulatório com FSH induz o aumento da expressão das proteínas dos fatores de crescimento relacionados à vascularização no CL, ao mesmo tempo em que diminui a expressão do mRNA dos mesmos fatores. Acredita-se que possa ocorrer um incremento na maquinaria de tradução da célula luteínica estimulada pelo tratamento superovulatório. Desta forma, nossa hipótese é a de que o FSH regula a expressão do sistema VEGF em células da granulosa luteinizadas em cultivo, e que, adicionalmente, possa haver uma alteração da estabilidade do mRNA e/ou da proteína nestas células induzida pelo FSH.

9 HIPÓTESE

9 HIPÓTESE

O FSH influencia a expressão do VEGF e altera a maquinaria celular relacionada à síntese e estabilidade proteica e de RNA deste gene.

Para testar tal hipótese, os seguintes objetivos foram estabelecidos:

- 1. Padronizar um modelo com células da granulosa luteinizadas em cultivo que mimetize o tratamento utilizado no modelo *in vivo* de superovulação com o uso do FSH.
- Analisar a influência de tratamentos com FSH nas células da granulosa de folículos grandes (<8mm) luteinizadas em cultivo.
- Analisar o efeito do FSH na expressão gênica e proteica do fator angiogênico VEGF e de seu receptor KDR.
- 4. Analisar o efeito do FSH sobre a estabilidade da proteína e/ou do gene do VEGF.

10 MATERIAL E MÉTODOS
10 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados cultivos de células da granulosa de folículos pequenos (< 6mm) e grandes (< 8mm) para avaliarmos a influência do FSH na expressão gênica e proteica do VEGF e do KDR.

10.1 CULTIVO DE CÉLULAS DA GRANULOSA

Os ovários foram coletados no Frigorífico Mantiqueira em São José dos Campos – SP e foram transportados ao laboratório, a 4°C, em solução tampão fosfato contendo antibiótico e antifúngico. Durante os procedimentos utilizou-se o Dulbeco's Modified Eagle Médium (D-MEM) Nutrient Mixture F12 (Sigma Aldrich), suplementado com solução de antibiótico e antifúngico (100.000 UI de penicilina, 100 mg de estreptomicina e 250 µg de anfoterricina B por litro de meio).

Para um protocolo que mimetize o protocolo de superovulação com o uso do FSH os folículos pequenos (< 6mm) foram cuidadosamente dissecados, incisados e lavados em meio de cultivo para obtenção das células da granulosa. Já para mimetizar o protocolo de estimulação, foram utilizados folículos grandes (> 8mm). A suspensão celular de ambos os folículos foi centrifugada (450 x g por 5 minutos a 4°C) separadamente, em seguida ressuspensa e centrifugada mais duas vezes sob as mesmas condições.

A concentração e a viabilidade celular foram determinadas utilizando-se o método de exclusão pelo Trypan Blue. O cultivo foi realizado utilizando-se uma concentração de 1×10^6 células viáveis, em placa de 24 poços com 1 ml de meio de cultivo, o qual foi trocados todos os dias e mantido em estufa a 37°C com CO2 a 5%. Foram realizados 3 cultivos independentes e cada um em triplicata.

Para os cultivos de folículos pequenos, as células da granulosa foram cultivadas por 8 dias, divididas em 9 grupos. Nos primeiros 4 dias de cultivo, um grupo recebeu somente meio de cultivo sem hormônio, outro grupo recebeu 10ng/ml de FSH (Sigma) e o terceiro 100ng/ml FSH. No quarto dia de cultivo (96h após o início), cessou-se a adição de FSH, e os grupos foram divididos para receber 0, 250 e 400 ng/ml LH (Sigma-Aldrich). No quinto dia (24 horas após a adição de LH), o meio de cultivo foi substituído por DMEM com 1% de soro fetal bovino. As células foram observadas e fotografadas ao longo do cultivo. As células e o meio de cultivo foram coletados nos dias 0, 4, 5 e 8. No protocolo para os folículos grandes, nos primeiros 2 dias de cultivo, um grupo recebeu somente meio sem hormônio e o outro 10ng/ml de FSH. No segundo dia de cultivo (48h após o início), cessou-se a adição de FSH, e ocorreu a adição de 250 ng/ml de LH. No quarto dia (24 horas após a adição de LH), o meio de cultivo foi substituído por DMEM com 1% de soro fetal bovino. Neste sistema de cultivo, o meio foi coletado nos dias 2, 3 e 5. Foram realizadas análises da produção hormonal (17βestradiol e progesterona) no meio de cultivo, pelo método de radioimunoensaio utilizando-se kits de fase sólida (Coat-a-Count RIA kits; Siemens Healthcare Diagnostics, EUA). As amostras de células foram coletadas no dia 5 e 8 nos cultivos de folículos grandes e no dia 5 no cultivo de folículos pequenos.

Para análise de estabilidade de RNA, no dia 5 do cultivo foi acrescentado ao meio um inibidor de transcrição, a actomicina D (ActD; 5 mg/ml; Sigma-Aldrich) e as células permaneceram no cultivo por 0, 1, 2, 3 e 4 horas. Após estes tempos, as células foram coletadas para análises da expressão do mRNA do VEGF. O momento 0 foi considerado 100% de expressão gênica, e a expressão do gene e da proteína dos tempos subsequentes foram analisadas em relação ao tempo zero. Nas análises referentes a estabilidade da proteína, no dia 5 do cultivo foi adicionado ao meio cicloheximida (1.0 μ g/ml, Sigma-Aldrich) para inibir a síntese de proteínas. Após a adição do inibidor, as células foram cultivadas por 30 minutos e coletadas para análises da expressão proteica do VEGF.

10.2 EXTRAÇÃO DE RNA E TRANSCRIÇÃO REVERSA

A extração do RNA total foi realizada a partir do protocolo de Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Para a reação de transcrição reversa (RT), foi utilizado o Kit SuperScript III (Life Tecnologies, Carlsband, USA), cujo protocolo iniciou-se pela adição em tubo estéril de 9µl da solução de RNA total tratado com DNAse, (Life Tecnologies, Carlsband, USA) 1µl de oligonucleotídeos iniciadores Oligo (dt) (500 µg/ml), 1µl de dNTP Mix (10nM) e 3 µl de água DEPC. Essa solução foi incubada a 65° C por 5 minutos e, em seguida, sofreu uma segunda incubação em gelo por 1,5 minutos. Após essas etapas, foram adicionados à solução 4µl de tampão, 1µl de DTT (0,1M) e 1µl de "RNAse OUT Inhibitor"(40Unidades/ µl), na seqüência, foi acrescido de 1µl (200U) de SuperScript III (transcriptase reversa) e iniciou-se a incubação, primeiramente a 50° C por 50 minutos, depois a 70° por 15 minutos e, finalmente, a 4 ° C por 2 minutos. O cDNA foi armazenado a -20°C até o momento da amplificação dos genes-alvo pela técnica de PCR em tempo real.

10.3 PCR EM TEMPO REAL

O qPCR foi realizado para os genes HSD3B (ao longo do cultivo) de folículos pequenos, e para o VEGF em ambos os cultivos. Foi realizadodo o metódo taqman (TaqMan Universal PCR Master Mix, Life Tecnologies, Carlsband, USA) e o gene *tubulina, alfa* foi utilizado com gene de referência. A reação foi preparada pela adição de 6,25 µl de tampão Universal PCR Máster, 0,5 µl de primers sense, antissense (concentração final de 900mM) e sonda (concentração final de 250mM), 2,5µl de cDNA e 3,25µl e água ultrapura autoclavada. As especificações dos primers e probes utilizados estão descritos no quadro 4.

<u>Genes</u>	<u>Primers</u>	Número da seqüencia no GeneBank
VEGF	S GCCCACTGAGGAGTTCAACAT A CTGGCTTTGGTGAGGTTTGATC P FAM-CACCATGCAGATTATGMGBNFQ	NM_174216
Tubulina	S TGTTCGCTCAGGTCCTTTTGG A CCCTTGGCCCAGTTGTTG P CCCGGACTGACCAAAA	BT_0323101
HSD3B	S GCTAGACAAAGTCTTCAGACCAGAA A CAGCAGGGTCAGCTTGATCTT P FAM CTGGAGCTTAGAAAATT	NM_001034696

Quadro 4 - Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no qPCR em tempo real. S= sense, A = antissense e P= probe (sonda).

10.4 WESTERN BLOTTING

Para a extração de proteínas totais foi utilizado um tampão de lise celular (Tris-HCL 50mM, NaCL 30mM, NP-40 0,05%, inibidor de protease), e a expressão proteica foi avaliada pelo método de western blotting. Resumidamente, A mesma quantidade de amostras (25ug) de proteínas totais foram desnaturadas pelo tratamento com tampão Laemmli (15 % glicerina, 0.05M Tris, 0.05 % azul de bromofenol, 9% SDS) contendo 6 % ß-mercaptoetanol (1:1) e aquecidas a 95°C por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram separadas eletroforeticamente em gel de SDS-poliacrilamida e as proteínas foram transferidas para uma membrana de polivinilideno difluoreto (PVDF; Bio-Rad Laboratories, Inc, Califórnia, USA), sob corrente constante de 120 mA, durante 2 horas, a 4°C, em tampão Tris-HCL (Tris-HCL 12,5 mM glicina 95 mM, 1% sds e 20% de metanol). Após a transferência, ocorreu o bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos, que foi realizado por meio de uma mistura contendo TBS com o detergente tween 20 (TBS-T; 1% tween 20) e leite desnatado (5%) por 2 horas em temperatura ambiente (20-25°C) com agitação constante. As membranas foram incubadas por 12 horas com um anticorpo primário VEGF (coelho, policional, SC-152, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) na diluição de 1: 200. Como anticorpo secundário foi utilizado um anticorpo conjugado à peroxidase (IgG anticoelho, ECL, Amersham Biosciences, NJ; USA) na diluição de 1:5000. Como controle endógeno foi utilizado a actina, beta (actina, beta HRPconjugado anti-camundongo; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz,

CA), diluído 1:50,000 em solução de bloqueio, por 30 minutos. O sinal foi detectado pela adição de um substrato para peroxidase (ECL, Amersham Biosciences, Buckinghahmshire, UK) e as membranas foram expostas a um filme fotográfico (Filme RX_A IBF Filmes do Brasil, São Paulo, Brasil). As bandas referentes a cada proteína estudada foram quantificadas por densitometria no programa ImageJ (ImageJ, NIH, Bethesda USA) e a expressão proteica foi dada em UA em relação a actina,beta.

10.4 IMUNOCITOQUÍMICA

Algumas lâminas do grupo controle e tratado com FSH 10ng/ml do cultivo de células da granulosa de folículos pequenos foram confeccionadas para realização de imunocitoquímica, para as proteínas VEGF (coelho policlonal, SC-152, Santa Cruz) e KDR coelho policlonal, SC-315, Santa Cruz). As células foram cultivadas em placas de 24 poços com lamínulas e fixadas com metanol. Foi empregado o método da peroxidase indireta por meio de kit comercial (Kit LSAB+System-HRP; K0679; Dako Laboratories, USA). Para reduzir as ligações inespecíficas, os cortes foram incubados por 30 minutos em solução de bloqueio Protein block serum-free (DAKO, X0909, Califórnia-USA). Em seguida os cortes foram incubados com os anticorpos primários diluídos em PBS, overnight a 4°C nas seguintes diluições: VEGF (1:100) KDR (1:100). O próximo passo foi a incubação com Dako LSAB System-HRP and DAB chromogen System (Dako, Carpinteria, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida os cortes foram contra corados com Hematoxilina de Harris por 15 segundos e as lâminas fechadas com Permount.

10.5 ANÁLISES ESTATÍSTICA

Primeiro foi realizado o teste de normalidade (Anderson-Darling test) e os dados quando não apresentaram distribuição normal, foram transformados em logaritmo. Os efeitos do FSH (0 ou 10 ou 100 ng/mL) e do LH do tratamento *in vitro* (0 ou 250 ou 400) bem como

as diferenças em relação aos dias de cultivo foram testados por ANOVA de uma via seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey. Os resultados foram apresentados por média \pm desvio padrão. Resultados estatísticos significativos foram considerados quando p \leq 0,05. Todos os cálculos foram analisadas através do programa estatístico GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego)

10 RESULTADOS

10 RESULTADOS

A fim de estabelecer um cultivo de células da granulosa onde estas se mantivessem com o mínimo de características de luteinização para serem tratadas com FSH seguido por LH, mimetizando os protocolos de estimulação e superovulação *in vivo*, foram utilizados dois métodos de cultivo, um com células da granulosa coletadas a partir de folículos pequenos e outro a partir de folículos grandes.

10.1 CULTIVOS CÉLULAS DA GRANULOSA DE FOLÍCULOS PEQUENOS

Neste modelo de cultivo foram avaliados a produção hormonal (17β-estradiol e progesterona) pelas células ao longo do cultivo, a expressão da enzima HSD3B, bem como as características morfológicas como parâmetros para determinação da luteinização das células.

Ao analisarmos a morfologia das células ao longo do cultivo, observou-se que nos primeiros 4 dias de cultivo, as células da granulosa apresentaram aspecto arredondado, organização em colônias e emissão de prolongamentos para comunicações entre si. Após a adição do LH (dia 4 após o início do cultivo), nenhum indício de luteinização foi observado. No entanto, a partir do dia 6 (após a adição de SFB a 1%), as células começaram a apresentar características de luteinização, como aspecto fibroblástico e gotículas de lipídios intracitoplasmáticos, características estas intensificadas no dia 8 do cultivo (Figura 23). Vale ressaltar que nenhuma diferença nas características morfológicas foi influenciada pelos tratamentos com FSH.

A produção de 17 β -estradiol pelas células da granulosa manteve-se constante ao longo do cultivo em todos os grupos, porém, no dia 4 do cultivo, uma diminuição na concentração deste hormônio foi observada no grupo tratado com FSH 100 ng/ml (p < 0,05; Figura 24A). A adição de LH ao meio não alterou a produção de 17 β -estradiol em nenhum grupo (Figura 24B). A produção de P4 pelas células diminuiu no dia 4 em relação ao dia 1 (p < 0,05). Em seguida, ocorreu um aumento acentuado no dia 8 quando comparado aos outros dias. Além disso, no dia 4 o grupo tratado com FSH na concentração de 10ng/ml produziu mais progesterona que o grupo controle e FSH 100ng/ml. (p < 0,05; Figura 24C). A adição de LH ao meio de cultivo não alterou a produção de P4 em nenhum grupo (Figura 24D) e em nenhum momento estudado.

Em relação à expressão da HSD3B, observou-se que esta foi aumentada no dia 8 em

relação ao dia 4 do cultivo (p < 0.05; Figura 25). Ressalta-se que a expressão desta enzima só foi avaliada no grupo controle como mais um parâmetro para validação do cultivo; desse modo, não houve comparação entre os grupos.

Figura 23 - Morfologia das células da granulosa (CG) em cultivo. A - CG - controle (dia 2 após o início do cultivo). B - CG – controle (dia 3 após o início do cultivo). Notar aspecto arredondado das células e colônias (setas vazias) e projeções citoplasmáticas (seta preta). C- CG - Controle (dia 7 após o início do cultivo). D- CG –controle (dia 8 após o início do cultivo). Notar aspecto fibroblástico acentuado das células (seta amarela). Barra = 20 μm.



Figura 24 - Concentração de progesterona (ng/ml) em meio de cultivo de células da granulosa nos dias D1, 4, 5 e 8 após o início do cultivo, nos grupos controle, FSH 10ng/ml e FSH 10ng/ml. Letras diferentes indicam diferença significativa em um mesmo dia e * de um grupo em relação aos demais (p < 0,05).



Figura 25 - Expressão do mRNA da HSD3B nas células da granulosa em cultivo nos dias D 0, 4, 6 e 8 após o início do cultivo. Letras diferentes correspondem à diferença significativa entre os dias de cultivo (p = 0.01).



10.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DO VEGF

A expressão do mRNA do VEGF foi detectada tanto no dia 5 (24 horas após adição do LH) como também no dia 8 do cultivo no grupo controle e nos tratados com FSH.

No dia 5 do cultivo, observou-se que a expressão gênica do VEGF foi maior nas células tratadas com 100 ng/ml de FSH em relação àquelas que receberam 10 ng/ml e ao grupo controle (F0). Observou-se também efeito do LH, o qual inibiu a expressão do VEGF na concentração de 400 ng/ml. Nas células tratadas com 10 ng/ml de FSH (F10), o VEGF foi mais expresso naquelas em que foi adicionado o LH, independente da dose. Por outro lado, no grupo tratado com 100 ng/ml de FSH houve diminuição da expressão do VEGF quando adicionado LH na concentração de 400 ng/ml, em relação ao respectivo controle (Figura 26).

Figura 26 - Expressão gênica relativa do VEGF nas células da granulosa de folículos pequenos, no dia 5 do cultivo (24 h após a adição de LH). F0: livre de FSH; F10: FSH 10ng/ml e F100: FSH 100ng/ml. Asteriscos indicam diferença significativa entre as diferentes concentrações de FSH. Letras diferentes indicam diferença significativa em determinada concentrações de FSH após a adição de LH nas concentrações de 250 e 400 ng/ml (p < 0,05).</p>



A expressão proteica do VEGF foi analisada pela técnica de western blotting. O anticorpo utilizado reconhece as isoformas 121 e 165, por isso, as mesmas foram analisadas separadamente. No dia 8 do cultivo, não foram observados efeitos dos tratamentos na expressão gênica (Figura 27) e/ou proteica do VEGF nos grupos estudados (Figura 28).

Figura 27 - Expressão gênica relativa do VEGF nas células da granulosa de folículos pequenos, no dia 8 do cultivo (24 h após a adição de LH). F0: livre de FSH; F10: FSH 10ng/ml e F100: FSH 100ng/ml.



Figura 28- Expressão proteica relativa das isoformas 165 e 121 do VEGF nas células da granulosa de folículos pequenos, no dia 8 do cultivo, nos grupos controle e tratados com FSH e LH. Blots ilustrativos e gráficos representando o conteúdo das proteínas expressos em UA/50 μg em relação à actina, beta (ACTB). Os dados são representados por média ± desvio padrão. F0: sem FSH; F10: FSH 10ng/ml; F100: 100ng/ml.



Quanto à imunolocalização, tanto o VEGF quanto o KDR foram detectados no citoplasma das células da granulosa luteínizadas em cultivo (Figura 29). A marcação (coloração marrom) proporcionada pela reação de imunocitoquímica foi mais intensa nas células em que foi adicionado FSH (10ng/ml) do que no grupo controle, indicando qualitativamente uma aumentada expressão proteicado VEGF e seu receptor KDR nas células tratadas com FSH quando comparada às não tratadas.

Figure 29- Reação de imunocitoquímica para detecção de VEGF e KDR em células da granulosa luteinizadas em cultivo. A - VEGF grupo controle; B – VEGF grupo FSH; C - KDR grupo controle; D - KDR grupo FSH. D' - controle negativo. Observar a marcação citoplasmática mais intensa nas células tratadas com FSH (B e D; seta preta).



10.3 CULTIVO DE CÉLULAS DA GRANULOSA DE FOLÍCULOS GRANDES

No cultivo de células da granulosa de folículos grandes, analisou-se somente a produção hormonal para avaliação da luteinização das células.

A produção de 17β -estradiol diminuiu drasticamente do dia 2 para o dia 3 (24 horas após adição de LH 250ng/ml) do cultivo, chegando à zero no dia 5. Além disso, observou-se que no dia 2, o grupo tratado com FSH produziu menos 17β -estradiol que o grupo que não recebeu o hormônio (Figura 30 A).

Por outro lado, a produção de progesterona aumentou nos dias 3 e 5 de cultivo quando comparada ao dia 2. Também foi observado que no dia 2, as células tratadas com FSH produziram mais progesterona que o grupo controle (p < 0.05; Figura 30B).

Figure 30- Concentração de 17β-estradiol (pg/ml) e progesterona (ng/ml) em meio de cultivo de células da granulosa de folículos grandes nos dias 2, 4 e 5 após o início do cultivo, nos grupos controle e FSH 10ng/ml. Asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos em um mesmo dia de cultivo. Letras diferentes indicam diferença significativa de um grupo ao longo dos dias de cultivo (p < 0,05).</p>



10.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEÍCA DO VEGF

A expressão gênica do VEGF foi maior nas células tratadas com FSH quando comparada ao grupo controle (p < 0.05; Figura 31A). Desta forma, verificou-se, pela adição de um bloqueador de transcrição (actomicida D), se o aumento da expressão do VEGF ocorreu devido ao aumento da estabilidade do RNA. Porém, observou-se que não houve efeito do tratamento na estabilidade do RNA do VEGF, uma vez que após 4 horas de inibição da transcrição a expressão do VEGF em ambos os grupos diminuiu (Figura 31B).

