**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Perfil hormonal e expressão de genes associados ao desvio folicular
ovariano em bovinos**

Jéssica Nora Drum

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência
Animal e Pastagens

**Piracicaba
2015**

Jéssica Nora Drum
Médica Veterinária

Perfil hormonal e expressão de genes associados ao desvio folicular ovariano em bovinos

Orientador:
Prof. Dr. **ROBERTO SARTORI FILHO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência
Animal e Pastagens

Piracicaba
2015

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Drum, Jéssica Nora

Perfil hormonal e expressão de genes associados ao desvio folicular ovariano em
bovinos / Jéssica Nora Drum. - - Piracicaba, 2015.
74 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Gene 2. Bovino 3. Dominância folicular I. Título

CDD 636.20892
D795p

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

**À minha família, meu amor incondicional,
Meus pais, Osmar Antonio Drum e Tânia Maria Nora Drum.
Minha irmã Anye Catharine Nora Drum, minha pequena.
Dedico!**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus, por ter me concedido o privilégio de ser capaz de concretizar meus sonhos.

Às pessoas que me rodeiam, sem as quais eu nada seria. Por mais independentes que sejamos, ninguém consegue nada sem ajuda, seja de forma direta ou por meio do amor e amizade concedidos.

Meus pais, Osmar e Tânia, pelos inúmeros esforços hoje e sempre para que eu conseguisse trilhar meu próprio caminho, sempre apoiando nas horas boas e ruins, orgulhosos por mínima que fosse minha conquista. À minha irmã, Anye, por ser o melhor presente de aniversário que já ganhei na vida, por todo o apoio e por ser minha irmã-amiga. Aos demais membros da família, pela paciência, por ainda me amarem embora morando a 900 km deles. Ao meu afilhado Miguel, que pela distância eu não consigo estar perto todo o tempo, embora muito novo para entender, por me lembrar como alguém tão pequenino pode gerar tanto amor.

Aos meus amigos de Santa Catarina, também pela paciência nos momentos em que estive ausente, eventos, datas comemorativas, encontros, alegrias e tristezas. Obrigada por não desistirem de mim e ainda assim apoiarem e torcerem pela minha vitória.

À minha sempre amiga Mariana Sponchiado por ser companheira de angústias do mestrado, companheira de congressos, de fofocas, de disciplinas, enfim, companheira da vida. Obrigada Mari por estar sempre por perto e que nademos de braçada sempre juntas!

Ao meu colega de programa e amigo Murillo (Titaniq), pela amizade e companheirismo de sempre, seja em disciplinas, correrias, pingaiada ou para ouvir um modão sempre que possível.

Às moradoras da “Casa do seu Heleno”, em especial Mi, Lay e Tati, pessoas com as quais eu dividi, além do apartamento e as despesas, dividi risadas, caixas de cerveja, gordices, comidinhas saudáveis e tentativas frustradas de exercício semanal, grandeparte da minha vida em Piracicaba, além de serem a salvação e o ombro amigo em muitos momentos de desespero e crises de choro.

Meus colegas de Laboratório, por todo o apoio tanto científico quanto pessoal em todos os momentos. Ao Ricardo, pela parceria nos experimentos e o “presente de grego”. Pedro, ajuda indispensável como co-orientador extraoficial, tanto na vida acadêmica quanto pessoal, além de amigo para todas as horas e fonte de inspiração científica constante. Léozinho, cowboy demais, parceiro de experimentos, que briga com a gente, mas está sempre lá quando precisamos dele e que faz mais falta que violão em enterro. Alexandre, chato,

obrigada por pegar no pé quando eu precisava, e por estar sempre lá para ajudar e dar seus “parpites”. Além dos demais colegas de grupo atuais e que passaram, pela amizade e apoio, Fer Zinzly, Fer Lavínia, Louise, Camila, Guilherme, Monique, Zé, Aníbal e Bruno.

Ao meu orientador Roberto Sartori Filho, meu sincero muito obrigada pela oportunidade de estar onde estou, pelas broncas quando necessário e também pela amizade de sempre.

Aos apoiadores do projeto, Prof Milo Wiltbank, por toda a inspiração de uma mente privilegiada.

Ao Prof José Buratini, por ceder o laboratório e também sugestões pertinentes para realização do trabalho.

À minha amiga, e tutora nos “PCRs da vida” Mariana Fernandes Machado, obrigada pelo apoio e dedicação ao ensinar cada passo, além de estadia em Botucatu.

Ao CNPQ pela bolsa.

À FAPESP pelo financiamento.

E à todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse concluído.
Muito obrigada!

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino.”

(Leonardo da Vinci)

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	19
1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 Seleção do folículo dominante em bovinos	23
2.2 Fatores endócrinos e moleculares envolvidos no desvio folicular	25
2.2.1 Estradiol.....	27
2.2.2 FSH.....	29
2.2.3 LH.....	31
2.2.4 Inibina e Ativina	33
2.2.5 Sistema IGF	35
3 EXPERIMENTO 1	39
3.1 Objetivos.....	39
3.2 Hipóteses	39
3.3 Material e Métodos	39
3.3.1 Animais e sincronização da onda folicular	39
3.3.2 Exames ultrassonográficos e dinâmica folicular	40
3.3.3 Distribuição dos tratamentos	40
3.3.4 Colheita de sangue e dosagens hormonais	40
3.3.5 Análise Estatística	41
3.4 Resultados.....	42
4 EXPERIMENTO 2	45
4.1 Objetivos.....	45
4.2 Hipóteses	45
4.3 Material e Métodos	46
4.3.1 Animais e sincronização da onda folicular.....	46
4.3.1 Distribuição dos tratamentos	46
4.3.2 Obtenção das Células da Granulosa	46
4.3.3 Extração de RNA e transcrição reversa	47
4.3.4 Expressão gênica por PCR em tempo real (RT-PCR),.....	48

4.3.5	Análise dos dados de PCR em tempo real	50
4.3.6	Dosagens hormonais	50
4.3.7	Análise Estatística	50
4.4	Resultados	51
5	DISCUSSÃO	57
6	CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
	REFERÊNCIAS	65

RESUMO

Perfil hormonal e expressão de genes associados ao desvio folicular ovariano em bovinos

O experimento 1 objetivou estabelecer um modelo de estudo do desvio folicular, permitindo identificar o momento exato do início do desvio. Vacas das raças Nelore (NEL; n=11) e Holandês (HPB; n=10) tiveram emergência da onda folicular ovariana sincronizada e avaliação ultrassonográfica ovariana realizada a cada 12 h. Quando o maior folículo (F1) atingiu tamanho médio de início do desvio para sua raça (NEL: 6,5; HPB: 8,5 mm), em crossover, foram aleatorizadas em dois grupos (CON: Controle; ASP: Aspiração), com aspiração do F1 ASP e nas vacas do grupo CON não houve aspiração. Avaliações ultrassonográficas foram mantidas até 48h pós-desvio. Os dados foram analisados pelo PROC MIXED ($P \leq 0,05$). No grupo CON, 12h após F1 atingir tamanho de desvio, diferiu em diâmetro com os demais (F2/F3), caracterizando desvio. Não foi observada diferença entre F1 na aspiração e F2 12h após, no grupo ASP nas duas raças. Não houve diferença entre F1 CON com F2 ASP após aspiração do F1. Todavia, F2 ASP apresentou maior diâmetro em relação ao F2 CON a partir de 12h após o momento do desvio, em ambas as raças. Foi realizada colheita de sangue em 0, 3, 6, 12 e 24h após aspiração, para avaliação da concentração plasmática de FSH e aumentou em 12h após aspiração do F1 ASP. O experimento 2, objetivou verificar expressão de genes associados ao desvio, CYP19A1 (Aromatase), receptor de LH (LHr) e PAPP-A (Pappalysin 1) em vacas NEL utilizando o mesmo modelo do experimento 1, entretanto obtendo células da granulosa por meio de lavagem intrafolicular. As vacas (n=10) tiveram emergência da onda sincronizada. Foram estabelecidos três tratamentos: 0h, o maior folículo atingiu 6,5 mm, e os dois maiores folículos foram aspirados (FD0h; FS0h); 12h, os dois maiores folículos (FD12h; FS12h) foram aspirados 12h após o maior atingir 6,5 mm; e grupo desvio, o maior folículo (FD0h) foi aspirado quando atingiu 6,5 mm, e o segundo maior (FS→FD) 12h depois. A suspensão contendo células da granulosa, foi centrifugada, o sobrenadante dosado para estradiol-17 β (E2) por ELISA. O pellet foi analisado para expressão de RNAm. Análise estatística foi realizada pelo PROC MIXED do SAS. Concentração de E2 (ng/mL) para FS→FD diferiu do FS0h e FS12h e não diferiu de FD0h e FD12h comprovando que FS→FD na ausência de um FD0h aumenta sua concentração de E2 semelhante aos folículos dominantes. Não houve diferença entre os grupos para a expressão relativa para PAPP-A e CYP19A1. Para LHr, houve tendência de aumento na expressão nos folículos FS→FD, quando comparados ao do grupo 0h. Não houve diferença entre FS→FD e o grupo 12h. FD12h diferiu do grupo 0h (FD0h e FS0h) e FS12h. Conclui-se que, o segundo maior folículo é capaz de se tornar dominante quando se aspira o maior folículo permitindo que se tenha estimativa mais segura do momento exato da dominância; também, ocorre um aumento no FSH plasmático 12h após a aspiração do maior folículo. O aumento na expressão de LHr foi o principal fator para o estabelecimento do desvio em vacas NEL.