Observou-se um aumento da expressão proteica da isoforma 121 do VEGF nos animais tratados com FSH (Figura 32).

Como o tratamento com FSH aumentou a expressão do VEGF121, analisou-se se este aumento estava relacionado à estabilidade da proteína. Foi possível observar que não ocorreu aumento da estabilidade da proteína em nenhum grupo, conforme podemos observar na figura 33. Após adição de bloqueador de síntese de proteína por 30min. e 1 hora a expressão proteica diminui em ambos os grupos (p< 0,0.5), sem diferença entre eles. Por outro lado, para o VEGF 165, após a adição de bloqueador, a diminuição na expressão proteica foi somente para o grupo tratado (p<0,0.5; Figura 33).

Figura 31 - A- Expressão gênica relativa do VEGF no dia 5 do cultivo, nos grupos controle e FSH 10ng/ml. * indica diferença significativa (p < 0,05). B- expressão relativa do VEGF no dia 5 do cultivo, tratado com o bloqueador de transcrição actomicina D por 0, 1, 2, 3, e 4 horas.



Figura 32- Expressão proteica relativa do VEGF, isoformas 121 e 165, no dia 8 do cultivo, no grupo controle e FSH. Blots ilustrativos e gráficos representando o conteúdo das proteínas expressos em UA/50 μg em relação à actina, beta. As barras representam a média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05).</p>



Figura 33 - Expressão proteica das isoformas 121 e 165 doVEGF no grupo controle e FSH, com a adição de bloqueador de síntese de proteína por (cicloheximida) por 0, 30 min e 1 h. Os valores estão representados por média e erro padrão da média. Diferentes letras significam diferença significativa para p < 0.05.



11 DISCUSSÃO

11 DISCUSSÃO

Os experimentos *in vitro* foram delineados com o objetivo de avaliar a influência do FSH na regulação do VEGF em células da granulosa luteinizadas in cultivo. Nestes experimentos, o FSH foi utilizado ao invés da eCG, uma vez que nos experimentos ex vivo de superovulação e estimulação do folículo dominante com o uso do eCG não foi observada influência na expressão gênica e proteica do VEGF e seus receptores, conforme descrito no capitulo 1 deste manuscrito. Por outro lado, observou-se que em corpos lúteos de búfalas gerados posteriormente às múltiplas ovulações induzidas pelo tratamento superovulatório, utilizando-se doses repetidas de FSH, a expressão proteica do VEGF e de seus receptores encontrava-se aumentada, enquanto a expressão gênica estava diminuída (PAPA et al., 2007; FATIMA, L. A., 2008). Existem vários relatos que sugerem que o LH e o hCG modulam a expressão do VEGF e que ambos, FSH e LH/hCG, via ativação de seus receptores, são capazes de induzir a expressão do mRNA do VEGF em células da granulosa (CHRISTENSON et al. 1997; (LEE et al., 1997; MAYBIN; DUNCAN, 2004; PIETROWSKI; KECK, 2004). Para completar, a via de sinalização desencadeada pelo eCG e pelo FSH dentro da célula da granulosa pode ser diferente uma vez que o eCG liga-se tanto em receptores de LH quanto de FSH (MURPHY; MARTINUK, 1991).

Ao longo do estabelecimento do cultivo, analisou-se a expressão da enzima HSD3B, bem como os aspectos morfológicos das células e a produção de progesterona e 17β-estradiol para validação do mesmo. Um aspecto importante para que o cultivo mimetizasse os tratamentos de superovulação e estimulação do folículo dominante seria que as células da granulosa apresentassem características mínimas de luteinização durante o período de tratamento com FSH para, em seguida, serem luteinizadas pela adição do LH. Em ambos os modelos de cultivo (células da granulosa de folículos pequenos e grandes), observaram-se mudanças na relação da produção hormonal (17β-estradiol/progesterona), sendo mais proeminente no cultivo de células provenientes de folículos grandes, pois no dia 8, estas células não estavam produzindo mais estradiol. Esses achados corroboram com o que foi descrito por Pescador et al, (1999) (PESCADOR; STOCCO; MURPHY, 1999) os quais observaram aumento da produção de progesterona e da expressão das proteínas esteroidogênicas STAR e P450scc após luteinização de células da granulosa em cultivo. As mudanças que ocorrem nas células em processo de luteinização, depois do pico de LH, podem ser tanto quantitativas como qualitativas. A expressão gênica é alterada para promover a produção de P4, sendo que essa mudança também é quantitativa uma vez que a quantidade de P4 produzida pelas células luteínicas é muito maior que a quantidade de estrógenos produzida pelas células do folículo (VOSS; FORTUNE, 1993). As características morfológicas observadas ao longo do cultivo também reforçaram a validação do mesmo, no qual foi possível verificar a formação de agregados celulares com estabelecimento de contato entre eles. De acordo com Gutierrez et al (1997) (GUTIERREZ; CAMPBELL; WEBB, 1997), estas formações são importantes, uma vez que aumentam a quantidade de junções tipo gap, facilitando a passagem de íons, hormônios e neurotransmissores entre as células; estando, portanto, relacionadas a manutenção de características de células não luteinizadas. Ao final do cultivo, as células estavam dispostas em uma monocamada, apresentavam aspecto fibroblástico (MEIDAN et al., 1990; ABIR et al., 2001)e gotículas de lipídios intracitoplasmáticas, os quais são importantes indicadores de luteinização (NISWENDER, 2002; STOCCO, C.; TELLERIA; GIBORI, 2007; MONTAÑO; OLIVERA; RUIZ-CORTÉS, 2009)

É interessante ressaltar que o tratamento com LH não influenciou a produção hormonal das células granulosas dos folículos pequenos, sugerindo que estas células não estão responsivas ao LH neste período. Em bovinos, existe controvérsia sobre a presença e atividade do LHR nas células da granulosa de folículos pequenos. Segundo Lowsky e Farookhi (LOWSKY; FAROOKHI, 1989) as células da granulosa expressam LHR somente no momento ou após o folículo tornar-se dominante, contudo, células da granulosa de folículos pequenos podem expressar diferentes isoformas do LHR. Já de acordo com Driancourt (2001) e NOGUEIRA et al (2007) (DRIANCOURT, 2001; NOGUEIRA et al., 2007) células da granulosa não contêm LHR funcional até atingirem 6 mm de diâmetro ou até que os folículos se tornem dominantes. Além disso, MONTANÕ et (MONTAÑO; OLIVERA; RUIZ-CORTÉS, 2009) reportaram que em células da granulosa de folículos de 2 - 6 mm foi possível detectar os LHR após 12 horas de cultivo e, quando a luteinização ocorreu in vitro, a expressão do LHR aumentou em 48 horas e seus níveis permaneceram ativados até 96 horas. Desta forma em nosso estudo é provável que os receptores de LH encontrem-se ausentes ou inativos nas células da granulosa dos folículos pequenos. Quanto ao cultivo de células da granulosa de folículos grandes, observou-se o aumento na produção de P4 após a adição de LH, indicando resposta celular frente a esse hormônio, uma vez que, de acordo com DRIANCOURT (2001) e NOGUEIRA et al (2007) (DRIANCOURT, 2001; NOGUEIRA et al., 2007), estas células possuem receptores de LH ativos.

Em relação à expressão gênica e proteica do VEGF, observou-se que o FSH não influenciou a expressão do mesmo nas células da granulosa de folículos pequenos no dia 8 do cultivo. No entanto, ao analisarmos a expressão gênica do VEGF no dia 5 do cultivo, observou-se um aumento da expressão gênica deste fator no grupo tratado com 100ng/ml de FSH. Sabe-se que o FSH liga-se á receptores específicos nas células da granulosa levando a estimulação da proliferação e diferenciação celular (XU et al., 1995), bem como induzindo a produção de fatores de crescimento no folículo (KUMAR et al., 1999). A importância do VEGF na indução do crescimento folicular, já foi demonstrada, bem como sua interação com o FSH para promover este crescimento (DOYLE et al., 2010; (MATTIOLI et al., 2001). Desta forma, este aumento de VEGF observado no dia 5 do cultivo, dia este onde as células não estavam luteinizadas, corrobora com a ideia de que o FSH induz a expressão do VEGF nas células da granulosa de folículos pequenos, o que pode favorecer tanto a proliferação celular como a formação vascular no folículo (FRASER; LUNN, 2001).

Vale ressaltar que este modelo de cultivo visava mimetizar o protocolo de superovulação com o uso de FSH que é empregado em búfalas (CARVALHO et al., 2002) e em vacas (BARUSELLI et al., 2007). Diante disto, foi possível observar que os tratamentos in vitro não refletiram as resultados encontrados in vivo no CL de búfalas superovuladas, onde foi observado uma diminuição do mRNA seguido de um aumento na expressão proteica do VEGF (PAPA et al., 2007). Este mesmo resultado, referente a influência do FHS na expressão do VEGF não foi observado nem dia 8 do cultivo o qual corresponde as células da granulosa já luteinizadas nem mesmo no dia 5 onde as células não apresentavam características de luteinização. Porem, já está relatado que experimentos *in vitro* nem sempre são apropriado para reproduzir alterações in vivo/ex vivo (BROUSSARD et al., 1995). Os resultados referentes ao CL de búfalas superovuladas também podem ser interpretados como sendo espécie específicos, sendo esta regulação de diminuição de mRNA e aumento de proteína do VEGF, própria da espécie bubalina. Entretanto, mais estudos são necessários para responder a esta questão. Além disso, alguns estudos que avaliam a relação global entre a expressão de proteína e de mRNA demonstraram uma baixa correlação existente entre ambos (QIN; TIAN, 2010). Biologicamente, a discrepância entre a expressão de mRNA e proteína, como o encontrado para o VEGF em CL de búfalas superovuladas pode ser devido a modificações pós-transcricionais e/ou pós-traducionais ou ainda a diferenças entre a taxa de transcrição e tradução para o gene (COX; KISLINGER; EMILI, 2005). É importante ressaltar que a função biológica é dada pelas proteínas, e a diminuição do mRNA encontrado no CL das búfalas superovuladas não impediu a aumento da vascularização e da produção de progesterona encontrado neste modelo (PAPA et al., 2007).

No cultivo das células da granulosa de folículos grandes, um aumento na expressão gênica do VEGF foi observado no grupo tratado com FSH. Também foi observado que o FSH exerceu efeito diferente na expressão proteica das isoformas 165 e 121 do VEGF, uma vez que este hormônio somente aumentou a expressão proteicado VEGF121. As principais isoformas expressas no CL de bovinos são as 121 e 165 e elas estão intimamente associadas com a angiogênese para adequada formação do CL (BERISHA et al., 2000). A isoforma 121 não contém os exons 6 e 7 e, consequentemente, é uma proteína ácida fraca que não se liga a heparina. Em contraste, o VEGF165 possui o exon 7, resultando em uma molécula mais básica com afinidade moderada por heparina (FERRARA, 2004). Acredita-se que o VEGF121 seja constantemente liberado e difundido, enquanto que, 75% do VEGF165 permanecem associados à superfície da célula ou nas proximidades (ROBINSON; STRINGER, 2001). Existem alguns trabalhos que demonstram que o VEGF121 é a isoforma primária expressa em células e tecidos (RENNER; PILGER, 1999). No entanto, há evidências de que o VEGF165 é mais expresso que o VEGF121, o qual representa aproximadamente um terço da expressão de VEGF no CL bovino (BERISHA et al., 2000). No entanto, mais estudos são necessários para avaliar as ações das isoformas do VEGF no tecido luteínico. Corroborando com nossos achados, Shimizu et al (2007) (SHIMIZU et al., 2007) demonstraram uma resposta ao FSH diferente em relação as isoformas do VEGF, observando um aumento na expressão gênica do VEGF121 após o tratamento das células da granulosa bovina com 10 ng/ml de FSH. No entanto, o aumento do mRNA do VEGF165 foi observado quando as células foram tratadas com somente 1 ng/ml de FSH. O mesmo grupo também demonstrou que a adição de progesterona em células da granulosa bovina em cultivo aumentou a expressão gênica do VEGF121 e diminuiu a do VEGF165 (SHIMIZU; MIYAMOTO, 2007). Deste modo, os resultados do presente estudo sugerem que o FSH aumenta a expressão do VEGF e que a expressão das isoformas do VEGF podem ser reguladas independentemente. Esta regulação independente das isoformas pode ajudar a explicar o fenômeno observado no CL de búfalas superovuladas. Segundo BORNE et al. (BORNES et al., 2004) a regulação da tradução do VEGF é bastante complexa. O VEGF possui dois códons de início da tradução um AUG e um CUG, e estes códons estão presentes

de acordo com os exons contidos nas isoformas, por exemplo, o VEGF 165 possui ambos os códons, e a isoforma 121 possui somente o códon AUG e, desta forma o início da tradução sofre regulação correlacionada com a isoforma.

Foi relatado que a produção de VEGF aumenta durante o desenvolvimento do folículo antral, quando o FSH tem uma ação predominante (BARBONI et al., 2000). Além disso, em um estudo em células granulosas de rato, o FSH estimulou a expressão do VEGF e do PGDF e estes fatores foram cruciais na promoção da angiogênese durante o desenvolvimento do folículo antral (KUO et al., 2011). Em macacos, foi demonstrado que o FSH tem uma função importante na formação dos vasos sanguíneos no CL. Quando o FSH recombinante foi administrado in vivo ou adicionado a cultivos em doses elevadas, estimulou a produção de VEGF em células da granulosa derivadas de folículos grandes (CHRISTENSON; STOUFFER, 1997). Uma relação interessante entre o VEGF e as ações das gonadotrofinas no ovário de ratas foi demonstrada por Zimmermann et al (2003) (ZIMMERMANN et al., 2003) onde a administração de gonadotrofina exógena em animais hipofizectomizados não teve efeito no crescimento folicular quando a ação do VEGF foi inibida usando um bloqueador de KDR. Como já se sabe, o VEGF age através de dois receptores, o FLT1 e o KDR, porém, acredita-se que a maior transdução de sinal seja realizada pelo KDR, o qual é expresso principalmente em células endoteliais e medeia os efeitos de proliferação e migração do VEGF (BOONYAPRAKOB et al., 2003). Todas as isoformas do VEGF têm grande afinidade por ambos os receptores, os quais são regulados no ovário e no CL bovino (BERISHA et al., 2000). No presente estudo, foi observado um aumento na intensidade do sinal do KDR nas células tratadas com FSH, indicando que este receptor é regulado por gonadotrofinas. Um aumento na expressão proteicadeste fator também foi observado no CL de búfalas coletados após tratamento superovulatório com FSH (PAPA et al., 2007). Apesar de não termos avaliado a expressão do FLT1 nos experimentos in vitro, este receptor também estava aumento nos CL de búfalas superovuladas, indicando que ambos os receptores podem ser regulados pelo FSH, os quais medeiam os efeitos do VEGF na proliferação celular e vascularização após tratamentos com FSH, viabilizando a indução do crescimento folicular.

As células luteínicas de animais superovulados com FSH demonstram características morfológicas que refletem uma maior atividade de síntese proteica(ARTONI et al., 2004), como por exemplo, aumento da quantidade de retículo endoplasmático rugoso (RER) e mitocôndrias, diferença na condensação de cromatina e mudança no formato do núcleo (MEYER, 1991). O remodelamento da cromatina e características dos núcleos estão

131

envolvidos na síntese de mRNA, onde ocorre uma relação entre diminuição da condensação da cromatina e o aumento da síntese de mRNA (SHUMAKER; KUCZMARSKI; GOLDMAN, 2003; DECHAT et al., 2008; LODISH et al., 2008). Porém, a estabilidade dos mRNAs também é um importante mecanismo passível de regulação. O tempo em que estão disponíveis para tradução antes de serem degradados, além do controle de sua estabilidade constituem a uma importante via de regulação da tradução (GUHANIYOGI; BREWER, 2001). Sabe-se que as gonadotrofinas influenciam a estabilidade de alguns mRNAs. O hCG aumenta a transcrição do gene da betaglicana via aumento na estabilidade do mRNA. O LH e o FSH aumentam a estabilidade do mRNA do EGF (fator de crescimento epidermal; (CHOI et al., 2005) e do gene CYP19 (SAHMI; NICOLA; PRICE, 2006). Em contraste, o hCG diminui a expressão do gene dos receptores do GnRH via diminuição da estabilidade do mRNA (LI, X.; LEI; RAO, 1996). O LH diminui a transcrição de genes como o LHR e o ERS2 em células da granulosa, predominantemente pela diminuição da estabilidade e conseqüente aumento da degradação do mRNA (GUO et al., 2001). Moura et al (2003) e Papa et al. (2007) observaram correlação entre a densidade vascular e a expressão proteicado sistema VEGF no CL de bufálas após tratamento superovulatório com FSH. Porém, a expressão gênica deste fator estava diminuída. Estes resultados indicam que o tratamento superovulatório com FSH podem alterar a estabilidade de mRNA e proteínas, bem como ser capaz de aumentar a habilidade de síntese proteicadestas células.

O passo seguinte, foram as análises referentes à estabilidade do mRNA e da proteína do VEGF após tratamento com FSH. Experimentos que visam analisar a estabilidade de mRNA e proteína do VEGF após tratamentos com hormônio são comuns. Ruohola et al. (RUOHOLA et al., 1999) utilizaram bloqueadores de síntese de RNA para verificarem se a indução da expressão da VEGF por estrógenos foi dependente da síntese de mRNA ou aumento de sua meia vida. Em nosso trabalho, nos experimentos referentes à estabilidade de mRNA e de proteína, foram utilizados bloqueadores de transcrição (Actomicina D) e de tradução (ciloheximide D) em concentrações já utilizadas anteriormente para avaliação da estabilidade do VEGF (STEINBRECH et al., 2000). Quando a transcrição foi bloqueada a meia via do mRNA do VEGF foi comparada entre os grupos tratado com FSH e controle. Uma vez que o declínio da expressão de ambos os mRNAs não foram diferentes significativamente, e no final de 4 horas a concentração de mRNA do VEGF de ambos os grupos se apresentava igual, foi possível concluir que a estabilidade do mRNA do VEGF não foi alterada pelo tratamento com o FSH. Do mesmo modo, para análises da estabilidade da proteína, após adição do bloqueador de síntese por 30 minutos e 1 hora ocorreu um declínio na expressão do VEGF 121 em ambos os grupos. Estes dados demonstraram que não ocorreu aumento na estabilidade da proteína do VEGF, e o aumento na expressão proteica neste caso foi dependente da síntese de proteína, uma vez que quando a síntese foi bloqueada a expressão caiu em ambos os grupos. Estes dados indicam que o aumento na expressão gênica e proteica do VEGF no modelo in vitro aqui apresentado pode ter ocorrido devido ao aumento da transcrição do gene seguido de aumento de tradução. Enquanto que no modelo ex vivo de búfalas superovuladas, no qual foi observado aumento de expressão proteica sem, no entanto aumento de mRNA, pode estar relacionado exclusivamente com a aumento da síntese de proteínas, uma vez a taxa de tradução é passível de regulação independente da transcrição (BORNES et al., 2004). O VEGF é considerado um alvo do FSH (SASSON et al., 2003) e de acordo com Raisinger et al (RAISINGER et al., 2007) as gonadotrofinas tem propriedades angiogênicas. Em um experimento realizado por Alma et al (2004) foi observado que a atividade transcricional do HIF1 é necessária para a indução do VEGF ocorrida após tratamentos com FSH. O VEGF tem dois elementos responsivos a hipóxia (HRE) bem caracterizados em sua região promotora, assim, é possível que o aumento da expressão do VEGF pelo FSH ocorra através da interação do HIF1 diretamente com estes elementos, via aumento da transcrição do gene (FORSYTHE et al., 1996).

Resumidamente, nossos achados demonstraram que o FSH aumentou a expressão gênica do VEGF, bem como a expressão proteica, nas células da granulosa de folículos grandes. Esta relação do FSH com o VEGF pode ser um importante mecanismo que possibilita o crescimento folicular, em um processo fisiológico ou quando esta gonadotrofina é empregada em tratamentos para a indução do crescimento folicular e/ou produção de um CL mais ativo.

12 CONCLUSÃO

12 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos conclui-se que:

- O tratamento de estimulação com o uso da eCG aumentou o volume do CL bem como a produção de P4 plasmática, enquanto que o tratamento superovulatório aumentou o volume e número de CLL produzidos.
- A expressão do sistema VEGF não foi alterada pelos tratamentos com eCG, e entre os genes relacionados diretamente com a angiogênese somente o FGFR2 teve sua expressão aumentada nos animais tratados.
- A resposta referente à expressão gênica no CL foi diferente dependendo do tipo de tratamento empregado com o uso da eCG. No entanto, muitos dos genes aqui estudados (STAR, Folistatina, HMGCR, PPARG, FABP, TGFB2) tiveram sua expressão influenciada por ambos os tratamentos.
- Nos animais estimulados o aumento do volume do CL juntamente com o aumento da expressão da STAR, da folistatina e dos receptores da prolactina, como também a regulação dos genes relacionados com a síntese de lipídios podem ser importantes mediadores do aumento da esteroidogênese.
- Nos animais superovulados, a interação entre os genes Folistatina, HMGCR, PPARG, FABP, TGFB2 favoreceu a proliferação celular levando a um aumento no volume do CL.
- O FSH aumentou a expressão gênica e proteica do VEGF nas células da granulosa luteinizadas em cultivo. Além disso, este hormônio pode influenciar a expressão proteica das isoformas 121 e 165 do VEGF independentemente.
- O aumento na expressão do VEGF induzida pelo FSH parece estar relacionado a regulações transcricionais e traducionais, uma vez que não foi observado influencia do

tratamento com este hormônio nas estabilidades do mRNA e da proteína.

 O eCG e o FSH parecem possuírem ações diferentes na regulação da expressão do sistema VEGF, uma vez que o FSH aumentou a expressão do VEGF em células da granulosa, e nenhuma alteração foi observada na expressão deste gene no CL de animais tratados com eCG.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABIR, R.; FISCH, B.; NITKE, S.; OKON, E.; RAZ, A.; BEN RAFAEL, Z. Morphological study of fully and partially isolated early human follicles. **Fertil Steril**, v. 75, n. 1, p. 141-146, 2001.

ACOSTA, T. J.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Aberrant blood flow area and plasma gonadotropin concentrations during the development of dominant-sized transitional anovulatory follicles in mares. **Biol Reprod**, v. 71, n. 2, p. 637-642, 2004.

ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; GINTHER, O. J. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. **J Reprod Fertil**, v. 96, n. 2, p. 627-640, 1992.

AFLALO, L.; MEIDAN, R. The hormonal regulation of cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450, adrenodoxin, and their messenger ribonucleic acid expression in bovine small-like and large-like luteal cells: relationship with progesterone production. **Endocrinology**, v. 132, n. 1, p. 410-416, 1993.

AKIRI, G.; NAHARI, D.; FINKELSTEIN, Y.; LE, S. Y.; ELROY-STEIN, O.; LEVI, B. Z. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is mediated by internal initiation of translation and alternative initiation of transcription. **Oncogene**, v. 17, n. 2, p. 227-236, 1998.

ALILA, H. W.; HANSEL, W. Origin of different cell types in the bovine corpus luteum as characterized by specific monoclonal antibodies. **Biol Reprod**, v. 31, n. 5, p. 1015-1025, 1984.

AMBROSE, J. D.; DROST, M.; MONSON, R. L.; RUTLEDGE, J. J.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; THATCHER, M. J.; KASSA, T.; BINELLI, M.; HANSEN, P. J.; CHENOWETH, P. J.; THATCHER, W. W. Efficacy of timed embryo transfer with fresh and frozen in vitro produced embryos to increase pregnancy rates in heat-stressed dairy cattle. **J Dairy Sci**, v. 82, n. 11, p. 2369-2376, 1999.

ARTONI, L. P., C. B.; CAMPOS, D. B.; PEREIRA, F. T. V.; KFOURY JR., J. R.; MIIGLINO, M. A.; BARUSELLI, P. S.; PFARRER, C.; LEISER, R.; PAPA, P. C. Ultrastructural features from superovulated corpora lutea of water buffalo.In: Anais do 15th International CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 2004, 363 p.

ATEN, R. F.; KOLODECIK, T. R.; BEHRMAN, H. R. A cell adhesion receptor antiserum abolishes, whereas laminin and fibronectin glycoprotein components of extracellular matrix

promote, luteinization of cultured rat granulosa cells. **Endocrinology**, v. 136, n. 4, p. 1753-1758, 1995.

BAILLARGEON, J. P.; JAKUBOWICZ, D. J.; IUORNO, M. J.; JAKUBOWICZ, S.; NESTLER, J. E. Effects of metformin and rosiglitazone, alone and in combination, in nonobese women with polycystic ovary syndrome and normal indices of insulin sensitivity. **Fertil Steril**, v. 82, n. 4, p. 893-902, 2004.

BAKER, A. D.; MALUR, A.; BARNA, B. P.; KAVURU, M. S.; MALUR, A. G.; THOMASSEN, M. J. PPARgamma regulates the expression of cholesterol metabolism genes in alveolar macrophages. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 393, n. 4, p. 682-687, 2010.

BAO, B.; GARVERICK, H. A.; SMITH, G. W.; SMITH, M. F.; SALFEN, B. E.; YOUNGQUIST, R. S. Expression of messenger ribonucleic acid (mRNA) encoding 3betahydroxysteroid dehydrogenase delta4,delta5 isomerase (3beta-HSD) during recruitment and selection of bovine ovarian follicles: identification of dominant follicles by expression of 3beta-HSD mRNA within the granulosa cell layer. **Biol Reprod**, v. 56, n. 6, p. 1466-1473, 1997.

BARBONI, B.; TURRIANI, M.; GALEATI, G.; SPINACI, M.; BACCI, M. L.; FORNI, M.; MATTIOLI, M. Vascular endothelial growth factor production in growing pig antral follicles. **Biol Reprod**, v. 63, n. 3, p. 858-864, 2000.

BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M.; FILHO, M. F.; NASSER, L. F.; RODRIGUES, C. A.; BO, G. A. Bovine embryo transfer recipient synchronisation and management in tropical environments. **Reprod Fertil Dev**, v. 22, n. 1, p. 67-74, 2010.

BARUSELLI, P. S.; MARTINS, C. M.; SALES, J. N.; FERREIRA, M. Recent advances in bovine superovulation. Acta Sci Vet, v., n. 36, p. 433-488, 2008.

BARUSELLI, P. S.; DE SA FILHO, M. F.; MARTINS, C. M.; NASSER, L. F.; NOGUEIRA, M. F.; BARROS, C. M.; BO, G. A. Superovulation and embryo transfer in Bos indicus cattle. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 77-88, 2006.

BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; BO, G. A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. **Anim Reprod Sci**, v. 82-83, n., p. 479-486, 2004.

BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N.; GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; MARTINS, C. M.; RODRIGUES, C. A.; BÓ, G. A. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. **Theriogenology**, v. 76, n. 9, p. 1583-1593, 2011

BELFIORE, C. J.; HAWKINS, D. E.; WILTBANK, M. C.; NISWENDER, G. D. Regulation of cytochrome P450scc synthesis and activity in the ovine corpus luteum. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 51, n. 5-6, p. 283-290, 1994.

BERISHA, B.; SCHAMS, D. Ovarian function in ruminants. **Domest Anim Endocrinol**, v. 29, n. 2, p. 305-317, 2005.

BERISHA, B.; SCHAMS, D.; KOSMANN, M.; AMSELGRUBER, W.; EINSPANIER, R. Expression and tissue concentration of vascular endothelial growth factor, its receptors, and localization in the bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. **Biol Reprod**, v. 63, n. 4, p. 1106-1114, 2000.

BIGNON, C.; BINART, N.; ORMANDY, C.; SCHULER, L. A.; KELLY, P. A.; DJIANE, J. Long and short forms of the ovine prolactin receptor: cDNA cloning and genomic analysis reveal that the two forms arise by different alternative splicing mechanisms in ruminants and in rodents. **J Mol Endocrinol**, v. 19, n. 2, p. 109-120, 1997.

BINELLI, M.; THATCHER, W. W.; MATTOS, R.; BARUSELLI, P. S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p. 1451-1463, 2001.

BO, G. A.; GUERRERO, D. C.; TRIBULO, A.; TRIBULO, H.; TRIBULO, R.; ROGAN, D.; MAPLETOFT, R. J. New approaches to superovulation in the cow. **Reprod Fertil Dev**, v. 22, n. 1, p. 106-112, 2010.

BO, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRIBULO, R.; TRIBULO, H.; MAPLETOFT, R. J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 53-72, 2002.

BO, G. A.; HOCKLEY, D. K.; NASSER, L. F.; MAPLETOFT, R. J. Superovulatory response to a single subcutaneous injection of Folltropin-V in beef cattle. **Theriogenology**, v. 42, n. 6, p. 963-975, 1994.

BOLE-FEYSOT, C.; GOFFIN, V.; EDERY, M.; BINART, N.; KELLY, P. A. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. **Endocr Rev**, v. 19, n. 3, p. 225-268, 1998.

BOONYAPRAKOB, U.; GADSBY, J. E.; HEDGPETH, V.; ROUTH, P.; ALMOND, G. W. Expression and localization of vascular endothelial growth factor and its receptors in pig corpora lutea during the oestrous cycle. **Reproduction**, v. 126, n. 3, p. 393-405, 2003.

BORNES, S.; BOULARD, M.; HIEBLOT, C.; ZANIBELLATO, C.; IACOVONI, J. S.; PRATS, H.; TOURIOL, C. Control of the vascular endothelial growth factor internal ribosome entry site (IRES) activity and translation initiation by alternatively spliced coding sequences. **J Biol Chem**, v. 279, n. 18, p. 18717-18726, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, n., p. 248-254, 1976.

BRANNIAN, J. D.; STOUFFER, R. L. Native and modified (acetylated) low density lipoprotein-supported steroidogenesis by macaque granulosa cells collected before and after the ovulatory stimulus: correlation with fluorescent lipoprotein uptake. **Endocrinology**, v. 132, n. 2, p. 591-597, 1993.

BROUSSARD, J. R.; THIBODEAUX, J. K.; MYERS, M. W.; ROUSSEL, J. D.; HANSEL, W.; GODKE, R. A. Effect of media substitutes on bovine granulosa cell function and proliferation during in vitro culture. **J Anim Sci**, v. 73, n. 11, p. 3287-3293, 1995.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, v. 232, n. 4746, p. 34-47, 1986.

BRUCE, N. W.; MOOR, R. M. Capillary blood flow to ovarian follicles, stroma and corpora lutea of anaesthetized sheep. **J Reprod Fertil**, v. 46, n. 2, p. 299-304, 1976.

CARVALHO, N. A.; BARUSELLI, P. S.; ZICARELLI, L.; MADUREIRA, E. H.; VISINTIN, J. A.; D'OCCHIO, M. J. Control of ovulation with a GnRH agonist after superstimulation of follicular growth in buffalo: fertilization and embryo recovery. **Theriogenology**, v. 58, n. 9, p. 1641-1650, 2002.

CASTILHO, A. C.; GIOMETTI, I. C.; BERISHA, B.; SCHAMS, D.; PRICE, C. A.; AMORIM, R. L.; PAPA, P. C.; BURATINI, J., JR. Expression of fibroblast growth factor 10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2B, in the bovine corpus luteum. **Mol Reprod Dev**, v. 75, n. 5, p. 940-945, 2008.

CAVALIERI, J.; KINDER, J. E.; DE'ATH, G.; FITZPATRICK, L. A. Effect of 48 h treatment with 17 beta-oestradiol or progesterone on follicular wave emergence and synchrony of ovulation in Bos indicus cows when administered at the end of a period of progesterone treatment. **Anim Reprod Sci**, v. 46, n. 3-4, p. 187-201, 1997.

CHAPMAN, S. C.; WOODRUFF, T. K. Modulation of activin signal transduction by inhibin B and inhibin-binding protein (INhBP). **Mol Endocrinol**, v. 15, n. 4, p. 668-679, 2001.

CHMURZYŃSKA, A. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. **J Appl Genet**, v. 47, n. 1, p. 39-48, 2006.

CHOI, J. H.; CHOI, K. C.; AUERSPERG, N.; LEUNG, P. C. Gonadotropins upregulate the epidermal growth factor receptor through activation of mitogen-activated protein kinases and phosphatidyl-inositol-3-kinase in human ovarian surface epithelial cells. **Endocr Relat Cancer**, v. 12, n. 2, p. 407-421, 2005.

CHRISTENSON, L. K.; STOUFFER, R. L. Proliferation of microvascular endothelial cells in the primate corpus luteum during the menstrual cycle and simulated early pregnancy. **Endocrinology**, v. 137, n. 1, p. 367-374, 1996.

CHRISTENSON, L. K.; STOUFFER, R. L. Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin stimulation of vascular endothelial growth factor production by macaque granulosa cells from pre- and periovulatory follicles. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 82, n. 7, p. 2135-2142, 1997.

CHUNG, S.; WANG, S. P.; PAN, L.; MITCHELL, G.; TRASLER, J.; HERMO, L. Infertility and testicular defects in hormone-sensitive lipase-deficient mice. **Endocrinology**, v. 142, n. 10, p. 4272-4281, 2001.

CLEMENTE, M.; DE LA FUENTE, J.; FAIR, T.; AL NAIB, A.; GUTIERREZ-ADAN, A.; ROCHE, J. F.; RIZOS, D.; LONERGAN, P. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? **Reproduction**, v. 138, n. 3, p. 507-517, 2009.

COLEMAN, R. A.; LEWIN, T. M.; VAN HORN, C. G.; GONZALEZ-BARÓ, M. R. Do long-chain acyl-CoA synthetases regulate fatty acid entry into synthetic versus degradative pathways? **J Nutr**, v. 132, n. 8, p. 2123-2126, 2002.

COX, B.; KISLINGER, T.; EMILI, A. Integrating gene and protein expression data: pattern analysis and profile mining. **Methods**, v. 35, n. 3, p. 303-314, 2005.

CURRY, T. E.; OSTEEN, K. G. The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. **Endocr Rev**, v. 24, n. 4, p. 428-465, 2003.

DE VRIES, C.; ESCOBEDO, J. A.; UENO, H.; HOUCK, K.; FERRARA, N.; WILLIAMS, L. T. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. **Science**, v. 255, n. 5047, p. 989-991, 1992.

DECHAT, T.; PFLEGHAAR, K.; SENGUPTA, K.; SHIMI, T.; SHUMAKER, D. K.; SOLIMANDO, L.; GOLDMAN, R. D. Nuclear lamins: major factors in the structural

organization and function of the nucleus and chromatin. **Genes Dev**, v. 22, n. 7, p. 832-853, 2008.

DISKIN, M. G.; MORRIS, D. G. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. **Reprod Domest Anim**, v. 43 Suppl 2, n., p. 260-267, 2008.

DORAISWAMY, V.; KNUTSON, D. L.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Fibroblast growth factor receptor (FGFR)-1 and -2 in the ovine corpus luteum throughout the estrous cycle. **Growth Factors**, v. 16, n. 2, p. 125-135, 1998.

DOYLE, L. K.; WALKER, C. A.; DONADEU, F. X. VEGF modulates the effects of gonadotropins in granulosa cells. **Domest Anim Endocrinol**, v. 38, n. 3, p. 127-137, 2010.

DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1211-1239, 2001.

ENDERS, A. C. Cytology of the corpus luteum. Biol Reprod, v. 8, n. 2, p. 158-182, 1973.

ENDO, M.; YANAGISAWA, K.; TSUCHIDA, K.; OKAMOTO, T.; MATSUSHITA, T.; HIGUCHI, M.; MATSUDA, A.; TAKEUCHI, M.; MAKITA, Z.; KOIKE, T. Increased levels of vascular endothelial growth factor and advanced glycation end products in aqueous humor of patients with diabetic retinopathy. **Horm Metab Res**, v. 33, n. 5, p. 317-322, 2001.

ESCH, F. S.; SHIMASAKI, S.; COOKSEY, K.; MERCADO, M.; MASON, A. J.; YING, S. Y.; UENO, N.; LING, N. Complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) cloning and DNA sequence analysis of rat ovarian inhibins. **Mol Endocrinol**, v. 1, n. 5, p. 388-396, 1987.

FARIN, C. E.; MOELLER, C. L.; SAWYER, H. R.; GAMBONI, F.; NISWENDER, G. D. Morphometric analysis of cell types in the ovine corpus luteum throughout the estrous cycle. **Biol Reprod**, v. 35, n. 5, p. 1299-1308, 1986.

FATIMA, L. A. **Expressão de fatores angiogênicos em corpo lúteo cíclico e superovulado de búfalas**, 2008 .Tese (Doutorado)- Faculdade de medicina Vetarinária e Zootecnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

FATIMA, L. A.; RIGOGLIO, N. N.; BERTOLIN, K.; BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; BINELLI, M.; RENNÓ, F. P.; MURPHY, B. D.; PAPA, P. C. **Regulation of gene** expression in bovine corpus luteum by eCG secondary title, 2011. 2, 153 p.

FEBBRAIO, M.; HAJJAR, D. P.; SILVERSTEIN, R. L. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. **J Clin Invest**, v. 108, n. 6, p. 785-791, 2001.

FERRARA, N.; CHEN, H.; DAVIS-SMYTH, T.; GERBER, H. P.; NGUYEN, T. N.; PEERS, D.; CHISHOLM, V.; HILLAN, K. J.; SCHWALL, R. H. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. **Nat Med**, v. 4, n. 3, p. 336-340, 1998.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. **Endocr Rev**, v. 25, n. 4, p. 581-611, 2004.

FIELDS, M. J.; FIELDS, P. A. Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during the estrous cycle and pregnancy. **Theriogenology**, v. 45, n. 7, p. 1295-1325, 1996.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L.; SOLER, J. M. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (Bos indicus) cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 8, p. 1489-1505, 1997.

FINDLAY, J. K. An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. **Biol Reprod**, v. 48, n. 1, p. 15-23, 1993.

FORCADA, F.; AIT AMER-MEZIANE, M.; ABECIA, J. A.; MAUREL, M. C.; CEBRIAN-PEREZ, J. A.; MUINO-BLANCO, T.; ASENJO, B.; VAZQUEZ, M. I.; CASAO, A. Repeated superovulation using a simplified FSH/eCG treatment for in vivo embryo production in sheep. **Theriogenology**, v. 75, n. 4, p. 769-776, 2011.

FORDE, N.; CARTER, F.; FAIR, T.; CROWE, M. A.; EVANS, A. C.; SPENCER, T. E.; BAZER, F. W.; MCBRIDE, R.; BOLAND, M. P.; O'GAORA, P.; LONERGAN, P.; ROCHE, J. F. Progesterone-regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced conceptus development in cattle. **Biol Reprod**, v. 81, n. 4, p. 784-794, 2009.

FORDE, N.; BELTMAN, M. E.; DUFFY, G. B.; DUFFY, P.; MEHTA, J. P.; O'GAORA, P.; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P.; CROWE, M. A. Changes in the endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: effect of low circulating progesterone and consequences for conceptus elongation. **Biol Reprod**, v. 84, n. 2, p. 266-278, 2011.

FORSYTHE, J. A.; JIANG, B. H.; IYER, N. V.; AGANI, F.; LEUNG, S. W.; KOOS, R. D.; SEMENZA, G. L. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. **Mol Cell Biol**, v. 16, n. 9, p. 4604-4613, 1996.

FRASER, H. M.; LUNN, S. F. Regulation and manipulation of angiogenesis in the primate corpus luteum. **Reproduction**, v. 121, n. 3, p. 355-362, 2001.
FROMENT, P.; FABRE, S.; DUPONT, J.; PISSELET, C.; CHESNEAU, D.; STAELS, B.; MONGET, P. Expression and functional role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in ovarian folliculogenesis in the sheep. **Biol Reprod**, v. 69, n. 5, p. 1665-1674, 2003.

GARRIDO, C.; SAULE, S.; GOSPODAROWICZ, D. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ovarian bovine granulosa cells. **Growth Factors**, v. 8, n. 2, p. 109-117, 1993.

GASIC, S.; BODENBURG, Y.; NAGAMANI, M.; GREEN, A.; URBAN, R. J. Troglitazone inhibits progesterone production in porcine granulosa cells. **Endocrinology**, v. 139, n. 12, p. 4962-4966, 1998.

GERBER, H. P.; VU, T. H.; RYAN, A. M.; KOWALSKI, J.; WERB, Z.; FERRARA, N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. **Nat Med**, v. 5, n. 6, p. 623-628, 1999.

GINTER, O. J. Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential. J. **Eq. Vet. Sc.**, 2004. 24, 516-526 p.

GINTHER, O. J.; SILVA, L. A.; ARAUJO, R. R.; BEG, M. A. Temporal associations among pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF2alpha, luteal blood flow, and luteolysis in cattle. **Biol Reprod**, v. 76, n. 3, p. 506-513, 2007.

GOSPODAROWICZ, D.; MORAN, J. S.; BRAUN, D. L. Control of proliferation of bovine vascular endothelial cells. **J Cell Physiol**, v. 91, n. 3, p. 377-385, 1977.

GOFFIN, V.; BINART, N.; CLÉMENT-LACROIX, P.; BOUCHARD, B.; BOLE-FEYSOT, C.; EDERY, M.; LUCAS, B. K.; TOURAINE, P.; PEZET, A.; MAASKANT, R.; PICHARD, C.; HELLOCO, C.; BARAN, N.; FAVRE, H.; BERNICHTEIN, S.; ALLAMANDO, A.; ORMANDY, C.; KELLY, P. A. From the molecular biology of prolactin and its receptor to the lessons learned from knockout mice models. **Genet Anal**, v. 15, n. 3-5, p. 189-201, 1999.