Palavras-chave: Gene; Bovino; Dominância folicular

ABSTRACT

Hormonal profile and expression of genes related to ovarian deviation in bovine

This study was conducted in two experiments. Experiment 1 aimed to establish a manipulative model to study follicle deviation. Nelore (NEL n=11) and Holstein (HOL n=10) cows had the emergence of the wave synchronized. Ovarian ultrasonography was performed every 12h. When largest follicle (F1) reached the average size of deviation to its breed (NEL: 6.5; HOL: 8.5 mm), cows were randomized into two groups (CON: control; ASP: Aspiration) in a crossover design. F1ASP was aspirated, and for cows of CON group there was no aspiration. Ultrasound exams were maintained through 48h post-deviation. Data were analyzed using PROC MIXED ($P \leq 0.05$). In the CON group, 12h after F1 has reached deviation size, there was difference in diameter in relation to F2 and F3, characterizing deviation. There was no difference between diameters of F1 at the time of aspiration and F2 12h after in the ASP group for both breeds. There was no difference between the F1 from CON group with F2 ASP group after F1 aspiration. However, F2ASP had a bigger diameter compared to the CON group F2 12h after the time of deviation in both breeds. Blood samples were collected at 0, 3, 6, 12 and 24h after aspiration, to evaluate plasma concentrations of FSH. FSH increased at 12h after the F1 aspiration in ASP group. Experiment 2 was conducted to verify the expression of genes associated with follicle deviation, CYP19A1 (aromatase), LH receptor (LHR) and PAPP-A (Pappalysin 1) in NEL cows using same model of experiment 1, however by obtaining granulosa cells through intrafollicular flushing. Cows (n=10) had the wave emergence synchronized. Three treatments were established: 0h, when the biggest follicle reached 6.5 mm, the two biggest follicles were aspirated (DF0h; SF0h); 12h, the two biggest follicles (DF12h; SF12h) were aspirated 12h after the biggest follicle had reached 6.5 mm; and deviation group, biggest follicle (DF0h) was aspirated when reached 6.5 mm, and the second biggest follicle (SF→DF) was aspirated 12h later. The follicular fluid granulosa cells was centrifuged and supernatant was assayed for 17 β -estradiol (E2) concentration by ELISA. The pellet was analyzed for mRNA expression. Statistical analysis was performed using the SAS PROC MIXED. Concentration of E2 (ng/mL) for SF→DF differed from SF0h and SF12h and did not differ from DF0h and DF12h showing that SF→DF in the absence of a DF0h had an increased concentration of E2 similar to dominant follicles. There was no difference between groups for the relative expression of mRNA for PAPP-A and CYP19A1. For LHR expression, there was a tendency to increase in SF→DF follicles when compared to the group 0h. There was no difference between SF→DF and group 12h. DF12h differed from group 0h (DF0h/SF0h) and SF12h. In conclusion, second biggest follicle can become dominant when the biggest follicle is aspirated, allowing to have more reliable estimation of the exact moment of follicle deviation, associated with an increase in plasma FSH 12h after aspiration of the biggest follicle. Increased expression of LHR was the main characteristic of establishment of deviation in NEL cows.

Keywords: Gene; Bovine; Follicle selection

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Modelo esquemático, adaptado de Ginther et al. (2001), propondo interações entre células da granulosa e da teca no futuro folículo dominante, no momento próximo ao desvio morfológico.....26
- Figura 2 – Modelo hipotético adaptado de Fortune et al. (2001), sobre a sequência de eventos durante a seleção do folículo dominante em vacas. Sugere que a indução de PAPP-A pelo FSH é o evento crítico para o desvio funcional27
- Figura 3. - Representação do diâmetro folicular dos três maiores folículos (F1, F2 e F3) de -12 h até 48 h em relação ao momento do desvio nos grupos CON e ASP para vacas holandesas. Dados apresentados na forma de média dos quadrados mínimos $\pm$ EP. $*P \leq 0,05$ 42
- Figura 4 - Representação do diâmetro folicular dos três maiores folículos (F1, F2 e F3) de -12 h até 48 h em relação ao momento do desvio nos grupos CON (A) e ASP (B) para vacas Nelore. Dados apresentados na forma de média dos quadrados mínimos $\pm$ EP. $*P \leq 0,05$43
- Figura 5 - Comparação da dinâmica folicular em HPB e NEL, do F2 do grupo ASP com o F2 do grupo CON, objetivando verificar as diferenças nos padrões de crescimento entre eles. O F2 do grupo CON demonstrando o comportamento de um folículo que sempre foi subordinado desde sua emergência. Por outro lado, F2 do grupo ASP demonstra como o folículo se comporta na ausência de F1, aquele que possuía vantagem morfológica desde a emergência. Dados apresentados na forma de média dos quadrados mínimos $\pm$ EP. $* P \leq 0,05$. $**P \leq 0,10$, considerado tendência.....43
- Figura 6 - Concentração plasmática de FSH para os dois grupos (ASP e CON) ao longo das horas após o momento do desvio e/ou aplicação dos tratamentos (0, 3, 6, 12 e 24 h). Dados apresentados na forma de média dos quadrados mínimos $\pm$ EP. $*P \leq 0,05$ 44
- Figura 7 – Padrão de dinâmica dos folículos dominante e subordinado (FD e FS) nos diferentes grupos. Setas representam o momento em que os folículos foram aspirados. (A) Grupo aspirado 0h, no momento em que o maior folículo atinge o tamanho médio de início do desvio (6,5 mm). (B) Grupo aspirado 12h após o

momento de desvio. (C) Grupo desvio, aspiração do maior folículo no desvio e 12h depois aspiração do segundo maior. (D) Comparação entre o folículo subordinado que se torna dominante (FS→FD) e o folículo sempre subordinado (FS12h). Trt*Fol = $P < 0,0001$. Hora = $P < 0,0001$. Trt*Fol*Hora = $P = 0,0799$. * $P < 0,05$ 52