GOLOS, T. G.; STRAUSS, J. F. 8-bromoadenosine cyclic 3',5'-phosphate rapidly increases 3hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase mRNA in human granulosa cells: role of cellular sterol balance in controlling the response to tropic stimulation. **Biochemistry**, v. 27, n. 9, p. 3503-3506, 1988.

GOMEZ, R.; SIMON, C.; REMOHI, J.; PELLICER, A. Administration of moderate and high doses of gonadotropins to female rats increases ovarian vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor-2 expression that is associated to vascular hyperpermeability. **Biol Reprod**, v. 68, n. 6, p. 2164-2171, 2003.

GRAHAM, J. D.; CLARKE, C. L. Physiological action of progesterone in target tissues. **Endocr Rev**, v. 18, n. 4, p. 502-519, 1997.

GRASSELLI, F.; BASINI, G.; BUSSOLATI, S.; TAMANINI, C. Effects of VEGF and bFGF on proliferation and production of steroids and nitric oxide in porcine granulosa cells. **Reprod Domest Anim**, v. 37, n. 6, p. 362-368, 2002.

GRAZUL-BILSKA, A. T.; REDMER, D. A.; KILLILEA, S. D.; KRAFT, K. C.; REYNOLDS, L. P. Production of mitogenic factor(s) by ovine corpora lutea throughout the estrous cycle. **Endocrinology**, v. 130, n. 6, p. 3625-3632, 1992.

GRAZUL-BILSKA, A. T.; REDMER, D. A.; ZHENG, J.; KILLILEA, S. D.; REYNOLDS, L. P. Initial characterization of mitogenic activity of ovine corpora lutea from early pregnancy. **Growth Factors**, v. 12, n. 2, p. 131-144, 1995.

GREEN, M. P.; SPATE, L. D.; BIXBY, J. A.; EALY, A. D.; ROBERTS, R. M. A comparison of the anti-luteolytic activities of recombinant ovine interferon-alpha and -tau in sheep. **Biol Reprod**, v. 73, n. 6, p. 1087-1093, 2005.

GROSDEMOUGE, I.; BACHELOT, A.; LUCAS, A.; BARAN, N.; KELLY, P. A.; BINART, N. Effects of deletion of the prolactin receptor on ovarian gene expression. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 1, n., p. 12, 2003.

GUHANIYOGI, J.; BREWER, G. Regulation of mRNA stability in mammalian cells. Gene, v. 265, n. 1-2, p. 11-23, 2001.

GUO, C.; SAVAGE, L.; SARGE, K. D.; PARK-SARGE, O. K. Gonadotropins decrease estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid stability in rat granulosa cells. **Endocrinol.**, v. 142, n. 6, p. 2230-2237, 2001.

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. **Biol Reprod**, v. 56, n. 3, p. 608-616, 1997.

GWYNNE, J. T.; STRAUSS, J. F. The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. **Endocr Rev**, v. 3, n. 3, p. 299-329, 1982.

HANSEN, P. J.; DROST, M.; RIVERA, R. M.; PAULA-LOPES, F. F.; AL-KATANANI, Y. M.; KRININGER, C. E., 3RD; CHASE, C. C., JR. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. **Theriogenology**, v. 55, n. 1, p. 91-103, 2001.

HAUNERLAND, N. H.; SPENER, F. Fatty acid-binding proteins--insights from genetic manipulations. **Prog Lipid Res**, v. 43, n. 4, p. 328-349, 2004.

HAZZARD, T. M.; MOLSKNESS, T. A.; CHAFFIN, C. L.; STOUFFER, R. L. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietin regulation by gonadotrophin and steroids in macaque granulosa cells during the peri-ovulatory interval. **Mol Hum Reprod**, v. 5, n. 12, p. 1115-1121, 1999.

HAZZARD, T. M.; STOUFFER, R. L. Angiogenesis in ovarian follicular and luteal development. **Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v. 14, n. 6, p. 883-900, 2000.

HENNEBOLD, J. D. Characterization of the ovarian transcriptome through the use of differential analysis of gene expression methodologies. **Hum Reprod Update**, v. 10, n. 3, p. 227-239, 2004.

HESSER, M. W.; MORRIS, J. C.; GIBBONS, J. R. Advances in recombinant gonadotropin production for use in bovine superovulation. **Reprod Domest Anim**, v. 46, n. 5, p. 933-942, 2011.

HILLIER, S. G.; MIRÓ, F. Inhibin, activin, and follistatin. Potential roles in ovarian physiology. **Ann N Y Acad Sci**, v. 687, n., p. 29-38, 1993.

HYDER, S. M.; STANCEL, G. M. Regulation of angiogenic growth factors in the female reproductive tract by estrogens and progestins. **Mol Endocrinol**, v. 13, n. 6, p. 806-811, 1999.

ISHIKAWA, K.; OHBA, T.; TANAKA, N.; IQBAL, M.; OKAMURA, Y.; OKAMURA, H. Organ-specific production control of vascular endothelial growth factor in ovarian hyperstimulation syndrome-model rats. **Endocr J**, v. 50, n. 5, p. 515-525, 2003.

JANSON, P. O.; DAMBER, J. E.; AXÉN, C. Luteal blood flow and progesterone secretion in pseudopregnant rabbits. **J Reprod Fertil**, v. 63, n. 2, p. 491-497, 1981.

JOHNSON, D. G.; WALKER, C. L. Cyclins and cell cycle checkpoints. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 39, n., p. 295-312, 1999.

JONES, L. S.; OTTOBRE, J. S.; PATE, J. L. Progesterone regulation of luteinizing hormone receptors on cultured bovine luteal cells. **Mol Cell Endocrinol**, v. 85, n. 1-2, p. 33-39, 1992.

KARKKAINEN, M. J.; ALITALO, K. Lymphatic endothelial regulation, lymphoedema, and lymph node metastasis. **Semin Cell Dev Biol**, v. 13, n. 1, p. 9-18, 2002.

KARSCH, F. J.; LEGAN, S. J.; HAUGER, R. L.; FOSTER, D. L. Negative feedback action of progesterone on tonic luteinizing hormone secretion in the ewe: dependence on the ovaries. **Endocrinology**, v. 101, n. 3, p. 800-806, 1977.

KATO, K.; SATOH, H.; ENDO, Y.; YAMADA, D.; MIDORIKAWA, S.; SATO, W.; MIZUNO, K.; FUJITA, T.; TSUKAMOTO, K.; WATANABE, T. Thiazolidinediones downregulate plasminogen activator inhibitor type 1 expression in human vascular endothelial cells: A possible role for PPARgamma in endothelial function. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 258, n. 2, p. 431-435, 1999.

KATOH, Y.; KATOH, M. Comparative genomics on FGF16 orthologs. **Int J Mol Med**, v. 16, n. 5, p. 959-963, 2005.

KHAN-DAWOOD, F. S.; YUSOFF DAWOOD, M.; TABIBZADEH, S. Immunohistochemical analysis of the microanatomy of primate ovary. **Biol Reprod**, v. 54, n. 3, p. 734-742, 1996.

KLIEWER, S. A.; SUNDSETH, S. S.; JONES, S. A.; BROWN, P. J.; WISELY, G. B.; KOBLE, C. S.; DEVCHAND, P.; WAHLI, W.; WILLSON, T. M.; LENHARD, J. M.; LEHMANN, J. M. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 9, p. 4318-4323, 1997.

KOHEN, P.; CASTRO, O.; PALOMINO, A.; MUÑOZ, A.; CHRISTENSON, L. K.; SIERRALTA, W.; CARVALLO, P.; STRAUSS, J. F.; DEVOTO, L. The steroidogenic response and corpus luteum expression of the steroidogenic acute regulatory protein after human chorionic gonadotropin administration at different times in the human luteal phase. J Clin Endocrinol Metab, v. 88, n. 7, p. 3421-3430, 2003.

KOMAR, C. M.; BRAISSANT, O.; WAHLI, W.; CURRY, T. E. Expression and localization of PPARs in the rat ovary during follicular development and the periovulatory period. **Endocrinol.**, v. 142, n. 11, p. 4831-4838, 2001.

KOMAR, C. M. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and ovarian functionimplications for regulating steroidogenesis, differentiation, and tissue remodeling. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 3, n., p. 41, 2005.

KOTA, B. P.; HUANG, T. H.; ROUFOGALIS, B. D. An overview on biological mechanisms of PPARs. **Pharmacol Res**, v. 51, n. 2, p. 85-94, 2005.

KRAEMER, F. B.; PATEL, S.; SINGH-BIST, A.; GHOLAMI, S. S.; SAEDI, M. S.; SZTALRYD, C. Detection of hormone-sensitive lipase in various tissues. II. Regulation in the rat testis by human chorionic gonadotropin. **J Lipid Res**, v. 34, n. 4, p. 609-616, 1993.

KRISANS, S. K. Cell compartmentalization of cholesterol biosynthesis. Ann N Y Acad Sci, v. 804, n., p. 142-164, 1996.

KUMAR, T. R.; PALAPATTU, G.; WANG, P.; WOODRUFF, T. K.; BOIME, I.; BYRNE, M. C.; MATZUK, M. M. Transgenic models to study gonadotropin function: the role of follicle-stimulating hormone in gonadal growth and tumorigenesis. **Mol Endocrinol**, v. 13, n. 6, p. 851-865, 1999.

KUO, S. W.; KE, F. C.; CHANG, G. D.; LEE, M. T.; HWANG, J. J. Potential role of folliclestimulating hormone (FSH) and transforming growth factor (TGF β 1) in the regulation of ovarian angiogenesis. **J Cell Physiol**, v. 226, n. 6, p. 1608-1619, 2011.

KUŞCU, N. K.; KOYUNCU, F.; OZBILGIN, K.; INAN, S.; TUĞLU, I.; KARAER, O. Insulin: does it induce follicular arrest in the rat ovary? **Gynecol Endocrinol**, v. 16, n. 5, p. 361-364, 2002.

LABRIE, F.; SIMARD, J.; LUU-THE, V.; PELLETIER, G.; BELANGER, A.; LACHANCE, Y.; ZHAO, H. F.; LABRIE, C.; BRETON, N.; DE LAUNOIT, Y.; ET AL. Structure and tissue-specific expression of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/5-ene-4-ene isomerase genes in human and rat classical and peripheral steroidogenic tissues. J Steroid Biochem Mol Biol, v. 41, n. 3-8, p. 421-435, 1992.

LAMMING, G. E.; DARWASH, A. O.; BACK, H. L. Corpus luteum function in dairy cows and embryo mortality. **J Reprod Fertil Suppl**, v. 37, n., p. 245-252, 1989.

LAWRENCE, D. A. Transforming growth factor-beta: a general review. **Eur Cytokine** Netw, v. 7, n. 3, p. 363-374, 1996.

LEE, A.; CHRISTENSON, L. K.; PATTON, P. E.; BURRY, K. A.; STOUFFER, R. L. Vascular endothelial growth factor production by human luteinized granulosa cells in vitro. **Hum Reprod**, v. 12, n. 12, p. 2756-2761, 1997.

LI, Q.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. J.; SMITH, G. W. Gene expression profiling of bovine preovulatory follicles: gonadotropin surge and prostanoid-dependent up-regulation of genes potentially linked to the ovulatory process. **Reproduction**, v. 137, n. 2, p. 297-307, 2009.

LI, R.; PHILLIPS, D. M.; MATHER, J. P. Activin promotes ovarian follicle development in vitro. **Endocrinology**, v. 136, n. 3, p. 849-856, 1995.

LI, X.; LEI, Z. M.; RAO, C. V. Human chorionic gonadotropin down-regulates the expression of gonadotropin-releasing hormone receptor gene in GT1-7 neurons. **Endocrinology**, v. 137, n. 3, p. 899-904, 1996.

LIN, D.; SUGAWARA, T.; STRAUSS, J. F.; CLARK, B. J.; STOCCO, D. M.; SAENGER, P.; ROGOL, A.; MILLER, W. L. Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. **Science**, v. 267, n. 5205, p. 1828-1831, 1995.

LINDSELL, C. E.; MISRA, V.; MURPHY, B. D. Regulation of follistatin gene expression in the ovary and in primary cultures of porcine granulosa cells. **J Reprod Fertil**, v. 100, n. 2, p. 591-597, 1994.

LIU, K.; LIU, Y. X.; HU, Z. Y.; ZOU, R. Y.; CHEN, Y. J.; MU, X. M.; NY, T. Temporal expression of urokinase type plasminogen activator, tissue type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor type 1 in rhesus monkey corpus luteum during the luteal maintenance and regression. **Mol Cell Endocrinol**, v. 133, n. 2, p. 109-116, 1997.

LODISH, H. F.; ZHOU, B.; LIU, G.; CHEN, C. Z. Micromanagement of the immune system by microRNAs. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 2, p. 120-130, 2008.

LOWSKY, R.; FAROOKHI, R. A granulosa cell differentiation-stage-specific cytotoxic activity in bovine and rat sera. **Biol Reprod**, v. 40, n. 6, p. 1265-1273, 1989.

LUCK, M. R.; ZHAO, Y. Identification and measurement of collagen in the bovine corpus luteum and its relationship with ascorbic acid and tissue development. **J Reprod Fertil**, v. 99, n. 2, p. 647-652, 1993.

MADUREIRA, E. H. Sincronização com progestágenos. v., n., p. 117-128, 2004.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Progesterone inhibition of the development of the luteolytic signal in cows. **J Reprod Fertil**, v. 104, n. 1, p. 1-5, 1995.

MANN, G. E. The role of luteal oxytocin in episodic secretion of prostaglandin F2alpha at luteolysis in the ewe. **Anim Reprod Sci**, v. 57, n. 3-4, p. 167-175, 1999.

MAPLETOFT, R. J.; STEWARD, K. B.; ADAMS, G. P. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reprod Nutr Dev**, v. 42, n. 6, p. 601-611, 2002.

MARTINS, C. M.; TORRES-JUNIOR, J. R. S.; SOUZA, A. H.; SOUZA, M. G. Superovulação com eCG ou FSH em doadoras Nelore (Bos indicus) inseminadas em tempo fixo. **Acta. Sci. Vet**, v., n. 34, p. 227, 2006.

MATSUYAMA, S.; TAKAHASHI, M. Immunoreactive (ir)-transforming growth factor (TGF)-beta in rat corpus luteum: ir-TGF beta is expressed by luteal macrophages. **Endocr J**, v. 42, n. 2, p. 203-217, 1995.

MATTIOLI, M.; BARBONI, B.; TURRIANI, M.; GALEATI, G.; ZANNONI, A.; CASTELLANI, G.; BERARDINELLI, P.; SCAPOLO, P. A. Follicle activation involves vascular endothelial growth factor production and increased blood vessel extension. **Biol Reprod**, v. 65, n. 4, p. 1014-1019, 2001.

MAYBIN, J. A.; DUNCAN, W. C. The human corpus luteum: which cells have progesterone receptors? **Reproduction**, v. 128, n. 4, p. 423-431, 2004.

MCCLELLAN, M. C.; DIECKMAN, M. A.; ABEL, J. H., JR.; NISWENDER, G. D. Luteinizing hormone, progesterone and the morphological development of normal and superovulated corpora lutea in sheep. **Cell Tissue Res**, v. 164, n. 3, p. 291-307, 1975.

MEIDAN, R.; GIRSH, E.; BLUM, O.; ABERDAM, E. In vitro differentiation of bovine theca and granulosa cells into small and large luteal-like cells: morphological and functional characteristics. **Biol Reprod**, v. 43, n. 6, p. 913-921, 1990.

MEYER, D. I. Protein translocation into the endoplasmic reticulum: a light at the end of the tunnel. **Trends Cell Biol**, v. 1, n. 6, p. 154-159, 1991.

MILLER, W. L. Molecular biology of steroid hormone synthesis. **Endocr Rev**, v. 9, n. 3, p. 295-318, 1988.

MILLER, W. L. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. **Biochim Biophys Acta**, v. 1771, n. 6, p. 663-676, 2007.

MILLER, W. L.; BOSE, H. S. Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking. **J Lipid Res**, v. 52, n. 12, p. 2111-2135, 2011.

MISRA, A. K.; KASIRAJ, R.; RAO, M. M.; RANGAREDDY, N. S.; JAISWAL, R. S.; PANT, H. C. Rate of transport and development of preimplantation embryo in the superovulated buffalo (Bubalus bubalis). **Theriogenology**, v. 50, n. 4, p. 637-649, 1998.

MIYAMOTO, A.; OKUDA, K.; SCHWEIGERT, F. J.; SCHAMS, D. Effects of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor-beta and nerve growth factor on the secretory function of the bovine corpus luteum in vitro. **J Endocrinol**, v. 135, n. 1, p. 103-114, 1992.

MONTAÑO, E.; OLIVERA, M.; RUIZ-CORTÉS, Z. T. Association between leptin, LH and its receptor and luteinization and progesterone accumulation (P4) in bovine granulosa cell in vitro. **Reprod Domest Anim**, v. 44, n. 4, p. 699-704, 2009.

MOURA, C. E. B. Expressão do VEGF e vascularização do corpo lúteo em bufálos, 2003. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MURPHY, B. D.; MARTINUK, S. D. Equine chorionic gonadotropin. **Endocr Rev**, v. 12, n. 1, p. 27-44, 1991.

NAKATANI, A.; SHIMASAKI, S.; DEPAOLO, L. V.; ERICKSON, G. F.; LING, N. Cyclic changes in follistatin messenger ribonucleic acid and its protein in the rat ovary during the estrous cycle. **Endocrinology**, v. 129, n. 2, p. 603-611, 1991.

NISSEN, N. N.; POLVERINI, P. J.; KOCH, A. E.; VOLIN, M. V.; GAMELLI, R. L.; DIPIETRO, L. A. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. **Am J Pathol**, v. 152, n. 6, p. 1445-1452, 1998.

NISWENDER, G. D. Molecular control of luteal secretion of progesterone. **Reproduction**, v. 123, n. 3, p. 333-339, 2002.

NISWENDER, G. D.; JUENGEL, J. L.; SILVA, P. J.; ROLLYSON, M. K.; MCINTUSH, E. W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiol Rev**, v. 80, n. 1, p. 1-29, 2000.

NISWENDER, G. D.; JUENGEL, J. L.; MCGUIRE, W. J.; BELFIORE, C. J.; WILTBANK, M. C. Luteal function: the estrous cycle and early pregnancy. **Biol Reprod**, v. 50, n. 2, p. 239-247, 1994.

NISWENDER, G. D.; NETT, T. M. The corpus luteum and its control in infraprimate species. In Knobil, E.; Neill, J. D. The Physiology of Reproduction, New York: Roven Press, v. 1, n., p. 781-816, 1994.

NOGUEIRA, M. F.; BURATINI, J.; PRICE, C. A.; CASTILHO, A. C.; PINTO, M. G.; BARROS, C. M. Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: changes with follicle size and regulation by FSH in vitro. **Mol Reprod Dev**, v. 74, n. 6, p. 680-686, 2007.

NOTHNICK, W. B. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) deficient mice display reduced serum progesterone levels during corpus luteum development. **Endocrinology**, v. 144, n. 1, p. 5-8, 2003.

O'SHEA, J. D.; RODGERS, R. J.; D'OCCHIO, M. J. Cellular composition of the cyclic corpus luteum of the cow. **J Reprod Fertil**, v. 85, n. 2, p. 483-487, 1989.

OTSUKA, F.; MOORE, R. K.; IEMURA, S.; UENO, N.; SHIMASAKI, S. Follistatin inhibits the function of the oocyte-derived factor BMP-15. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 289, n. 5, p. 961-966, 2001.

PAPA, P. C.; MOURA, C. E.; ARTONI, L. P.; FATIMA, L. A.; CAMPOS, D. B.; MARQUES, J. E., JR.; BARUSELLI, P. S.; BINELLI, M.; PFARRER, C.; LEISER, R. VEGF system expression in different stages of estrous cycle in the corpus luteum of nontreated and superovulated water buffalo. **Domest Anim Endocrinol**, v. 33, n. 4, p. 379-389, 2007.

PATE, J. L.; CONDON, W. A. Effects of serum and lipoproteins on steroidogenesis in cultured bovine luteal cells. **Mol Cell Endocrinol**, v. 28, n. 3, p. 551-562, 1982.

PATE, J. L. Regulation of prostaglandin synthesis by progesterone in the bovine corpus luteum. **Prostaglandins**, v. 36, n. 3, p. 303-315, 1988.

PESCADOR, N.; STOCCO, D. M.; MURPHY, B. D. Growth factor modulation of steroidogenic acute regulatory protein and luteinization in the pig ovary. **Biol Reprod**, v. 60, n. 6, p. 1453-1461, 1999.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

PICAZO, R. A.; GARCÍA RUIZ, J. P.; SANTIAGO MORENO, J.; GONZÁLEZ DE BULNES, A.; MUÑOZ, J.; SILVÁN, G.; LORENZO, P. L.; ILLERA, J. C. Cellular localization and changes in expression of prolactin receptor isoforms in sheep ovary throughout the estrous cycle. **Reproduction**, v. 128, n. 5, p. 545-553, 2004.