Figura 8 - Resultados da concentração intrafolicular de estradiol no momento da aspiração. Grupo FS e FD 0h (n = 7), Grupo FS→FD (n = 4) e Grupo FS e FD 12h (n = 4). Dados apresentados na forma de média dos quadrados mínimos $\pm$ EP. a,b,c Médias seguidas de letras distintas diferem ($P < 0,05$)..... 53

Figura 9 - Resultados da concentração intrafolicular de Progesterona no momento da aspiração independente de raça (NEL e HPB). Grupo 0h (n=7), Grupo 0-12h (n=4) e Grupo 12h (n=4). Dados apresentados na forma de média dos quadrados mínimos $\pm$ EP..... 53

Figura 10 - Representação gráfica da abundância relativa de mRNA para PAPP-A (Pappalysin 1). Dados apresentados na forma de média dos quadrados mínimos $\pm$ EP. $P > 0,05$ 54

Figura 11 - Representação gráfica da abundância relativa de mRNA para CYP19A1 (Aromatase). Dados apresentados na forma de média dos quadrados mínimos $\pm$ EP. $P > 0,05$ 54

Figura 12 - Representação gráfica da abundância relativa de mRNA para receptor de LH (LHr) sem distinção de isoformas. Dados apresentados na forma de média dos quadrados mínimos $\pm$ EP. $abP \leq 0,05$. * $P \leq 0,10$ 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informações sobre os primers específicos utilizados para o PCR em tempo real ..	49
Tabela 2 - Coeficientes de correlação de Pearson/Spearman entre as variáveis analisadas.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	- Microlitros
ASP	- Aspiração
CL	- Corpo Lúteo
CON	- Controle
CYP19A1	- Gene codificante da enzima aromatase
D	- Dia
E2	- Estradiol
E2/P4	- Relação estradiol/progesterona
ECA	- Enzima conversora de angiotensina
ECC	- Escore de Condição Corporal
ELISA	- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FD	- Folículo dominante
FF	- Fluido folicular
FS→FD	- Folículo subordinado que se torna dominante
FS	- Folículo subordinado
FSH	- Hormônio Folículo Estimulante
H	- Hora
HPB	- Holandês Preto e Branco
IGF	- Fator de Crescimento Semelhante a Insulina
IGF-1	- Fator de Crescimento Semelhante a Insulina 1
IGFBP	- Fator de crescimento Semelhante a Insulina Ligado a Proteína
IGFBPase	- Proteinase que degrada IGFBP
LH	- Hormônio Luteinizante
LHr	- Receptor de LH
mL	- Mililitros
mm	- milímetros
NEL	- Nelore
P4	- Progesterona
PAPP-A	- Proteína sérica A associada a prenhez
PGF2α	- Prostaglandina F2α
PCR	- Reação da polimerase em cadeia

qPCR	- Reação da Polimerase em Cadeia quantitativa
RIE	- Radioimunoensaio
RPM	- Rotações Por Minuto
RT-PCR	- Reação de transcriptase reversa seguida – PCR

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a pecuária brasileira conta com um dos maiores rebanhos comerciais do mundo, cerca de 208,3 milhões de cabeças (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES – ABIEC, 2014). Produziu 10,7 milhões de toneladas de carne bovina em 2014 (ABIEC, 2014), ocupando a segunda posição no ranking mundial de produção de carne (EMBRAPA, 2011). O rebanho leiteiro ocupa a quinta posição mundial (FAO, 2012). Apesar da magnitude do rebanho, a produção brasileira anual de leite em 2014 foi de 24,741 bilhões de litros, com produtividade de 1.380 L de leite/vaca/ano (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2014), muito pequena quando comparada com 10.096 do rebanho americano, atualmente o maior produtor de leite do mundo (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA, 2014). Estes dados demonstram a ascensão brasileira neste mercado nos dias atuais e o aumento na produtividade está diretamente relacionado aos avanços tecnológicos em reprodução animal, que por sua vez está atrelado ao entendimento da fisiologia reprodutiva dos animais de produção.

As raças Nelore e Holandês representam as duas maiores raças utilizadas comercialmente em seus respectivos nichos de mercado, produção leiteira para Holandês e produção de carne para Nelore. Vacas holandesas tem uma importância vital para produção de alimentos lácteos por ser a raça mais utilizada mundialmente, entretanto, apresenta vários problemas reprodutivos que ainda precisam ser estudados, como por exemplo, sua baixa eficiência reprodutiva recorrente. Vacas Nelore são as principais matrizes de rebanhos de corte no Brasil, sendo responsáveis por cerca de 80% da população de bovinos no Brasil (ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA - ANUALPEC, 2010).

Ambas as raças são objetos de estudo para a fisiologia ovariana tanto no âmbito fisiológico quanto do ponto de vista prático, na aplicabilidade em protocolos de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), produção de embriões além de possibilitar melhora nos índices reprodutivos atuais.(WILTBANK; PURSLEY, 2014; WILTBANK et al., 2015) A importância do entendimento da fisiologia ovariana por trás destas biotecnologias, está associada à necessidade de manipulação e otimização da reprodução assistida, principalmente através da interferência no ambiente folicular e hormonal.