PIETROWSKI, D.; KECK, C. Differential regulation of ANG2 and VEGF-A in human granulosa lutein cells by choriogonadotropin. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 112, n. 4, p. 208-214, 2004.

PLENDL, J. Angiogenesis and vascular regression in the ovary. **Anat Histol Embryol**, v. 29, n. 5, p. 257-266, 2000.

PRIYANKA, S.; JAYARAM, P.; SRIDARAN, R.; MEDHAMURTHY, R. Genome-wide gene expression analysis reveals a dynamic interplay between luteotropic and luteolytic factors in the regulation of corpus luteum function in the bonnet monkey (Macaca radiata). **Endocrinology**, v. 150, n. 3, p. 1473-1484, 2009.

QIN, Y.; TIAN, Y. P. A microarray gene analysis of peripheral whole blood in normal adult male rats after long-term GH gene therapy. **Cell Mol Biol Lett**, v. 15, n. 2, p. 177-195, 2010.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPREZ, R. H.; MOORMAN, A. F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neurosci Lett**, v. 339, n. 1, p. 62-66, 2003.

RATHBONE, M. J.; KINDER, J. E.; FIKE, K.; KOJIMA, F.; CLOPTON, D.; OGLE, C. R.; BUNT, C. R. Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 50, n. 3, p. 277-320, 2001.

REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Angiogenesis in the ovary. **Rev Reprod**, v. 1, n. 3, p. 182-192, 1996.

REISINGER, K.; BAAL, N.; MCKINNON, T.; MUNSTEDT, K.; ZYGMUNT, M. The gonadotropins: tissue-specific angiogenic factors? **Mol Cell Endocrinol**, v. 269, n. 1-2, p. 65-80, 2007.

RENNER, W.; PILGER, E. Simultaneous in vivo quantitation of vascular endothelial growth factor mRNA splice variants. **J Vasc Res**, v. 36, n. 2, p. 133-138, 1999.

RENNERT, H.; FISCHER, R. T.; ALVAREZ, J. G.; TRZASKOS, J. M.; STRAUSS, J. F. Generation of regulatory oxysterols: 26-hydroxylation of cholesterol by ovarian mitochondria. **Endocrinology**, v. 127, n. 2, p. 738-746, 1990.

REYNOLDS, L. P.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; REDMER, D. A. Angiogenesis in the female reproductive organs: pathological implications. **Int J Exp Pathol**, v. 83, n. 4, p. 151-163, 2002.

RHODES, F. M.; FITZPATRICK, L. A.; ENTWISTLE, K. W.; DE'ATH, G. Sequential changes in ovarian follicular dynamics in Bos indicus heifers before and after nutritional anoestrus. **J Reprod Fertil**, v. 104, n. 1, p. 41-49, 1995.

RIGOGLIO, N. N.; FATIMA, L. A.; HANASSAKA, G. P.; MACHADO, L. U.; GIMENES, L. U.; BARUSELLI, P. S.; RENNÓ, F. P.; MOURA, C. E.; WATANABE, I. S.; PAPA, P. C. Equine chorionic gonadotropin alters luteal cell morphological features related to

progesterone synthesis. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 15, n. Sup.1, p. 85-86, 2012.

RISK MC, G. G. Mechanisms of luteal cell regulation by prolactin. **n Horseman ND, ed. Prolactin. Boston: Kluwer Academic Publisher**, v., n., p. 265–295, 2001.

ROBERTS, A. J.; SKINNER, M. K. Transforming growth factor-alpha and -beta differentially regulate growth and steroidogenesis of bovine thecal cells during antral follicle development. **Endocrinology**, v. 129, n. 4, p. 2041-2048, 1991.

ROBERTS, V. J.; BARTH, S.; EL-ROEIY, A.; YEN, S. S. Expression of inhibin/activin subunits and follistatin messenger ribonucleic acids and proteins in ovarian follicles and the corpus luteum during the human menstrual cycle. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 77, n. 5, p. 1402-1410, 1993.

ROBERTSON, D. M.; KLEIN, R.; DE VOS, F. L.; MCLACHLAN, R. I.; WETTENHALL, R. E.; HEARN, M. T.; BURGER, H. G.; DE KRETSER, D. M. The isolation of polypeptides with FSH suppressing activity from bovine follicular fluid which are structurally different to inhibin. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 149, n. 2, p. 744-749, 1987.

ROBINSON, C. J.; STRINGER, S. E. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. **J Cell Sci**, v. 114, n. Pt 5, p. 853-865, 2001.

ROBKER, R. L.; RICHARDS, J. S. Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: a coordinated balance of the cell cycle regulators cyclin D2 and p27Kip1. **Mol Endocrinol**, v. 12, n. 7, p. 924-940, 1998.

RODRIGUEZ, A.; KAFONEK, S. D.; GEORGOPOULOS, A.; BACHORIK, P. S. Cell density can affect cholesteryl ester accumulation in the human THP-1 macrophage. **J Lipid Res**, v. 35, n. 11, p. 1909-1917, 1994.

RUBENSTRUNK, A.; HANF, R.; HUM, D. W.; FRUCHART, J. C.; STAELS, B. Safety issues and prospects for future generations of PPAR modulators. **Biochim Biophys Acta**, v. 1771, n. 8, p. 1065-1081, 2007.

RUEDA, B. R.; HENDRY, I. R.; HENDRY III, W. J.; STORMSHAK, F.; SLAYDEN, O. D.; DAVIS, J. S. Decreased progesterone levels and progesterone receptor antagonists promote apoptotic cell death in bovine luteal cells. **Biol Reprod**, v. 62, n. 2, p. 269-276, 2000.

RUOHOLA, J. K.; VALVE, E. M.; KARKKAINEN, M. J.; JOUKOV, V.; ALITALO, K.; HÄRKÖNEN, P. L. Vascular endothelial growth factors are differentially regulated by steroid hormones and antiestrogens in breast cancer cells. **Mol Cell Endocrinol**, v. 149, n. 1-2, p. 29-40, 1999.

SÁ FILHO, M. F.; TORRES-JÚNIOR, J. R.; PENTEADO, L.; GIMENES, L. U.; FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; CASTRO E PAULA, L. A.; SALES, J. N.; BARUSELLI, P. S. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (Bos indicus) heifers. **Anim Reprod Sci**, v. 118, n. 2-4, p. 182-187, 2010.

SAHMI, M.; NICOLA, E. S.; PRICE, C. A. Hormonal regulation of cytochrome P450 aromatase mRNA stability in non-luteinizing bovine granulosa cells in vitro. **J Endocrinol**, v. 190, n. 1, p. 107-115, 2006.

SAKUMOTO, R.; VERMEHREN, M.; KENNGOTT, R. A.; OKUDA, K.; SINOWATZ, F. Changes in the levels of progesterone receptor mRNA and protein in the bovine corpus luteum during the estrous cycle. **J Reprod Dev**, v. 56, n. 2, p. 219-222, 2010.

SALES, J. N.; CREPALDI, G. A.; GIROTTO, R. W.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-anestrus Nelore beef cows. **Anim Reprod Sci**, v. 124, n. 1-2, p. 12-18, 2011.

SASSON, R.; DANTES, A.; TAJIMA, K.; AMSTERDAM, A. Novel genes modulated by FSH in normal and immortalized FSH-responsive cells: new insights into the mechanism of FSH action. **FASEB J**, v. 17, n. 10, p. 1256-1266, 2003.

SCHAMS, D.; BERISHA, B. Regulation of corpus luteum function in cattle--an overview. **Reprod Domest Anim**, v. 39, n. 4, p. 241-251, 2004.

SCHAMS, D.; KOSMANN, M.; BERISHA, B.; AMSELGRUBER, W. M.; MIYAMOTO, A. Stimulatory and synergistic effects of luteinising hormone and insulin like growth factor 1 on the secretion of vascular endothelial growth factor and progesterone of cultured bovine granulosa cells. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 109, n. 3, p. 155-162, 2001.

SCHAMS, D.; KRAETZL, W. D.; BREM, G.; GRAF, F. Secretory pattern of metabolic hormones in the lactating sow. **Exp Clin Endocrinol**, v. 102, n. 6, p. 439-447, 1994.

SCHOONJANS, K.; PEINADO-ONSURBE, J.; LEFEBVRE, A. M.; HEYMAN, R. A.; BRIGGS, M.; DEEB, S.; STAELS, B.; AUWERX, J. PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. **EMBO J**, v. 15, n. 19, p. 5336-5348, 1996.

SETO-YOUNG, D.; AVTANSKI, D.; STRIZHEVSKY, M.; PARIKH, G.; PATEL, P.; KAPLUN, J.; HOLCOMB, K.; ROSENWAKS, Z.; PORETSKY, L. Interactions among peroxisome proliferator activated receptor-gamma, insulin signaling pathways, and steroidogenic acute regulatory protein in human ovarian cells. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 92, n. 6, p. 2232-2239, 2007.

SHARKEY, A. M.; DAY, K.; MCPHERSON, A.; MALIK, S.; LICENCE, D.; SMITH, S. K.; CHARNOCK-JONES, D. S. Vascular endothelial growth factor expression in human

endometrium is regulated by hypoxia. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 85, n. 1, p. 402-409, 2000.

SHIBUYA, M.; YAMAGUCHI, S.; YAMANE, A.; IKEDA, T.; TOJO, A.; MATSUSHIME, H.; SATO, M. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. **Oncogene**, v. 5, n. 4, p. 519-524, 1990.

SHIMIZU, T.; MIYAMOTO, A. Progesterone induces the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) 120 and Flk-1, its receptor, in bovine granulosa cells. **Anim Reprod Sci**, v. 102, n. 3-4, p. 228-237, 2007.

SHIMIZU, T.; JAYAWARDANA, B. C.; TETSUKA, M.; MIYAMOTO, A. Differential effect of follicle-stimulating hormone and estradiol on expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) 120, VEGF164 and their receptors in bovine granulosa cells. **J Reprod Dev**, v. 53, n. 1, p. 105-112, 2007.

SHU, H.; WONG, B.; ZHOU, G.; LI, Y.; BERGER, J.; WOODS, J. W.; WRIGHT, S. D.; CAI, T. Q. Activation of PPARalpha or gamma reduces secretion of matrix metalloproteinase 9 but not interleukin 8 from human monocytic THP-1 cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 267, n. 1, p. 345-349, 2000.

SHUMAKER, D. K.; KUCZMARSKI, E. R.; GOLDMAN, R. D. The nucleoskeleton: lamins and actin are major players in essential nuclear functions. **Curr Opin Cell Biol**, v. 15, n. 3, p. 358-366, 2003.

SHWEIKI, D.; ITIN, A.; NEUFELD, G.; GITAY-GOREN, H.; KESHET, E. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. **J Clin Invest**, v. 91, n. 5, p. 2235-2243, 1993.

SIMARD, J.; RICKETTS, M. L.; GINGRAS, S.; SOUCY, P.; FELTUS, F. A.; MELNER, M. H. Molecular biology of the 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family. **Endocr Rev**, v. 26, n. 4, p. 525-582, 2005.

SIMPSON, E. R.; PORTER, J. C.; BILHEIMER, D. W.; MACDONALD, P. C. Lipoprotein regulation of progesterone secretion by choriocarcinoma cells in culture [proceedings]. **J Endocrinol**, v. 81, n. 2, p. 163P-164P, 1979.

SINGH, J.; ADAMS, G. P. Immunohistochemical distribution of follistatin in dominant and subordinate follicles and the corpus luteum of cattle. **Biol Reprod**, v. 59, n. 3, p. 561-570, 1998a.

SINGH, J.; ADAMS, G. P. Immunohistochemical distribution of follistatin in dominant and subordinate follicles and the corpus luteum of cattle. **Biol Reprod**, v. 59, n. 3, p. 561-570, 1998b.

SLEEMAN, M.; FRASER, J.; MCDONALD, M.; YUAN, S.; WHITE, D.; GRANDISON, P.; KUMBLE, K.; WATSON, J. D.; MURISON, J. G. Identification of a new fibroblast growth factor receptor, FGFR5. **Gene**, v. 271, n. 2, p. 171-182, 2001.

SLEER, L. S.; TAYLOR, C. C. Platelet-derived growth factors and receptors in the rat corpus luteum: localization and identification of an effect on luteogenesis. **Biol Reprod**, v. 76, n. 3, p. 391-400, 2007.

SMITH, C. J.; RICHARDS, J. S.; YASIN, K.; SANGSTER, J. N.; SRIDARAN, R. Changes in rat luteal ultrastructure and P450scc mRNA and protein content after in vivo treatment with a gonadotropin-releasing hormone agonist. **Biol Reprod**, v. 44, n. 2, p. 382-391, 1991.

SMITH, M. F.; MCINTUSH, E. W.; SMITH, G. W. Mechanisms associated with corpus luteum development. **J Anim Sci**, v. 72, n. 7, p. 1857-1872, 1994.

SOLOFF, M. S.; JENG, Y. J.; IZBAN, M. G.; SINHA, M.; LUXON, B. A.; STAMNES, S. J.; ENGLAND, S. K. Effects of progesterone treatment on expression of genes involved in uterine quiescence. **Reprod Sci**, v. 18, n. 8, p. 781-797, 2011.

SOUZA, A. H.; VIECHNIESKI, S.; LIMA, F. A.; SILVA, F. F.; ARAUJO, R.; BO, G. A.; WILTBANK, M. C.; BARUSELLI, P. S. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. **Theriogenology**, v. 72, n. 1, p. 10-21, 2009.

SRIPERUMBUDUR, R.; ZORRILLA, L.; GADSBY, J. E. Transforming growth factor-beta (TGFbeta) and its signaling components in peri-ovulatory pig follicles. **Anim Reprod Sci**, v. 120, n. 1-4, p. 84-94, 2010.

STEINBRECH, D. S.; MEHRARA, B. J.; SAADEH, P. B.; GREENWALD, J. A.; SPECTOR, J. A.; GITTES, G. K.; LONGAKER, M. T. VEGF expression in an osteoblastlike cell line is regulated by a hypoxia response mechanism. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 278, n. 4, p. C853-860, 2000.

STEWART, F.; ALLEN, W. R. Biological functions and receptor binding activities of equine chorionic gonadotrophins. **J Reprod Fertil**, v. 62, n. 2, p. 527-536, 1981.

STOCCO, D. M.; CLARK, B. J. Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis. **Biochem Pharmacol**, v. 51, n. 3, p. 197-205, 1996.

STOCCO, C. O.; CHEDRESE, J.; DEIS, R. P. Luteal expression of cytochrome P450 sidechain cleavage, steroidogenic acute regulatory protein, 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase genes in late pregnant rats: effect of luteinizing hormone and RU486. **Biol Reprod**, v. 65, n. 4, p. 1114-1119, 2001.

STOCCO, C.; TELLERIA, C.; GIBORI, G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. **Endocr Rev**, v. 28, n. 1, p. 117-149, 2007.

STOCCO, C. The Long and Short of the Prolactin Receptor: The Corpus Luteum Needs Them Both! **Biol Reprod**, v., n., p., 2011.

STORMSHAK, F.; ZELINSKI-WOOTEN, M. B.; ABDELGADIR, S. E. Comparative aspects of the regulation of corpus luteum function in various species. **Adv Exp Med Biol**, v. 219, n., p. 327-360, 1987.

STRAUSS, J. F.; KISHIDA, T.; CHRISTENSON, L. K.; FUJIMOTO, T.; HIROI, H. START domain proteins and the intracellular trafficking of cholesterol in steroidogenic cells. **Mol Cell Endocrinol**, v. 202, n. 1-2, p. 59-65, 2003.

TAYLOR, M. J.; CLARK, C. L. Basic fibroblast growth factor inhibits basal and stimulated relaxin secretion by cultured porcine luteal cells: analysis by reverse hemolytic plaque assay. **Endocrinology**, v. 130, n. 4, p. 1951-1956, 1992.

TERMAN, B. I.; DOUGHER-VERMAZEN, M.; CARRION, M. E.; DIMITROV, D.; ARMELLINO, D. C.; GOSPODAROWICZ, D.; BÖHLEN, P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 187, n. 3, p. 1579-1586, 1992.

TRZECIAK, W. H.; SONNENBORN, U.; BALKOW, C.; KUNAU, W. H. Regulation of steroidogenesis in rat adrenal gland: identification of the bifunctional, hormone-sensitive cholesterol esterase--triacylglycerol lipase enzyme protein and its discrimination from hormone-insensitive lipases. **Mol Cell Endocrinol**, v. 35, n. 2-3, p. 131-141, 1984.

TUCKEY, R. C.; ATKINSON, H. C. Pregnenolone synthesis from cholesterol and hydroxycholesterols by mitochondria from ovaries following the stimulation of immature rats with pregnant mare's serum gonadotropin and human choriogonadotropin. **Eur J Biochem**, v. 186, n. 1-2, p. 255-259, 1989.

VIERGUTZ, T.; LOEHRKE, B.; POEHLAND, R.; BECKER, F.; KANITZ, W. Relationship between different stages of the corpus luteum and the expression of the peroxisome

proliferator-activated receptor gamma protein in bovine large lutein cells. **J Reprod Fertil**, v. 118, n. 1, p. 153-161, 2000.

VONNAHME, K. A.; WILSON, M. E.; LI, Y.; RUPNOW, H. L.; PHERNETTON, T. M.; FORD, S. P.; MAGNESS, R. R. Circulating levels of nitric oxide and vascular endothelial growth factor throughout ovine pregnancy. **J Physiol**, v. 565, n. Pt 1, p. 101-109, 2005.

VOSS, A. K.; FORTUNE, J. E. Levels of messenger ribonucleic acid for cholesterol sidechain cleavage cytochrome P-450 and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in bovine preovulatory follicles decrease after the luteinizing hormone surge. **Endocrinology**, v. 132, n. 2, p. 888-894, 1993.

WEBB, R.; CAMPBELL, B. K.; GARVERICK, H. A.; GONG, J. G.; GUTIERREZ, C. G.; ARMSTRONG, D. G. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. **J Reprod Fertil Suppl**, v. 54, n., p. 33-48, 1999.

WILTBANK, M. C.; BELFIORE, C. J.; NISWENDER, G. D. Steroidogenic enzyme activity after acute activation of protein kinase (PK) A and PKC in ovine small and large luteal cells. **Mol Cell Endocrinol**, v. 97, n. 1-2, p. 1-7, 1993.

WRIGHT, G. W.; SIMON, R. M. A random variance model for detection of differential gene expression in small microarray experiments. **Bioinformatics**, v. 19, n. 18, p. 2448-2455, 2003.

WU, T.; TIAN, J.; CUTLER, R. G.; TELLJOHANN, R. S.; BERNLOHR, D. A.; MATTSON, M. P.; HANDA, J. T. Knockdown of FABP5 mRNA decreases cellular cholesterol levels and results in decreased apoB100 secretion and triglyceride accumulation in ARPE-19 cells. **Lab Invest**, v. 90, n. 6, p. 963-965, 2010.

WULFF, C.; WILSON, H.; LARGUE, P.; DUNCAN, W. C.; ARMSTRONG, D. G.; FRASER, H. M. Angiogenesis in the human corpus luteum: localization and changes in angiopoietins, tie-2, and vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 85, n. 11, p. 4302-4309, 2000.

XU, Z.; GARVERICK, H. A.; SMITH, G. W.; SMITH, M. F.; HAMILTON, S. A.; YOUNGQUIST, R. S. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biol Reprod**, v. 53, n. 4, p. 951-957, 1995.

YAMASHITA, H.; KAMADA, D.; SHIRASUNA, K.; MATSUI, M.; SHIMIZU, T.; KIDA, K.; BERISHA, B.; SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A. Effect of local neutralization of basic fibroblast growth factor or vascular endothelial growth factor by a specific antibody on the development of the corpus luteum in the cow. **Mol Reprod Dev**, v. 75, n. 9, p. 1449-1456, 2008.

YANCOPOULOS, G. D.; DAVIS, S.; GALE, N. W.; RUDGE, J. S.; WIEGAND, S. J.; HOLASH, J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 242-248, 2000.

YILMAZ, M.; BUKAN, N.; AYVAZ, G.; KARAKOC, A.; TORUNER, F.; CAKIR, N.; ARSLAN, M. The effects of rosiglitazone and metformin on oxidative stress and homocysteine levels in lean patients with polycystic ovary syndrome. **Hum Reprod**, v. 20, n. 12, p. 3333-3340, 2005.

YOUNG, K. A.; STOUFFER, R. L. Gonadotropin and steroid regulation of matrix metalloproteinases and their endogenous tissue inhibitors in the developed corpus luteum of the rhesus monkey during the menstrual cycle. **Biol Reprod**, v. 70, n. 1, p. 244-252, 2004.