Holandês Preto e Branco (HPB) é uma raça da subespécie *Bos taurus taurus*, essencialmente produtora de leite, a qual apresenta uma série de trabalhos onde é objeto de estudo do desvio folicular (KO et al., 1991; KULICK et al., 1999; SARTORI et al., 2001; LUO et al., 2011; GINTHER et al., 2014), que permitiu um entendimento melhor dos

mecanismos que levam ao estabelecimento da dominância folicular morfológica. Os modelos utilizados em alguns destes estudos (MIHM et al., 2000; AUSTIN et al., 2001; SANTIAGO et al., 2005; GASPERIN et al., 2012), geralmente fazem uso de métodos de sincronização por protocolos de pré-sincronização e IATF. Esses modelos só permitem o aproveitamento de folículos que já apresentam uma vantagem mínima de diâmetro desde a emergência (GINTHER et al., 1997a; GINTHER, BERGFELT, 2001b) e não abordam o momento logo antes do estabelecimento do desvio morfológico, que é precedido por mudanças bioquímicas e moleculares que se iniciam ainda quando os folículos possuem o mesmo tamanho (FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004). Portanto, ainda existem alguns tópicos obscuros no sentido de estabelecer uma cronologia entre os fenômenos pré-desvio, que culminam no desvio folicular morfológico.

A raça Nelore é composta por indivíduos da subespécie *Bos taurus indicus* que possui uma gama de estudos em dinâmica folicular (BURATINI et al., 2000; SARTORELLI et al., 2005; CASTILHO et al., 2007; GIMENES et al., 2008; CASTILHO et al., 2014), porém com escassas avaliações comparativas com raças taurinas, principalmente em nível de mecanismos celulares e moleculares associados com a seleção dos folículos dominantes.

Existem três principais teorias conhecidas, no que tange ao momento em que o folículo inicia o processo de desvio. Alguns trabalhos sugerem que um suprimento preferencial de sangue para determinados folículos favorece seu desenvolvimento (JIANG et al., 2003). Outros falam da amplificação da resposta ao FSH por meio do aumento de IGF-1 livre intrafolicular no folículo destinado a ser o dominante (FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004). E por fim, a teoria de que o folículo destinado a ser o futuro dominante, adquire receptores de LH nas células da granulosa antes, o que faz dele mais adiantado fisiologicamente que os demais (BAO et al., 1997; BAO; GARVERICK, 1998; LUO et al., 2011).

O estudo da fisiologia endócrina e molecular dos processos ovarianos permite maior conhecimento do sistema reprodutivo como um todo. Embora este tipo de estudo seja bastante interessante para a elucidação dos mecanismos por trás da fisiologia, ainda existem poucos estudos capazes de abranger as duas vertentes.

Sendo assim, surge a necessidade de estudos manipulativos que permitam preencher as lacunas ainda existentes no estudo da fisiologia do desvio folicular.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Seleção do folículo dominante em bovinos

A avaliação ultrassonográfica da atividade ovariana por meio de ultrassonografia transretal (PIERSON; GINTHER, 1984), permitiu uma série de descobertas no que diz respeito aos padrões de crescimento e regressão de folículos antrais em forma de ondas foliculares durante o ciclo estral bovino. Cada onda folicular dura aproximadamente 10 dias (variação de 6 a 15 dias) (LUCY et al., 1992). Em ciclos estrais de duas ondas, a maturação do segundo folículo dominante coincide com a regressão do corpo lúteo (CL), consequentemente, ovulação deste folículo após a luteólise fisiológica (SIROIS; FORTUNE, 1988) isto quando se fala de espécies monovulares (GINTHER, BEG, 2001).

Onda folicular, nos bovinos, é caracterizada como o desenvolvimento folicular que envolve o recrutamento de um grupo de folículos antrais pequenos que iniciam seu crescimento comum, a partir de sua emergência durante cerca de 3 dias (GINTHER, BEG, DONADEU, 2003). Dentre estes, um folículo é selecionado, e não sofre atresia e potencialmente pode ovular. O folículo selecionado passa a exercer dominância sobre os demais folículos, suprimindo o crescimento dos mesmos e inibindo o recrutamento de um novo grupo de folículos (fase de dominância) (GINTHER et al., 1997a).

Ginther et al. (1997a) utilizaram o termo desvio folicular para definir o momento em que pela primeira vez existe uma diferença significativa na taxa de crescimento entre os dois maiores folículos, ou seja, o desvio folicular é caracterizado pelo crescimento contínuo do futuro folículo dominante e redução ou parada de crescimento do segundo maior folículo. Após uma avaliação retrospectiva dos folículos ao longo da dinâmica folicular, é observado que esta primeira diferença de diâmetro, ocorre em média 3 a 4 dias a partir do início da onda, no final da fase de crescimento paralelo (início do desvio).

Ginther et al. (1997a), mostraram que o futuro folículo dominante possui uma vantagem em diâmetro, demonstrada pela emergência (4 mm) antes dos demais, e que essa vantagem se mantém constante até o momento do desvio, que ocorre por volta de 2,7 dias, em novilhas holandesas, após a emergência da onda, demonstrando a mesma taxa de crescimento entre os dois maiores folículos até o momento do desvio. Ginther et al. (1997a) postularam que uma pequena diferença no diâmetro dos dois maiores folículos seria suficiente para permitir o estabelecimento de dominância pelo maior folículo antes que o segundo maior folículo pudesse atingir um diâmetro similar. Kulick et al. (1999) corroboraram os resultados

anteriores onde também observaram vantagem significativa do futuro folículo dominante já na emergência folicular ($4,2 \pm 0,8$ mm vs $3,6 \pm 0,1$ mm). Quando se observou o futuro folículo dominante desde a sua detecção aos 3 mm, ao comparar a cada 8 horas o diâmetro dos dois maiores folículos de uma onda, sugere-se que o futuro folículo dominante estabelece a dominância em menos de 8 horas, contudo os dois demonstraram um crescimento paralelo até o desvio (GINTHER et al., 1997a; GINTHER et al., 1999). Estes resultados sugerem que o mecanismo de desvio foi ativado rapidamente quando o futuro folículo dominante alcançou um diâmetro determinante (8,5 mm), o qual impediu o contínuo crescimento do folículo subordinado antes que o mesmo alcançasse um diâmetro similar (GINTHER, BEG, KOT, 2003).

O mecanismo de seleção/desvio deve ser capaz de evitar o crescimento de futuros folículos subordinados porque, apesar desta vantagem morfológica do folículo dominante, vários estudos mostraram que na fase de crescimento tanto os subordinados quanto o futuro folículo dominante, são capazes de adquirir e exercer dominância, após a ablação do maior folículo (GINTHER et al., 2000b).

Em novilhas da raça HPB, o desvio folicular ocorre ao redor do segundo dia após a ovulação, ocasião em que o futuro folículo dominante atinge cerca de 8,5 mm enquanto o segundo maior em 7,2 mm (GINTHER et al., 1996; GINTHER et al., 1997a). Diferentemente dos taurinos, em novilhas zebuínas, como, por exemplo, da raça Nelore, o desvio folicular tem sido relatado quando o maior folículo em crescimento atinge de 5 a 6,5 mm em novilhas (SARTORELLI et al., 2005; CASTILHO et al., 2007; GIMENES et al., 2008; SARTORI; BARROS, 2011). Entretanto, dados de Bastos et al.(2012) mostraram que, utilizando vacas NEL adultas e não-lactantes, o desvio se iniciou com diâmetro de 6,1 a 8,2 mm.

Embora haja esta diferença entre raças taurinas e zebuínas, o momento do desvio durante a primeira onda folicular em relação à ovulação anterior em *Bos indicus* (2,3-2,8 d) (SARTORELLI et al., 2005; GIMENES et al., 2008; SARTORI; BARROS, 2011) foi semelhante ao relatado em *Bos taurus* (GINTHER et al., 1996; SARTORI et al., 2001; SARTORI; BARROS, 2011; BASTOS, 2012).

Segundo Sartori et al. (2010), *Bos indicus* apresentam maior número de folículos pequenos nos ovários e ovulam folículos com menor diâmetro, quando comparados a *Bos taurus*. Consequentemente, têm menor corpo lúteo (CL). No entanto, as concentrações circulantes de hormônios esteroides e metabólicas não são necessariamente mais elevadas no gado europeu. De fato, alguns estudos têm mostrado que, apesar de ovularem folículos menores e com menor CL, vacas ou novilhas *Bos indicus* têm maiores concentrações

circulantes de estradiol (E2), insulina, progesterona (P4) e IGF-1, em relação às *Bos taurus* (SARTORI et al., 2010). Além disso, também existem diferenças significativas entre *Bos indicus* e *Bos taurus* em relação ao tamanho do folículo no momento da seleção do folículo dominante. Dados de estudos recentes (BASTOS, 2012), têm confirmado as diferenças significativas nas variáveis do ciclo estral de *Bos indicus* vs *Bos taurus*. Essas diferenças estão provavelmente relacionadas ao metabolismo distinto e diferentes concentrações de hormônios metabólicos entre o gado zebu e europeu.

A seleção do folículo dominante capaz de ovular dentro de um grupo de folículos antrais é um processo dinâmico regulado por interações entre gonadotrofinas, fatores de crescimento e substâncias intra-ovarianas (AUSTIN et al., 2001), resultando em uma fase de transição crítica para o desenvolvimento folicular. Segundo Beg et al. (2002) o processo de seleção folicular é regulado sistemicamente pelo FSH e LH e localmente por fatores que modulam a ação das gonadotrofinas, além de outros fatores que, possivelmente, agem independentemente das gonadotrofinas (ARMSTRONG; WEBB, 1997).

2.2 Fatores endócrinos e moleculares envolvidos no desvio folicular

A ativação do folículo para se tornar dominante parece ser controlada pelo equilíbrio entre fatores inibitórios e estimulatórios (FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004). As diferenças de concentração dos fatores intrafoliculares quando ocorre a mudança de resposta às gonadotrofinas é um momento crítico para o desvio e provavelmente é o responsável pela modificação da resposta (GINTHER; BEG; KOT, 2003; GINTHER; BERGFELT, 2004; GINTHER; GASTAL, 2004). Isto ocorre quando o folículo está com diâmetro por volta de 8 mm em bovinos taurinos (GINTHER et al., 1999).