ZHENG, J.; FRICKE, P. M.; REYNOLDS, L. P.; REDMER, D. A. Evaluation of growth, cell proliferation, and cell death in bovine corpora lutea throughout the estrous cycle. **Biol Reprod**, v. 51, n. 4, p. 623-632, 1994.

ZIMMERMANN, R. C.; HARTMAN, T.; KAVIC, S.; PAULI, S. A.; BOHLEN, P.; SAUER, M. V.; KITAJEWSKI, J. Vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis is essential for gonadotropin-dependent follicle development. **J Clin Invest**, v. 112, n. 5, p. 659-669, 2003.

APÊNDICE A

APÊNDICE A

Tabela 1 - Genes aumentados (1,5 p≤0,0.5) nos animais estimulados em relação aos animais controle.

UniGene ID	Nome do gene	Símbolo	Vezes mudado	Valor de P
Bt.16350.2.A1_s_at	guanylate binding protein 5	GBP5	4.42	0.002
Bt.2498.2.A1_a_at	fibrinogen gamma chain	FGG	3.81	0.002
Bt.440.1.S1_at	neurotensin	NTS	3.74	0.036
Bt.27760.1.S1_at	major histocompatibility complex, class I, A /// major histocompatibility complex, class I, A	BoLA /// HLA-A	3.56	0.022
Bt.146.1.S1_at	defensin, beta 4A	DEFB4A	3.12	0.002
Bt.7165.1.S1_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 5	CXCL5	3.06	0.031
Bt.15731.1.A1_at	V-set and immunoglobulin domain containing 4	VSIG4	3.03	0.047
Bt.22869.1.S2_at	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)	FABP5	3.02	0.006
Bt.4604.1.S1_a_at	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 1	ACSM1	2.93	0.001
Bt.6406.1.S3_at	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	CEBPD	2.92	0.011
Bt.19845.2.A1_at	coagulation factor XIII, A1 polypeptide	F13A1	2.83	0.005
Bt.209.3.S1_at	lysozyme (renal amyloidosis)	LYZ	2.77	0.0003
Bt.15908.1.S1_at	methyltransferase like 7A	METTL7A	2.59	0.007
Bt.28383.1.S1_at	granulysin	GNLY	2.58	0.034
Bt.20455.1.S1_at	Microtubule-associated protein tau	MAPT	2.56	0.047
Bt.6556.1.S1_at	regakine 1	LOC504773	2.55	0.011
Bt.11259.1.S1_at	putative ISG12(a) protein	ISG12(A)	2.55	0.037
Bt.28243.1.S1_a_at	vanin 1	VNN1	2.54	0.008
Bt.405.1.S1_at	follistatin	FST	2.52	0.002
Bt.9510.2.A1_a_at	T-cell immunoglobulin and mucin domain containing 4	TIMD4	2.47	0.024
Bt.499.1.S1_a_at	prolactin receptor	PRLR	2.44	0.010
Bt.2712.1.S1_at	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 5	SERPINA5	2.43	0.00004
Bt.26875.1.A1_at	N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase-like 2	NAALADL2	2.43	0.018
Bt.19620.1.A1_at	interferon-induced protein 44	IFI44	2.41	0.004
Bt.2334.1.S1_at	CD68 molecule	CD68	2.34	0.004
Bt.14005.1.S1_at	CD53 molecule	CD53	2.32	0.005
Bt.15713.1.A1_at	pleckstrin	PLEK	2.31	0.016
Bt.8436.1.S1_at	interferon, alpha-inducible protein 6	IFI6	2.29	0.006
Bt.24012.1.A1_at	similar to guanylate binding protein 1	LOC511531	2.25	0.020
Bt.15731.1.A1_at	V-set and immunoglobulin domain containing 4	VSIG4	2.24	0.039
Bt.18219.1.A1_at	Hypothetical LOC784866	LOC784866	2.24	0.013
Bt.24813.1.A1_at	receptor (chemosensory) transporter protein 4	RTP4	2.22	0.002
Bt.20164.1.S1_at	complement component 1, q subcomponent, B chain	C1QB	2.22	0.006
Bt.28624.1.S1_at	Sterile alpha motif domain containing 9	SAMD9	2.19	0.007
Bt.21950.1.S1_s_at	chemokine (C-C motif) ligand 16	CCL16	2.18	0.007
Bt.4482.1.S1_at	macrophage scavenger receptor 1	MSR1	2.17	0.026
Bt.21576.1.S1_at	complement component 1, q subcomponent, C chain	C1QC	2.17	0.005
Bt.7204.1.S1_at	Fc fragment of IgG, low affinity IIIa, receptor (CD16a)	FCGR3	2.17	0.0001
Bt.1458.1.S1_at	phosphoglucomutase 5	PGM5	2.13	0.004
Bt.21759.1.S1_at	butyrobetaine (gamma), 2-oxoglutarate dioxygenase (gamma- butyrobetaine hydroxylase) 1	BBOX1	2.13	0.001

Bt.24467.1.S1_at	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	RSAD2	2.12	0.022
Bt.21284.2.S1_at	cysteine rich transmembrane BMP regulator 1 (chordin-like)	CRIM1	2.11	0.003
Bt.2294.1.S1_a_at	ubiquitin-like modifier activating enzyme 7	UBA7	2.10	0.002
Bt.20891.1.S1_at	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	OAS2	2.08	0.012
Bt.12694.1.S1_at	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	TNFRSF21	2.08	0.040
Bt.12304.1.S1_at	ISG15 ubiquitin-like modifier	ISG15	2.07	0.020
Bt.1577.1.S1_at	complement component 1, q subcomponent, A chain	C1QA	2.07	0.019
Bt.50.1.S1_at	CD8a molecule	CD8A	2.06	0.030
Bt.12805.1.S1_at	phospholipase B domain containing 1	PLBD1	2.02	0.010
Bt.10077.1.S2_at	interferon regulatory factor 1	IRF1	2.01	0.0003
Bt.21820.1.S1_at	similar to GTPase, IMAP family member 5	LOC530077	2.01	0.021
Bt.287.1.S1_at	ribonuclease, RNase A family, k6	RNASE6	2.00	0.047
Bt.13293.1.S1_at	CD48 molecule	CD48	1.99	0.005
Bt.26968.1.S1_at	plexin C1	PLXNC1	1.99	0.010
Bt.23278.1.S1_at	allograft inflammatory factor 1	AIF1	1.98	0.001
Bt.20790.1.S1_at	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	TNFSF10	1.97	0.019
Bt.1983.1.S1_at	egt-like module containing, mucin-like, hormone receptor- like 1	EMR1	1.97	0.003
Bt.21883.1.S1_at	placenta-specific 8	PLAC8	1.96	0.003
Bt.4675.1.S1_a_at	myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)	MX1	1.96	0.026
Bt.14853.1.A1_at	RAB3A interacting protein (rabin3)	RAB3IP	1.94	0.001
Bt.18672.1.A1_at	tRNA methyltransferase 12 homolog (S. cerevisiae)	TRMT12	1.94	0.005
Bt.1791.1.A1_at	neural proliferation, differentiation and control, 1	NPDC1	1.93	0.016
Bt.22270.1.S1_at	chromosome 10 open reading frame 38 ortholog	C13H10ORF38	1.92	0.028
Bt.350.1.S1_s_at	MHC class II antigen	BLA-DQB	1.92	0.040
Bt.26666.1.S1_at	ADP-ribosylation factor 5	ARF5	1.92	0.020
Bt.2520.1.S1_at	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 2	SPOCK2	1.91	0.012
Bt.3414.3.A1_a_at	ArfGAP with FG repeats 1	AGFG1	1.91	0.045
Bt.13315.1.S1_at	acyl-CoA synthetase family member 2	ACSF2	1.89	0.0001
Bt.6936.1.S1_at	chemokine (C-C motif) ligand 14	CCL14	1.89	0.005
Bt.26700.1.S1_at	histamine N-methyltransferase	HNMT	1.87	0.032
Bt.9211.1.S1_at	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1 interacting protein	APBB1IP	1.85	0.001
Bt.471.1.S1_at	thrombomodulin	THBD	1.85	0.001
Bt.24238.1.A1_at	macrophage expressed 1	MPEG1	1.85	0.016
Bt.22829.1.A1 at	deoxynucleotidyltransferase, terminal, interacting protein 2 /// glutamate-cysteine ligase, modifier subunit	DNTTIP2 /// GCLM	1.84	0.005
Bt.139.1.A1 at	ADAM metallopeptidase domain 2	ADAM2	1.84	0.004
Bt.9504.1.A1 at	chemokine (C-C motif) ligand 4	CCL4	1.83	0.049
Bt.13127.1.S1_at	angiopoietin 1	ANGPT1	1.83	0.009
- Bt 9786 1 S1 at	ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N- acetylgalactosaminide alpha-2 6-sialyltransferase 2	ST6GALNAC2	1.83	0.0003
Bt 24707 1 S1 at	CD86 molecule	CD86	1.82	0.019
Bt 6826 1 S1 at	lymphocyte cytosolic protein 2 (SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa)	LCP2	1.82	0.038
Bt 2942 1 S1 at	similar to KIA 40405	FLRT2	1.02	0.036
Bt 26636 1 S1_at	natural killer cell group 7 sequence	NKG7	1.02	0.020
Bt 23641 1 \$1 at	carbonic anhydrase XIII	CA13	1.01	0.004
D. 1417 1 0	integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4	THE	1.01	0.005
Bt.4615.1.S1_at	subunit)	ITGB2	1.80	0.009

Bt.25107.1.A1_at	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 5 similar to FF-hand calcium-binding domain-containing	FGD5	1.79	0.042
Bt.22465.1.S1_at	protein 4A	LOC615055	1.79	0.037
Bt.132.1.S1_at	defensin, beta 1	EBD	1.79	0.003
Bt.6151.1.S1_at	colony stimulating factor 1 receptor	CSF1R	1.78	0.034
Bt.9807.1.S1_at	glycoprotein (transmembrane) nmb	GPNMB	1.78	0.012
Bt.9662.1.S1_at	prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)	PTGER4	1.78	0.046
Bt.22491.1.A1_at	similar to NKp80 NK receptor	LOC618591	1.78	0.028
Bt.9974.1.S1_at	chemokine (C-C motif) ligand 3	CCL3	1.78	0.039
Bt.9215.1.A1_at	WW domain containing oxidoreductase	WWOX	1.77	0.035
Bt.21224.1.S1_at	dedicator of cytokinesis 10	DOCK10	1.76	0.004
Bt.12196.1.S1_at	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	PTPRC	1.76	0.044
Bt.20918.1.A1_at	phosphoinositide-3-kinase interacting protein 1	PIK3IP1	1.76	0.044
Bt.28439.1.S1_a_at	lymphocyte antigen 9	LY9	1.75	0.005
Bt.21131.1.A1_at	similar to transmembrane protein 166	LOC528994	1.75	0.023
Bt.18566.1.A1_at	similar to hCG27535	LOC539805	1.75	0.017
Bt.12500.2.S1_a_at	lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)	LCP1	1.75	0.035
Bt.2858.1.S1_at	abhydrolase domain containing 6	ABHD6	1.75	0.046
Bt.3115.1.A1_at	aspartylglucosaminidase	AGA	1.75	0.005
Bt.5092.2.A1_at	histone deacetylase 6	HDAC6	1.74	0.021
Bt.6963.1.A1_at	ecotropic viral integration site 2B	EVI2B	1.74	0.006
Bt.4147.1.S1_at	phosphodiesterase 6A, cGMP-specific, rod, alpha	PDE6A	1.73	0.025
Bt.22576.1.A1_at	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3D	PPP1R3D	1.72	0.020
Bt.22050.1.S1_at	hemopoietic cell kinase	НСК	1.72	0.010
Bt.23559.1.S1_at	thiamin pyrophosphokinase 1	TPK1	1.72	0.023
Bt.6387.1.A1_at	carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 7	CHST7	1.72	0.007
Bt.2818.2.S1_a_at	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 2	NUDT2	1.72	0.003
Bt.6980.1.S1_at	SLAM family member 7	SLAMF7	1.72	0.014
Bt.20054.1.S1_at	interferon regulatory factor 9	IRF9	1.72	0.005
Bt.10001.1.A1_at	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 14	SLC39A14	1.71	0.001
Bt.16234.2.S1_at	splicing factor, arginine/serine-rich 18	SFRS18	1.71	0.020
Bt.19521.1.A1_at	alcohol dehydrogenase 4 (class II), pi polypeptide	ADH4	1.71	0.031
Bt.13134.1.S1_at	jun oncogene	JUN	1.71	0.017
Bt.19028.1.A1_at	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 6	TRPC6	1.71	0.042
Bt.5493.1.S1_at	S100 calcium binding protein A4	S100A4	1.70	0.047
Bt.11057.1.S1_at	shisa homolog 3 (Xenopus laevis)	SHISA3	1.70	0.007
Bt.12745.3.S1_at	phospholipase A2, group IB (pancreas)	PLA2G1B	1.70	0.046
Bt.2047.1.S1_at	adrenomedullin	ADM	1.69	0.024
Bt.13428.2.S1_at	fructose-1,6-bisphosphatase 1	FBP1	1.69	0.026
Bt 7214.1.\$1. a. at	collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen) binding	COL443RP	1 60	0.00003
Bt 4107.1 S1_at	desmocollin 2	DSC2	1.69	0.036
Bt 7264 1 \$1 at	cathensin F	CTSF	1.09	0.050
Di. / 207.1.01_at	pancreatic progenitor cell differentiation and proliferation		1.00	0.002
Bt.23173.1.S1_at	factor	PPDPF	1.68	0.002
Bt.4153.1.S1_at	dual specificity phosphatase 12	DUSP12	1.68	0.0002
Bt.6406.1.S3_at	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	CEBPD	1.68	0.010
Bt.25039.1.S1_at	hypothetical protein LOC100302527	LOC100302527	1.67	0.023

Bt.1377.1.S1_at	chemokine (C-C motif) receptor 1	CCR1	1.67	0.035
Bt.28288.1.S1_at	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1	DNAJB1	1.67	0.033
Bt.7013.1.S1_at	similar to Interleukin-32 precursor (IL-32) (Natural killer cells protein 4) (Tumor necrosis factor alpha-inducing factor) solute agric family 7 (actionic agrino agrid tengenetor y)	LOC505800	1.67	0.002
Bt.6009.1.S1_at	system), member 7	SLC7A7	1.67	0.039
Bt.27830.1.A1_at	SP140 nuclear body protein	SP140	1.66	0.0002
Bt.25887.1.A1_at	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase	UGCG	1.65	0.016
Bt.17766.1.S1_at	chromosome 3 open reading frame 23 ortholog	C22H3ORF23	1.65	0.007
Bt.1151.1.S1_at	cellular retinoic acid binding protein 2	CRABP2	1.65	0.030
Bt.8939.1.S1_at	TYRO protein tyrosine kinase binding protein	TYROBP	1.65	0.047
Bt.14207.1.S1_at	glycine C-acetyltransferase	GCAT	1.65	0.008
Bt.27073.1.S1_at	acyl-CoA dehydrogenase, long chain	ACADL	1.64	0.017
Bt.24098.1.A1_at	interferon induced with helicase C domain 1	IFIH1	1.64	0.019
Bt.17380.1.S1_at	transmembrane protein 205	TMEM205	1.64	0.029
Bt.7873.1.S1_at	basal cell adhesion molecule (Lutheran blood group)	BCAM	1.64	0.013
Bt.26654.1.S1_at	forkhead-associated (FHA) phosphopeptide binding domain 1	FHAD1	1.64	0.011
Bt.5343.1.A1_at	CD300 molecule-like family member g major histocompatibility complex, class II, DM beta-chain,	CD300LG	1.64	0.001
Bt.1007.1.S1_at	expressed	BOLA-DMB	1.64	0.012
Bt.6963.1.A1_at	ecotropic viral integration site 2B	EVI2B	1.64	0.008
Bt.3862.1.S1_a_at	peroxisome proliferator-activated receptor gamma	PPARG	1.64	0.015
Bt.21997.2.A1_at	protein phosphatase, Mg2+/Mn2+ dependent, 1K	PPM1K	1.63	0.007
Bt.18251.2.A1_at	similar to BMP-2-inducible protein kinase (BIKe)	LOC505766	1.63	0.034
Bt.1607.1.S1_at	unc-51-like kinase 1 (C. elegans)	ULK1	1.63	0.012
Bt.20883.1.S1_at	angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5	ANG	1.63	0.012
Bt.15615.1.S1_at	NLR family, CARD domain containing 5	NLRC5	1.63	0.037
Bt.5326.2.S1_at	BTG family, member 2	BTG2	1.63	0.038
Bt.26426.1.A1_at	RNA binding motif protein 43 ficolin (collagen/fibrinogen domain containing lectin) 2	RBM43	1.63	0.027
Bt.3046.2.S1_at	(hucolin)	FCN2	1.63	0.037
Bt.14029.1.S1_at	chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 2	CSGALNACT2	1.63	0.021
Bt.16678.1.S1_at	brain expressed X-linked 2 ankyrin repeat, SAM and basic leucine zipper domain	BEX2	1.63	0.022
Bt.9563.1.S1_at	containing 1	ASZ1	1.62	0.045
Bt.25537.1.A1_at	UDP-glucuronate decarboxylase 1	UXS1	1.62	0.009
Bt.13198.1.S1_at	signal-regulatory protein alpha	SIRPA	1.61	0.018
Bt.1165.1.S1_at	adenylate cyclase 7	ADCY7	1.61	0.007
Bt.26060.1.A1_at	Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase	BTK	1.61	0.012
Bt.14035.1.S1_at	protein kinase C, beta	PRKCB	1.61	0.013
Bt.8915.1.A1_at	dehydrogenase E1 and transketolase domain containing 1	DHTKD1	1.60	0.029
Bt.27943.1.S1_at	signal transducer and activator of transcription 2, 113kDa	STAT2	1.60	0.015
Bt.28865.1.A1_at	ribosomal protein S8	RPS8	1.60	0.014
Bt.16001.1.S1_at	cytochrome P450, family 27, subfamily A, polypeptide 1	CYP27A1	1.60	0.012
Bt.20091.1.S1_at	transcription factor 20 (AR1)	TCF20	1.60	0.024
Bt.13934.1.S1_at	CD3g molecule, gamma (CD3-TCR complex)	CD3G	1.60	0.049
Bt.28908.1.A1_at	similar to guanylate binding protein 4	LOC507055	1.60	0.050
Bt.6434.1.S1_at	ring finger protein 149 IMP2 inner mitochondrial membrane peptidase-like (S	RNF149	1.60	0.011
Bt.28490.1.S1_at	cerevisiae)	IMMP2L	1.59	0.024
Bt.24623.1.A1_at	erythrocyte membrane protein band 4.1 like 4A	EPB41L4A	1.59	0.038