Ginther et al. (2001), afirmam que a elevação na concentração de LH no desvio é responsável pelo estímulo ao sistema IGF bem como a esteroidogênese local. No início do desvio o maior folículo é capaz de utilizar baixas concentrações de FSH, aumentando o efeito local de E2 e IGF-1. Por sua vez, o segundo maior folículo não possui esta capacidade por estar em um estágio menos adiantado de desenvolvimento. Isto ocorre porque o desvio ocorreu previamente impedindo que o subordinado adquirisse a condição bioquímica existente no futuro dominante. O modelo apresentado na Figura 1, foi descrito por Ginther et al. (2001) e esquematiza os mecanismos pelos quais as duas células foliculares (teca e granulosa) desempenham seus papéis no estabelecimento do desvio folicular.

Figura 2 – Modelo hipotético adaptado de Fortune et al. (2001), sobre a sequência de eventos durante a seleção do folículo dominante em vacas. Sugere que a indução de PAPP-A pelo FSH é o evento crítico para o desvio funcional

Por outro lado, Fortune e colaboradores (2001), esquematizaram de maneira diferente o estabelecimento do desvio (Figura 2), onde estima-se que o primeiro fator determinante para o desvio é a indução de uma protease de IGFBP (PAPP-A, Proteína sérica A associada a prenhez), seguida de aumento no IGF-1 livre, que estimula a taxa de crescimento folicular e a produção de E2.

2.2.1 Estradiol

O E2 é um hormônio esteroide produzido por folículos ovarianos a partir da interação entre as células da teca e da granulosa e das gonadotrofinas hipofisárias (GINTHER, BEG, 2001). O E2 é produzido igualmente pelos folículos na fase de crescimento comum e aumenta no fluido folicular do maior folículo por volta do momento em que se inicia o desvio (BEG et

al., 2001). O primeiro aumento na diferença de concentração de E2 entre o primeiro maior e o segundo maior folículo ocorre entre 7,6 e 7,7 mm em novilhas HPB (GINTHER, BEG, KOT, 2003). Em alguns estudos mais precisos, utilizando colheita seriada de amostras de fluido folicular, observa-se que o início da diferença na concentração de E2 entre o maior folículo e o segundo maior ocorre em cerca de 4 h antes do início do desvio (GINTHER et al., 2002; BEG et al., 2003). Quando se aspira o maior folículo neste momento, se induz ao desvio de maneira experimental onde o segundo maior adquire a mesma concentração que o aspirado (GINTHER et al., 2002; GINTHER, BEG, DONADEU, 2003).

Para que ocorra este aumento no E2 uma série de alterações parácrinas e autócrinas precisa ocorrer nas células da granulosa, como o aumento da atividade da aromatase (BAO et al., 1997), aumento da expressão de receptores de LH e aumento na sensibilidade às gonadotrofinas (FSH e LH) (CROWE; MULLEN, 2013). Em células da granulosa de folículos próximos ao desvio, o maior folículo tem a expressão de RNA mensageiro para aromatase, cerca de 200% maior que o segundo maior folículo, diferença esta que aumenta ainda mais com o passar das horas (LUO et al., 2011).

Os androgênios e progestágenos por via da esteroidogênese, servem como substrato para a produção de E2 e por isso, são associados aos mecanismos do desvio (GINTHER, BEG, DONADEU, 2003). Os androgênios são produzidos na teca em resposta à estimulação por LH, e aromatizados em E2 nas células da granulosa (BEG et al., 2001). Ainda, o E2 parece ser capaz de causar um *feedback* positivo na sua própria produção estimulando as células da teca na produção de andrógenos (WRATHALL; KNIGHT, 1995).

Ginther et al. (2003) afirmam que o E2 é um dos maiores responsáveis pelo aumento na sensibilidade às gonadotrofinas de maneira diferenciada no futuro folículo dominante. Ainda, que essa resposta está relacionada ao desenvolvimento de folículos pré-antrais, aumento da esteroidogênese em células da teca e granulosa *in vitro*, estímulo do crescimento folicular *in vivo* e *in vitro*, inibição da apoptose de células da granulosa, aumento na sensibilidade ao FSH e LH pelo aumento de receptores, além de regular a formação de junções GAP entre as células da granulosa. Em porcas e ovelhas, mostrou aumentar a síntese de IGF-1 pelas células da granulosa *in vitro* (SPICER et al., 2001).

Alguns estudos falam em uso da relação E2/P4 como método de distinção entre folículos saudáveis e subordinados atrésicos, utilizando uma proporção >1 para classificação como saudável (MIHM; AUSTIN, 2002). Por outro lado, outros estudos visando entender o papel da P4 no desvio folicular mostram inconsistência e não nos permitem determinar exatamente qual o papel dela neste período (BEG et al., 2001; BEG et al., 2002).

O aumento ou decréscimo na concentração de E2, no momento esperado do desvio, resulta em decréscimo ou aumento, respectivamente, na concentração de FSH circulante, indicando uma relação funcional entre estes dois hormônios (KULICK et al., 1999; GINTHER et al., 2000a; BEG et al., 2003). Portanto, acredita-se que um aumento de E2 plasmático produzido pelo maior folículo (futuro dominante), no momento em que se espera a ocorrência do desvio, esteja envolvido na supressão das concentrações de FSH abaixo do requerido pelos folículos menores (futuros subordinados) (GINTHER et al., 2000a).