Bt.26983.1.S1_at	caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)	CASP1	1.59	0.007
Bt.25030.1.A1_a_at	transmembrane 9 superfamily member 2	TM9SF2	1.59	0.030
Bt.25111.1.A1_at	Similar to interferon-induced protein 44-like	LOC508347	1.59	0.010
Bt.25039.1.S1_at	hypothetical protein LOC100302527	LOC100302527	1.59	0.018
Bt.21431.1.S1_at	lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)	LTB	1.59	0.042
Bt.19514.1.A1_at	hypothetical protein LOC100140616	LOC100140616	1.59	0.005
Bt.4049.1.S1_at	armadillo repeat containing, X-linked 6	ARMCX6	1.59	0.009
Bt.5259.1.S1_at	XIAP associated factor 1	XAF1	1.58	0.025
Bt.16068.1.A1_at	Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit	GCLC	1.58	0.033
Bt.16857.1.A1_at	fragile histidine triad gene	FHIT	1.58	0.018
Bt.16632.1.A1_at	hypothetical LOC613276	LOC613276	1.58	0.010
Bt.7632.1.S1_a_at	NCK-associated protein 1-like	NCKAP1L	1.58	0.027
Bt.4293.1.S1_at	intercellular adhesion molecule 3	ICAM3	1.58	0.031
Bt.12964.1.A1_at	Glycoprotein M6B spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration	GPM6B	1.58	0.010
Bt.17571.1.A1_at	oncogene spi1	SPI1	1.57	0.032
Bt.2657.1.S1_a_at	fermitin family homolog 3 (Drosophila)	FERMT3	1.57	0.010
Bt.351.1.S1_at	coronin, actin binding protein, 1A	CORO1A	1.57	0.039
Bt.23276.2.S1_at	similar to Absent in melanoma 1 protein	LOC526200	1.57	0.050
Bt.21154.2.S1_at	serine/threonine kinase 4	STK4	1.57	0.010
Bt.9349.1.S1_at	similar to coagulation factor VIII-associated protein	LOC617475	1.57	0.034
Bt.7393.1.S1_at	Nephronectin	NPNT	1.57	0.022
Bt.22179.1.S1_at	similar to basement membrane-induced gene	LOC507126	1.57	0.014
Bt.13769.1.S1_at	Microtubule-associated protein 2	MAP2	1.57	0.034
Bt.12849.2.S1_at	solute carrier organic anion transporter family, member 2B1	SLCO2B1	1.57	0.030
Bt.18203.1.A1_at	junctional adhesion molecule 2	JAM2	1.56	0.001
Bt.143.1.S1_at	neutrophil cytosolic factor 2	NCF2	1.56	0.031
Bt.8803.1.A1_at	complement component 1, r subcomponent	C1R	1.56	0.036
Bt.13493.1.A1_at	homolog, Drosophila)	CELSR2	1.56	0.013
Bt.1275.1.S1_at	similar to fractalkine dapper, antagonist of beta-catenin, homolog 1 (Xenopus	LOC517354	1.56	0.005
Bt.2726.2.S1_at	laevis)	DACT1	1.56	0.044
Bt.5392.1.S1_at	CD36 molecule (thrombospondin receptor)	CD36	1.56	0.002
Bt.7938.1.S1_at	cathepsin S	CTSS	1.56	0.012
Bt.13113.1.S1_at	L-gulono-gamma-lactone oxidase	GULO	1.55	0.032
Bt.23233.2.S1_at	ubiquitin specific peptidase 18	USP18	1.55	0.014
Bt.22739.2.S1_at	suppressor of cytokine signaling 4	SOCS4	1.55	0.006
Bt.13959.1.S1_at	protein kinase C, epsilon	PRKCE	1.55	0.044
Bt.21732.1.S1_at	ribonuclease T2	RNASET2	1.55	0.047
Bt.16180.1.S1_at	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 11	PARP11	1.55	0.030
Bt.21897.1.S1_at	ring finger protein 217 Chronic lymphocytic leukemia deletion region gene 6 protein	RNF217	1.55	0.043
Bt.20762.2.S1_at	homolog	CLLD6	1.55	0.012
Bt.4622.1.S1_at	mannosidase, alpha, class 2B, member 1	MAN2B1	1.54	0.001
Bt.16983.1.S1_at	TRIM6-TRIM34 readthrough	TRIM6-TRIM34	1.54	0.024
Bt.18219.1.A1_at	Hypothetical LOC784866	LOC784866	1.54	0.009
Bt.17110.2.A1_at	flavin containing monooxygenase 5	FMO5	1.54	0.014
Bt.21147.2.S1_a_at	hypothetical protein LOC507810	LOC507810	1.54	0.009

Bt.2905.1.S1_at	NDRG family member 2	NDRG2	1.54	0.001
Bt.23488.1.S1_at	complement factor properdin	CFP	1.54	0.043
Bt.8945.1.S1_at	toll-like receptor 2	TLR2	1.54	0.035
Bt.8804.1.S1_at	NEL-like 2 (chicken)	NELL2	1.53	0.001
Bt.6438.1.A1_at	transforming growth factor, beta 2	TGFB2	1.52	0.032
Bt.196.1.S1_at	8KDa amlexanox-binding protein	S100A13	1.52	0.008
Bt.1616.1.A1_at	superoxide dismutase 3, extracellular	SOD3	1.52	0.039
Bt.9444.1.S1_at	serine/threonine kinase 17a	STK17A	1.52	0.048
Bt.4544.1.S1_at	integrin, alpha 6	ITGA6	1.52	0.040
Bt.24069.1.A1_at	C-type lectin domain family 2, member D	CLEC2D	1.52	0.004
Bt.12743.1.A1_at	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 4	ABCD4	1.52	0.011
Bt.27364.1.S1_at	platelet-activating factor receptor	PTAFR	1.52	0.023
Bt.1585.1.A1_at	hypothetical protein LOC534992 ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small	C2orf43	1.51	0.006
Bt.4946.1.S1_at	GTP binding protein Rac2)	RAC2	1.51	0.034
Bt.18440.2.S1_at	similar to guanylate binding protein 4 CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II	LOC510382	1.51	0.023
Bt.23174.1.S1_at	invariant chain	CD74	1.51	0.020
Bt.14166.2.S1_at	transmembrane protein 150C	TMEM150C	1.51	0.0004
Bt.9350.1.A1_at	ganglioside-induced differentiation-associated protein 1	GDAP1	1.50	0.023
Bt.29873.1.S1_at	mesoderm specific transcript homolog (mouse)	MEST	1.50	0.024
Bt.20600.2.A1_a_at	MYC induced nuclear antigen	MINA	1.50	0.019
Bt.20409.1.S1_at	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9	PARP9	1.50	0.005
Bt.26905.1.A1_at	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3B	PPP1R3B	1.50	0.001
Bt.1539.1.S1_at	GM2 ganglioside activator	GM2A	1.50	0.024
Bt.13486.1.A1_at	glycine dehydrogenase (decarboxylating)	GLDC	1.50	0.040

UniGene ID	Nome do Genes	Símbolo	Vezes mudado	Valor de P
Bt.4404.1.A1_at	protease, serine, 2 (trypsin 2)	PRSS2	-11.60	0.0000001
Bt.27140.1.S1_at	similar to mKIAA1077 protein	LOC535166	-5.64	0.0002
Bt.16201.1.S1_at	S100 calcium binding protein A9	S100A9	-4.65	0.0013
Bt.396.2.S1_a_at	cellular retinoic acid binding protein 1	CRABP1	-4.50	0.03
Bt.23042.1.S1_at	metallothionein 1E	MT1A	-4.23	0.01
Bt.3000.2.S1_a_at	microtubule-associated protein 1 light chain 3 gamma	MAP1LC3C	-4.16	0.04
Bt.27963.1.A1_at	neutral cholesterol ester hydrolase 1	NCEH1	-3.93	0.0009
Bt.17990.1.A1_at	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)- type motif 11	NUDT11	-3.32	0.01
Bt.9360.1.S1_at	S100 calcium binding protein A8	S100A8	-3.19	0.0042
Bt.27140.1.S1_at	similar to mKIAA1077 protein	LOC535166	-3.15	0.0003
Bt.14200.1.A1_at	metallothionein 1E	MT1E	-3.10	0.02
Bt.22389.1.S1_at	shisa homolog 2 (Xenopus laevis)	SHISA2	-2.47	0.04
Bt.8953.1.S1_at	prostaglandin E synthase	PTGES	-2.40	0.03
Bt.10823.1.A1_s_at	hydrolethalus syndrome 1	HYLS1	-2.33	0.0029
Bt.17990.1.A1_at	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)- type motif 11	NUDT11	-2.29	0.01
Bt.10144.1.A1_s_at	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1	TIAM1	-2.27	0.0004
Bt.4714.1.S1_at	matrix metallopeptidase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	MMP9	-2.26	0.00003
Bt.546.1.S1_at	channel, subfamily M, alpha member 1	KCNMA1	-2.15	0.01
Bt.25744.1.A1_at	solute carrier family 38, member 11	SLC38A11	-2.09	0.0023
Bt.29009.1.A1_at	ryanodine receptor 3	RYR3	-2.06	0.02
Bt.26100.2.A1_at	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 1	GDPD1	-2.02	0.02
Bt.13482.1.S1_at	nephroblastoma overexpressed	NOV	-2.01	0.01
Bt.16201.2.A1_at	S100 calcium binding protein A9	S100A9	-1.99	0.01
Bt.29619.1.A1_at	chromosome 6 open reading frame 141 ortholog	C23H6orf141	-1.99	0.01
Bt.8479.1.A1_at	nitric oxide synthase 2, inducible	NOS2	-1.96	0.01
Bt.28456.1.S1_at	similar to alpha-tubulin	LOC407195	-1.95	0.01
Bt.29009.1.A1_at	ryanodine receptor 3	RYR3	-1.95	0.01
Bt.4224.1.S1_at	adenylate kinase 1	AK1	-1.94	0.01
Bt.21079.1.A1_at	similar to solute carrier family 35, member F2	LOC782215	-1.93	0.02
Bt.11420.1.A1_at	prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide III	P4HA3	-1.91	0.0017
Bt.27866.1.A1_at	myo-inositol oxygenase	MIOX	-1.89	0.01
Bt.19093.1.S1_at	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2 Platelet-derived growth factor recentor, alpha	ALDH1A2	-1.89	0.03
Bt.9423.1.S1_at	polypeptide	PDGFRA	-1.88	0.05
Bt.23294.1.A1_at	PDZ and LIM domain 3	PDLIM3	-1.86	0.02
Bt.5247.1.S1_at	prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase	PTGIS	-1.85	0.0013
Bt.28456.1.S1_at	similar to alpha-tubulin	LOC407195	-1.83	0.01
Bt.9379.1.S1_at	monoamine oxidase A	MAOA	-1.82	0.02
Bt.2568.1.S1_at	perilipin 2	PLIN2	-1.82	0.01
Bt.12297.1.S1_at	lysyl oxidase-like 4	LOXL4	-1.82	0.01
Bt.10398.1.S1_at	pentraxin 3, long	PTX3	-1.81	0.03
Bt.3580.2.S1_at	phosphandylinositol glycan anchor biosynthesis, class K	PIGK	-1.81	0.0004

Tabela 3- Genes diminuídos (1,5 p≤0,0.5) nos animais estimulados em relação aos animais controle.

Bt.3226.1.S1_at	heme oxygenase (decycling) 2	HMOX2	-1.78	0.0
Bt.22496.1.S1_at	carbonyl reductase 3	CBR3	-1.77	0.0
Bt.18228.2.S1_a_at	Sec61 alpha 2 subunit (S. cerevisiae)	SEC61A2	-1.77	0.0024
Bt.5268.1.S1_at	follistatin-like 3 (secreted glycoprotein)	FSTL3	-1.77	0.0003
Bt.26741.1.S1_at	NIF3 NGG1 interacting factor 3-like 1 (S. pombe) ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase	NIF3L1	-1.77	0.03
Bt.13899.1.A1_at	1	ENPP1	-1.76	0.04
Bt.16830.1.S1_at	leucine zipper, down-regulated in cancer 1	LDOC1	-1.76	0.0
Bt.12294.2.A1_at	Adhesion molecule with Ig-like domain 2 transmembrane emp24 protein transport domain	AMIGO2	-1.75	0.02
Bt.628.1.S1_at	containing 6 RNA pseudouridylate synthase domain containing	TMED6	-1.74	0.000
Bt.23235.1.81_at	3 apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic	RPUSD3	-1.73	0.000
Bt.9267.1.A1_at	polypeptide-like 3B	APOBEC3B	-1.72	0.0
Bt.20343.1.S1_at	unc-13 homolog D (C. elegans)	UNC13D	-1.68	0.0
Bt.8624.1.S1_at	arginase, type II	ARG2	-1.68	0.003
Bt.26309.1.A1_at	sorting nexin 31	SNX31	-1.67	0.0
Bt.19482.1.A1_at	transferrin receptor (p90, CD71)	TFRC	-1.67	0.0
Bt.8109.2.A1_at	sushi-repeat-containing protein, X-linked 2	SRPX2	-1.67	0.0
Bt.3870.1.S1_at	Tubulin tyrosine ligase-like family, member 3	TTLL3	-1.67	0.0
Bt.4078.2.S1_a_at	reticulocalbin 3, EF-hand calcium binding domain	RCN3	-1.67	0.002
Bt.24842.1.A1_at	RAS-like, estrogen-regulated, growth inhibitor	RERG	-1.66	0.0
Bt.4865.1.S1_at	elastin microfibril interfacer 1	EMILIN1	-1.66	0.0
Bt.19643.2.S1_at	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 4 similar to RIKEN cDNA 4930519N13 /// similar to KIA 40980 protein /// similar to KIA 40980 protein	KCNMB4 LOC513940 /// LOC783633 /// LOC785425 ///	-1.66	0.0
Bt.27546.1.S1_at	/// similar to RIKEN cDNA 4930519N13	LOC787322	-1.66	0.002
Bt.28556.1.S1_at	adenosine deaminase-like	ADAL	-1.65	0.0
Bt.4510.1.S1_at	polyamine-modulated factor 1	PMF1	-1.65	0.0
Bt.6658.2.A1_at	family with sequence similarity 46, member B	FAM46B	-1.64	0.0
Bt.19585.2.S1_at	62kDa	GTF2H1	-1.63	0.0
Bt.15740.1.A1_at	tumor protein D52-like 1	TPD52L1	-1.63	0.0
Bt.9777.1.S1_at	3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 1 nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-	BDH1	-1.63	0.0
Bt.24396.3.A1_at	type motif 10	NUDT10	-1.62	0.000
Bt.20530.1.S1_at	NmrA-like family domain containing 1 core 1 synthase, glycoprotein-N-	NMRAL1	-1.62	0.0
Bt.22740.1.A1_at	acetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransferase, 1	C1GALT1	-1.61	0.0
Bt.2519.1.S1_at	plasminogen activator, urokinase similar to Phosphatidylinositol glycan anchor	PLAU	-1.61	0.0
Bt.3580.1.A1_at	biosynthesis, class K	LOC782466	-1.61	0.000
Bt.19681.1.A1_at	Similar to Uncharacterized protein KIAA0802	LOC538547	-1.61	0.0
Bt.13996.3.A1_at	phospholipase D1, phosphatidylcholine-specific v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral	PLD1	-1.60	0.0
Bt.27675.1.A1_at	oncogene homolog	KIT	-1.60	0.0
Bt.23966.1.A1_at	hydroxyacid oxidase 2 (long chain)	HAO2	-1.59	0.0
Bt.24790.1.A1_at	protein tyrosine phosphatase, receptor type, G	PTPRG	-1.59	0.0
Bt.1804.1.S1_at	GINS complex subunit 4 (Sld5 homolog)	GINS4	-1.59	0.0
Bt.16230.1.S1_at	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1 ASE1 anti-silencing function 1 homelog B (S	CAMK2N1	-1.59	0.0
Bt.23658.2.S1_at	cerevisiae)	ASF1B	-1.58	0.0
Bt 28194 1 S1 at	glutathione S-transferase omega 1	GSTO1	-1.58	0.002

Bt.2159.1.S1_at	transmembrane protein 45A	TMEM45A	-1.57	0.03
Bt.23619.1.S1_a_at	RAB GTPase activating protein 1-like	RABGAP1L	-1.57	0.03
Bt.20420.1.S1_at	CDK4) UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide	CDKN2C	-1.57	0.0016
Bt.24504.1.A1_at	N-acetylgalactosaminyltransferase 12 (GalNAc- T12)	GALNT12	-1.57	0.0044
Bt.4912.1.S1_at	peptidase inhibitor 16	PI16	-1.57	0.04
Bt.12685.1.S1_at	myosin, heavy chain 11, smooth muscle	MYH11	-1.57	0.02
Bt.18626.1.A1_at	RAB, member RAS oncogene family-like 5	RABL5	-1.57	0.02
Bt.1745.1.S1_at	keratin 18	KRT18	-1.56	0.05
Bt.3580.2.S1_at	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class K	PIGK	-1.56	0.0006
Bt.13027.1.A1_at	hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1	HSD11B1	-1.56	0.01
Bt.12462.1.S1_at	lipolysis stimulated lipoprotein receptor	LSR	-1.56	0.0015
Bt.1953.1.S1_at	microtubule-associated protein 1A	MAP1A	-1.55	0.04
Bt.18080.3.A1_at	similar to tescalcin	LOC787094	-1.55	0.04
Bt.2179.1.S1_a_at	sal-like 2 (Drosophila)	SALL2	-1.54	0.0030
Bt.6803.1.A1_at	TRAF2 and NCK interacting kinase	TNIK	-1.54	0.05
Bt.10816.1.S1_s_at	centromere protein N	CENPN	-1.54	0.05
Bt.23399.1.S1_at	pyruvate kinase, muscle	PKM2	-1.54	0.03
Bt.22094.1.A1_at	interleukin 33	IL33	-1.54	0.03
Bt.805.1.S1_at	adiponectin receptor 2	ADIPOR2	-1.54	0.04
Bt.27316.2.A1_at	retinoblastoma binding protein 8	RBBP8	-1.54	0.01
Bt.20510.1.S1_at	FXYD domain containing ion transport regulator 1	FXYD1	-1.53	0.03
Bt.6603.1.A1_at	RAB32, member RAS oncogene family pleckstrin homology-like domain, family A.	RAB32	-1.53	0.05
Bt.1702.1.A1_at	member 2	PHLDA2	-1.53	0.04
Bt.10855.1.S1_at	regulator of G-protein signaling 2, 24kDa nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with	RGS2	-1.53	0.02
Bt.1185.2.S1_at	CARD domain)	NOL3	-1.53	0.01
Bt.5626.3.S1_at	kinesin light chain 1	KLC1	-1.52	0.04
Bt.6527.1.S1_at	lymphoid enhancer-binding factor 1	LEF1	-1.52	0.02
Bt.3996.1.S1_at	multiple EGF-like-domains 10	MEGF10	-1.52	0.01
Bt.21924.1.A1_at	uronyl-2-sulfotransferase	UST	-1.52	0.01
Bt.12010.2.S1_at	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 1 similar to Class B basic belix-loop-belix protein 5	ADAMTS1	-1.52	0.05
Bt.24801.1.A1_at	(bHLHB5) (Protein BETA3)	LOC525275	-1.52	0.05
Bt.4995.1.A1_at	Anillin, actin binding protein	ANLN	-1.51	0.05
Bt.28582.1.S1_s_at	activating signal cointegrator 1 complex subunit 1	ASCC1	-1.51	0.02
Bt.18101.1.A1_at	olfactomedin 1	OLFM1	-1.51	0.03
Bt.27549.1.A1_at	tudor domain containing 6	TDRD6	-1.51	0.03
Bt.25788.1.S1_at	zinc finger and BTB domain containing 16	ZBTB16	-1.51	0.02
Bt.26343.1.S1_at	microsomal triglyceride transfer protein	MTTP	-1.51	0.03
Bt.26730.1.S1_at	torsin A interacting protein 2	TOR1AIP2	-1.50	0.01
Bt.22545.2.S1_at	fibulin 1	FBLN1	-1.50	0.0038

UniGene ID	Nome do Genes	Símbolo	Vezes mudado	Valor de P
Bt.3805.1.S1_at	MHC class I antigen /// MHC Class I JSP.1	BOLA-N	7.06	0.04
Bt.15528.1.S1_at	Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)	MIF	6.16	0.04
Bt.12930.1.S1_a_at	Tachykinin, precursor 1	TAC1	5.27	0.03
Bt.7165.1.S1_at	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5	CXCL5	4.52	0.04
Bt.440.1.S1_at	Neurotensin	NTS	4.10	0.04
Bt.4594.1.S1_at	MHC class II antigen	BLA-DQB	4.06	0.01
Bt.17599.1.A1_at	Cadherin 8, type 2	CDH8	3.35	0.03
Bt.8967.1.S1_at	Myostatin	MSTN	2.93	0.01
Bt.21131.1.A1_at	Similar to transmembrane protein 166	LOC528994	2.78	0.001
Bt.5273.1.S1_at	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	ITGAV	2.70	0.02
Bt.5935.2.S1_a_at	Lysosomal protein transmembrane 4 alpha	LAPTM4A	2.56	0.002
Bt.13789.1.A1_at	CD14 molecule	CD14	2.56	0.05
Bt.4751.1.S1_a_at	Major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 2	BOLA-DQA2	2.53	0.01
Bt.209.3.S1_at	Lysozyme (renal amyloidosis)	LYZ	2.39	0.004
Bt.19845.2.A1_at	Coagulation factor XIII, A1 polypeptide	F13A1	2.36	0.01
Bt.23093.1.S1_at	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	CXCL2	2.36	0.004
Bt.12295.1.S1_at	Podoplanin	PDPN	2.35	0.001
Bt.22045.1.S1_at	Six transmembrane epithelial antigen of the prostate 2	STEAP2	2.34	0.01
Bt.29403.1.S1_at	Trefoil factor 2	TFF2	2.31	0.004
Bt.5494.1.S1_at	CD44 molecule (Indian blood group)	CD44	2.18	0.02
Bt.4679.1.S1_at	Fc fragment of igg, low affinity iib, receptor (CD32)	FCGR2	2.13	0.02
Bt.8945.1.S1_at	Toll-like receptor 2	TLR2	2.12	0.03
Bt.22869.1.S2_at	Fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)	FABP5	2.05	0.01
Bt.26700.1.S1_at	Histamine N-methyltransferase	HNMT	2.05	0.01
Bt.367.1.S1_at	Survival motor neuron	OLR1	2.05	0.05
Bt.471.1.S1_at	Thrombomodulin	THBD	2.00	0.02
Bt.6406.1.S3_at	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	CEBPD	2.00	0.003
Bt.24592.1.S1_at	Neuritin 1	NRN1	1.94	0.01
Bt.19028.1.A1_at	Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 6	TRPC6	1.93	0.01
Bt.9559.2.S1_at	Amyloid beta (A4) precursor protein	APP	1.93	0.03
Bt.21950.1.S1_at	Chemokine (C-C motif) ligand 16	CCL16	1.93	0.03
Bt.3885.4.S1_x_at	Chloride channel accessory 3 (pseudogene)	CLCA3P	1.92	0.01
Bt.12805.1.S1_at	Phospholipase B domain containing 1	PLBD1	1.91	0.02
Bt.9510.2.A1_a_at	T-cell immunoglobulin and mucin domain containing 4	TIMD4	1.91	0.03
Bt.19514.1.A1_at	Hypothetical protein LOC100140616	LOC100140616	1.88	0.03
Bt.23278.1.S1_at	Allograft inflammatory factor 1	AIF1	1.87	0.002
Bt.3885.4.S1_a_at	Chloride channel accessory 3 (pseudogene) /// similar to calcium- activated chloride channel	CLCA3P /// LOC784768	1.87	0.01
Bt.146.1.S1_at	Defensin, beta 4A	DEFB4A	1.86	0.02
Bt.2334.1.S1_at	CD68 molecule	CD68	1.86	0.02
Bt.20639.1.A1_at	PHD finger protein 3 Aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase-phosphopantetheinyl	PHF3	1.84	0.03
Bt.9821.1.S1_at	transferase	AASDHPPT	1.83	0.004
Bt.6731.1.S1_at	Chromosome 1 open reading frame 54 ortholog	C3H1orf54	1.82	0.03

Tabela 3 - Genes aumentados (1,5 p \leq 0,0.5) nos animais superovulados.

Bt.26666.1.S1_at	ADP-ribosylation factor 5	ARF5	1.82	0.05
Bt.9350.1.A1_at	Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1	GDAP1	1.78	0.01
Bt.21224.1.S1_at	Dedicator of cytokinesis 10	DOCK10	1.78	0.001
Bt.20248.1.S1_at	Ribonuclease H2, subunit A	RNASEH2A	1.78	0.01
Bt.15808.1.S1_at	Membrane-associated ring finger (C3HC4) 3	MARCH3	1.77	0.02
Bt.13484.1.A1_at	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3C	PPP1R3C	1.76	0.01
Bt.22512.2.S1_at	Kelch-like 5 (Drosophila)	KLHL5	1.76	0.02
Bt.25537.1.A1_at	UDP-glucuronate decarboxylase 1	UXS1	1.76	0.03
Bt.27339.1.A1_at	Membrane metallo-endopeptidase	MME	1.76	0.02
Bt.27887.1.S1_at	Yippee-like 2 (Drosophila)	YPEL2	1.76	0.04
Bt.15979.1.S1_at	Survival motor neuron	SMN1	1.74	0.01
Bt.9807.1.S1_at	Glycoprotein (transmembrane) nmb	GPNMB	1.70	0.01
3t.5598.1.S1_at	Chromosome 8 open reading frame 4 ortholog	C27H8orf4	1.70	0.02
Bt.27929.1.S1_at	WD repeat and FYVE domain containing 1	WDFY1	1.70	0.04
Bt.24238.1.A1_at	Macrophage expressed 1	MPEG1	1.69	0.003
Bt.13293.1.S1_at	CD48 molecule	CD48	1.69	0.01
Bt.22081.1.S1_at	LIM domain 7	LMO7	1.68	0.03
Bt.18533.1.S1_at	Activating transcription factor 3	ATF3	1.68	0.001
Bt.8939.1.S1_at	TYRO protein tyrosine kinase binding protein	TYROBP	1.68	0.03
Bt.5858.1.S1_at	P21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1	PAK1	1.67	0.01
Bt.6795.1.S1_at	Actin related protein 2/3 complex, subunit 3, 21kda	ARPC3	1.67	0.01
Bt.4110.1.S1_at	Histamine receptor H1	HRH1	1.67	0.003
Bt.4635.1.S1_at	Calponin 2	CNN2	1.65	0.03
3t.26635.1.S1_at	Frizzled homolog 1 (Drosophila)	FZD1	1.65	0.01
St.619.2.A1 at	Similar to 65 kda Yes-associated protein (YAP65) /// Yes-associated protein 1	LOC787360 /// YAP1	1.65	0.02
0.0007.1.51	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells	NEVDIA	1.64	0.02
st.9027.1.S1_at	innibitor, aipna	NFKBIA	1.64	0.03
3t.22050.1.S1_at	Hemopoletic cell kinase	HCK	1.64	0.02
Bt.2/26.2.S1_at	Dapper, antagonist of beta-catenin, homolog I (Xenopus laevis)	DACTI	1.63	0.04
Bt.2629.1.S1_at	Renin binding protein	RENBP	1.63	0.05
Bt.24707.1.S1_at	CD86 molecule	CD86	1.62	0.05
Bt.6208.1.A1_at	Component of oligometric golgi complex 5	COGS	1.62	0.01
Bt.4989.1.S1_at	Tuftelin 1	TUFT1	1.62	0.002
Bt.24824.1.S1_at	Glycosyltransferase 8 domain containing 2	GLT8D2	1.61	0.04
Bt.685.1.A1_at	Asparaginase like 1	ASRGL1	1.61	0.05
Bt.28288.1.S1_at	Dnaj (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1	DNAJB1	1.61	0.05
Bt.25087.3.S1_at	Ras homolog gene family, member Q	RHOQ	1.60	0.01
Bt.16730.1.A1_at	Solute carrier family 41, member 2	SLC41A2	1.60	0.001
Bt.14143.1.S1_at	Carboxypeptidase E	CPE	1.60	0.004
Bt.196.1.S1_at	8kda amlexanox-binding protein	S100A13	1.59	0.03
Bt.22042.1.S1_at	Transmembrane protein 30B	TMEM30B	1.58	0.05
Bt.4279.2.S1_at	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1	SHC1	1.58	0.001
Bt.6387.1.A1_at	Carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 7	CHST7	1.58	0.01
Bt.27920.1.A1_at	Hematopoietically expressed homeobox	HHEX	1.57	0.02
Bt.3414.3.A1_a_at	Arfgap with FG repeats 1	AGFG1	1.56	0.02
Bt.11428.1.A1_at	Chromosome 21 open reading frame 7 ortholog	C1H21ORF7	1.56	0.03

Bt.6047.1.S1_at	Cysteine and glycine-rich protein 1	CSRP1	1.56	0.01
Bt.23493.1.S1_at	Thrombospondin 1	THBS1	1.56	0.03
Bt.6057.1.S1_at	Von Willebrand factor A domain containing 1	VWA1	1.56	0.04
Bt.20245.1.S1_at	Pleckstrin homology domain containing, family O member 1	PLEKHO1	1.56	0.03
Bt.28675.1.S1_at	Arachidonate 12-lipoxygenase	ALOX12	1.55	0.002
Bt.28225.1.A1_at	SAM domain, SH3 domain and nuclear localization signals 1	SAMSN1	1.55	0.04
Bt.24841.1.S1_at	Spla/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 1	SPSB1	1.55	0.02
Bt.27247.1.A1_at	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1	WHSC1L1	1.55	0.05
Bt.4342.1.S1_at	Selectin P	SELP	1.55	0.01
Bt.143.1.S1_at	Neutrophil cytosolic factor 2	NCF2	1.54	0.03
Bt.13486.1.A1_at	Glycine dehydrogenase (decarboxylating)	GLDC	1.54	0.003
Bt.5605.3.S1_at	Myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	MARCKS	1.54	0.03
Bt.24335.1.S1_at	Dual adaptor of phosphotyrosine and 3-phosphoinositides	DAPP1	1.54	0.04
Bt.9527.2.S1_at	Kruppel-like factor 10	KLF10	1.54	0.02
Bt.25979.1.S1_a_at	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 4	ENTPD4	1.53	0.01
Bt.3862.1.S1_a_at	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	PPARG	1.53	0.03
Bt.12314.1.S1_at	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3	PFKFB3	1.53	0.04
Bt.25948.1.A1_at	Deltex homolog 1 (Drosophila)	DTX1	1.52	0.03
Bt.27073.1.S1_at	Acyl-coa dehydrogenase, long chain	ACADL	1.52	0.01
Bt.26535.1.S1_at	Tuftelin interacting protein 11	TFIP11	1.52	0.04
Bt.17952.1.A1_at	Cyclin-dependent kinase 8	CDK8	1.52	0.03
Bt.4357.1.S1_at	Tetraspanin 7	TSPAN7	1.51	0.05
Bt.4622.1.S1_at	Mannosidase, alpha, class 2B, member 1	MAN2B1	1.51	0.002
Bt.3546.1.S1_at	Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2	ROR2	1.50	0.05
Bt.2610.1.S1_at Bt.1537.1.S1_at	Molybdenum cofactor sulfurase	MOCOS	1.50	0.01
	N-myc downstream regulated 1	NDRG1	1.50	0.04

UniGene ID	Nome do gene	Símbolo	Vezes mudado	Valor de P
Bt.29824.1.S1_s_at	MHC class I heavy chain	BOLA	-13.29	3.6E-07
Bt.9172.1.A1_at	acidic repeat containing	ACRC	-1.90	0.02
Bt.16041.2.S1_at	actin binding LIM protein 1	ABLIM1	-1.97	0.01
Bt.4604.1.S1_a_at	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 1	ACSM1	-1.65	0.02
Bt.8933.2.S1_at	adaptor-related protein complex 3, sigma 2 subunit	AP3S2	-1.56	0.004
Bt.19093.1.S1_at	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2	ALDH1A2	-1.96	0.01
Bt.28278.1.S1_at	angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 2	ACE2	-1.89	0.004
Bt.24853.1.A1_at	ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 2	ASAP2	-1.55	0.01
Bt.10078.1.S1_at	asparagine-linked glycosylation 11, alpha-1,2- mannosyltransferase homolog (yeast)	ALG11	-1.60	0.01
Bt.24370.1.A1_at	asparagine-linked glycosylation 13 homolog (S. cerevisiae)	ALG13	-1.82	0.002
Bt.11527.1.A1_at	BCL2-like 2	BCL2L2	-1.54	0.004
Bt.9020.1.S1_at	bladder cancer associated protein	BLCAP	-1.56	0.01
Bt.27440.1.A1_at	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2B	BAZ2B	-1.67	0.01
Bt.20860.3.A1_at	calcyphosine-like	CAPSL	-1.79	0.03
Bt.8508.1.A1_at	cAMP responsive element binding protein 3-like 2	CREB3L2	-1.77	0.01
Bt.13321.1.S1_at	centrosome and spindle pole associated protein 1	CSPP1	-1.88	0.01
Bt.17474.1.A1_at	chromosome 3 open reading frame 63 ortholog	C22H3ORF63	-1.78	0.003
Bt.17474.1.A1_at	chromosome 3 open reading frame 63 ortholog	C22H3ORF63	-1.90	0.01
Bt.8823.2.S1_at	chromosome 9 open reading frame 46 ortholog	C8H9ORF46	-2.27	0.01
Bt.16243.2.A1_at	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 8	CMTM8	-1.65	0.04
Bt.27498.1.S1_at	coiled-coil domain containing 104	CCDC104	-1.67	0.05
Bt.3946.1.S1_at	coiled-coil domain containing 3	CCDC3	-2.07	0.02
Bt.29725.1.S1_at	collagen, type IV, alpha 4	COL4A4	-1.54	0.01
Bt.23722.1.A1_at	complement component 6	C6	-1.76	0.02
Bt.18557.1.S1_at	complement component 7	C7	-1.69	0.01
Bt.12510.3.S1_at	CREB regulated transcription coactivator 1	CRTC1	-1.52	0.03
Bt.3317.1.A1_at	cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor)	CUBN	-1.51	0.01
Bt.20799.3.A1_at	dedicator of cytokinesis 1	DOCK1	-1.65	0.001
Bt.26495.2.S1_at	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 19	DNAJC19	-1.57	0.01
Bt.14051.1.S1_at	dual specificity phosphatase 16	DUSP16	-2.01	0.01
Bt.20340.2.S1_at	dystrophia myotonica-protein kinase	DMPK	-1.75	0.0001
Bt.27286.1.S1_a_at	ecdysoneless homolog (Drosophila)	ECD	-1.63	0.02
Bt.3276.2.S1_at	enolase superfamily member 1	ENOSF1	-1.57	0.005
Bt.16212.1.A1_at	Enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 3	ECHDC3	-2.54	0.01
Bt.22545.2.S1_at	fibulin 1	FBLN1	-1.53	0.01
Bt.20510.1.S1_at	FXYD domain containing ion transport regulator 1	FXYD1	-1.55	0.01
Bt.13763.1.S1_at	GLE1 RNA export mediator homolog (yeast)	GLE1	-1.56	0.02
Bt.12964.1.A1_at	Glycoprotein M6B	GPM6B	-1.83	0.02
Bt.20852.1.A1_at	GNAS complex locus	GNAS	-2.12	0.01
Bt.26769.1.S1_at	GTPase, IMAP family member 8	GIMAP8	-1.95	0.03
Bt.22058.1.A1_at	Hect domain and RLD 5	HERC5	-1.51	0.02
Bt.24694.1.A1_at	HEG homolog 1 (zebrafish)	HEG1	-1.97	0.01

Tabela 4 - Genes diminuídos (1,5 p
≤0,0.5) nos animais superovulados em relação aos animais controle

Bt 18008 1 S1 at	Hataroganaous nuclear ribonucleoprotain L like	HNDDI I	1 78	0.003
Dt.16908.1.51_at	humothatical LOC100106001	LOC100106001	-1.70	0.003
Bt.2578.1.A1 at	hypothetical LOC783847 /// transmembrane protein 150C	LOC783847 /// TMEM150C	-2.07	0.02
	insulin receptor	INSR	-3.01	0.02
 Bt.12186.1.S1 at	insulin-like 3 (Levdig cell)	INSL3	-4.33	0.04
Bt.13285.1.A1 at	La ribonucleoprotein domain family, member 1	LARP1	-1.60	0.04
Bt.16172.1.A1 at	Leucyl-tRNA synthetase 2. mitochondrial	LARS2	-1.96	0.001
Bt.23267.1.S1 at	lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1	LYVE1	-1.55	0.03
Bt.6527.1.S1 at	lymphoid enhancer-binding factor 1	LEF1	-1.56	0.01
Bt.4714.1.S1_at	matrix metallopeptidase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	MMP9	-1.59	0.001
Bt.13221.1.S1_at	MDN1, midasin homolog (yeast)	MDN1	-1.95	0.01
Bt.25291.1.A1_at	melanoma inhibitory activity family, member 3	MIA3	-1.68	0.01
Bt.1797.1.S1_at	metallophosphoesterase 1	MPPE1	-1.72	0.02
Bt.20102.1.S1_at	MPV17 mitochondrial membrane protein-like 2	MPV17L2	-1.60	0.02
Bt.13707.1.A1_at	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 2	MLL2	-1.51	0.01
Bt.20045.1.A1 at	neutral cholesterol ester hydrolase 1	NCEH1	-1.79	0.002
	neutral cholesterol ester hydrolase 1	NCEH1	-2.00	0.002
– Bt.8479.1.A1 at	nitric oxide synthase 2, inducible	NOS2	-1.53	0.03
Bt.25965.2.S1 at	nuclear receptor co-repressor 1	NCOR1	-1.56	0.01
Bt.24396.3.A1_at	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 10	NUDT10	-1.62	0.002
Bt.17386.1.A1_at	cerevisiae)	PAN3	-1.63	0.002
Bt.20518.1.A1_at	paraneoplastic antigen MA2	PNMA2	-1.51	0.03
Bt.16133.2.S1_at	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class H	PIGH	-1.58	0.02
Bt.8518.2.A1_at	Phosphodiesterase 8B	PDE8B	-1.59	0.01
3t.20038.1.S1_at	pleckstrin homology domain containing, family B (evectins) member 1	PLEKHB1	-1.78	0.01
3t.1898.1.S1_at	PQ loop repeat containing 2	PQLC2	-1.54	0.02
Bt.18218.1.A1_at	Protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, gamma isoform	PPP3CC	-1.67	0.02
Bt.9710.1.S1_at	PRP4 pre-mRNA processing factor 4 homolog B (yeast)	PRPF4B	-1.53	0.01
Bt.16784.1.S1_at	pygopus homolog 1 (Drosophila)	PYGO1	-1.63	0.01
Bt.21039.1.A1_at	RAS, dexamethasone-induced 1	RASD1	-1.93	0.02
Bt.23678.1.A1_at	RCD1 required for cell differentiation1 homolog (S. pombe)	RQCD1	-1.55	0.003
Bt.17026.1.S1_at	Rho GTPase activating protein 17	ARHGAP17	-1.55	0.01
Bt.24442.1.A1_at	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 11	ARHGEF11	-1.72	0.02
Bt.24490.2.S1_at	ribonuclease P/MRP 38kDa subunit	RPP38	-1.54	0.005
Bt.13898.2.S1_at	ribosomal protein S27-like	RPS27L	-2.28	0.004
Bt.22359.2.A1_at	RIO kinase 3 (yeast)	RIOK3	-1.51	0.01
Bt.9546.1.S1_at	RNA binding motif protein, X-linked 2-like	LOC613705	-1.90	0.001
Bt.23235.1.S1_at	RNA pseudouridylate synthase domain containing 3	RPUSD3	-1.52	0.003
Bt.4177.3.A1_at	roundabout, axon guidance receptor, homolog 2 (Drosophila)	ROBO2	-1.67	0.02
Bt.4177.3.A1_at	roundabout, axon guidance receptor, homolog 2 (Drosophila)	ROBO2	-1.53	0.02
Bt.29009.1.A1_at	ryanodine receptor 3	RYR3	-1.59	0.03
Bt.24983.1.A1_at	similar to dynein, cytoplasmic 2, heavy chain 1	LOC512287	-1.63	0.01
Bt.16148.2.A1_a_at	similar to hCG2036584	LOC532848	-1.85	0.0004
Bt.9179.2.S1_at	similar to mCG142721	RNF213	-1.93	0.004
Bt.22433.1.A1 at	member 5	SLC22A5	-1.69	0.01

Bt.15717.2.S1_at	sorting nexin 7	SNX7	-1.54	0.02
Bt.10565.1.A1_at	spectrin repeat containing, nuclear envelope 1	SYNE1	-1.70	0.0
Bt.13549.2.S1_at	splicing factor, arginine/serine-rich 18	SFRS18	-1.73	0.00
Bt.13249.1.A1_at	stearoyl-CoA desaturase 5	SCD5	-1.52	0.0
Bt.18086.1.S1_at	TBC1 domain family, member 7	TBC1D7	-1.80	0.02
Bt.10144.1.A1_s_at	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1	TIAM1	-1.55	0.0
Bt.11240.1.A1_at	tet oncogene family member 2	TET2	-1.94	0.00
Bt.25051.1.A1_at	tetratricopeptide repeat domain 14	TTC14	-1.72	0.0000
Bt.22035.2.S1_at	thioredoxin domain containing 15	TXNDC15	-1.52	0.0
Bt.27903.1.A1_at	THO complex 2	THOC2	-1.63	0.0
Bt.4053.1.S1_at	thromboxane A2 receptor	TBXA2R	-1.86	0.0
Bt.4053.1.S1_at	thromboxane A2 receptor	TBXA2R	-1.96	0.0
Bt.29472.1.A1_at	TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein	TIA1	-1.61	0.04
Bt.6803.1.A1_at	TRAF2 and NCK interacting kinase	TNIK	-1.70	0.00
Bt.5336.1.A1_a_at	transferrin	TF	-1.71	0.04
Bt.26669.1.S1_at	transmembrane and coiled-coil domains 7	TMCO7	-1.55	0.02
Bt.11438.1.S1_at	troponin I type 3 (cardiac)	TNNI3	-2.08	0.0
Bt.3741.1.S1_at	tuberous sclerosis 1	TSC1	-1.66	0.004
Bt.754.1.S1_at	tubulin tyrosine ligase-like family, member 3	TTLL3	-1.57	0.00
Bt.6851.1.S1_at	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 5	B4GALT5	-1.64	0.0
Bt.20434.1.A1_at	UFM1-specific peptidase 2	UFSP2	-1.50	0.002
Bt.4138.2.S1_at	vascular endothelial growth factor A	VEGFA	-1.52	0.0
Bt.24284.1.A1_at	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1	WHSC1L1	-2.29	0.0
Bt.11847.1.A1_at	X (inactive)-specific transcript	XIST	-1.69	0.0
Bt.24975.2.S1_at	YTH domain containing 2	YTHDC2	-1.69	0.02
Bt.26259.3.A1_at	zinc finger protein 462	ZNF462	-1.54	0.00
Bt.3235.1.A1_at	Zinc finger, MYND-type containing 8	ZMYND8	-1.55	0.0
Bt.7208.1.S1_at	zona pellucida glycoprotein 2 (sperm receptor)	ZP2	-1.53	0.0