O maior folículo ovariano no momento esperado de se iniciar o desvio (no dia 2) apresentando por volta de 8,5 mm de diâmetro, possuía concentração intrafolicular média de 350 ng/mL (GINTHER et al., 1997a). Nesse momento, possui maior capacidade de suprimir o FSH do que quando possuía apenas 7,5 mm. Esta capacidade adicional, do folículo de 8,5 mm suprimir o FSH sistêmico, pode estar relacionada à ação combinada do E2 e da inibina (KANEKO et al., 1995).

2.2.2 FSH

Em bovinos, no momento do início da onda folicular, o qual coincide com um pico nas concentrações sanguíneas de FSH, observa-se a emergência de um grupo de folículos com tamanho antral similar (4,0 mm de diâmetro) e ocorre tanto em animais adultos não-gestantes, quanto em prenhes e pré-púberes (GINTHER et al., 1996). De acordo com Adams e colaboradores (1993) o declínio da responsividade ao FSH está associado ao momento em que ocorre o mecanismo de seleção do folículo dominante e este evento é um componente integral do mecanismo de seleção.

O aumento nas concentrações sanguíneas de FSH, observado 1 a 2 d antes de cada onda folicular, é considerado fundamental para o início das ondas foliculares durante o ciclo estral (ADAMS et al., 1993; GINTHER et al., 1998). Quando o maior folículo da nova onda folicular atinge 4-5 mm de diâmetro, as concentrações de FSH começam a declinar e aproximadamente 3 d mais tarde ocorre o desvio folicular, onde o folículo dominante passa a depender primariamente de LH para seu crescimento (WEBB et al., 1999). As concentrações de FSH são mantidas em níveis basais até o folículo dominante perder sua dominância, resultando em novo aumento nas concentrações circulantes de FSH e subsequente emergência da próxima onda folicular (BODENSTEINER et al., 1996).

Durante o intervalo entre o início do declínio de FSH até o início do desvio, vários folículos contribuem para a diminuição nas concentrações circulantes de FSH (WEBB et al., 1999). Embora o declínio do FSH seja causado por eles, os folículos continuam utilizando o

FSH para seu crescimento, pois quando reduzidas concentrações circulantes de FSH neste período, eles passam a sofrer um decréscimo de diâmetro (GINTHER et al., 2001b).

No início do desvio folicular o mecanismo se modifica, passando de vários folículos induzindo o declínio de FSH, para apenas um folículo fazendo este papel (WEBB et al., 1999). De acordo com Ginther et al. (2001c), no início do desvio folicular ocorrem alterações no desenvolvimento do maior folículo que o tornam responsivo a baixas concentrações de FSH, as quais são inadequadas para o desenvolvimento dos outros folículos. O declínio transitório das concentrações de FSH, próximo ao momento do desvio, é considerado componente chave do mecanismo de desvio folicular, provado pelos dados que mostram que vacas com 2 a 3 folículos co-dominantes apresentaram concentração de FSH aumentada horas antes do momento esperado do desvio (LOPEZ et al., 2005).

Alguns trabalhos utilizando tratamentos com FSH no início do desenvolvimento folicular demonstraram que qualquer folículo saudável ou em crescimento é capaz de se tornar dominante (ADAMS et al., 1993). Baseado nisso, os protocolos de superovulação com FSH para colheita de embriões foram criados. A administração de FSH no início da onda folicular ou de anti-soro contra inibina impede ou atrasa a desvio folicular, culminando no desenvolvimento de mais de um folículo dominante (GINTHER et al., 2000b).

Além disso, após o desvio, quando se aspira o folículo dominante, o subordinado toma seu lugar como dominante mediante um aumento de concentração de FSH (KO et al., 1991; GINTHER et al., 2000b). Do mesmo modo, é possível direcionar para a dominância um folículo pequeno (5 mm) no início da onda, por meio de aspiração de todos os demais folículos (GIBBONS; WILTBANK; GINTHER, 1997). Entretanto, o potencial de um folículo subordinado em adquirir dominância depende do seu diâmetro no momento da aspiração do dominante e decresce progressivamente quanto menor o folículo, (GINTHER, BERGFELT, 2001b).

Por meio de estudos *in vitro*, verificou-se a influência do FSH na produção de E2, IGF-1, ativina-A e inibina-A (GINTHER, BEG, KOT, 2003). Acredita-se que quanto maior a concentração de E2 e inibina, menor a liberação de FSH pela hipófise (GINTHER et al., 1996). A produção de E2 e inibina, sobretudo pelas células da granulosa do folículo dominante, atua inibindo a liberação de FSH pela hipófise anterior (FINDLAY; CLARKE, 1986). Tudo indica que estes hormônios são os principais responsáveis pela supressão das concentrações sistêmicas de FSH para níveis abaixo do limiar necessário para manter o crescimento dos folículos subordinados, ocasionando sua atresia (DRIANCOURT, 1991).

Também o FSH parece ter um papel importante na indução da ativação ou formação da PAPP-A, pelo folículo

2.2.3 LH

Muitos trabalhos sugerem a participação do LH como iniciador do processo de desvio folicular. Em novilhas, as concentrações de LH aumentam entre 32 e 24 h antes do desvio, período após o qual o folículo passa a responder ao LH em detrimento do FSH, as concentrações se mantêm elevadas por 48 h, só então iniciam seu declínio (KULICK et al., 1999; GINTHER, BEG, 2001). Um pequeno, porém significativo, aumento de LH ocorre tanto na primeira quanto na segunda onda do ciclo estral, ao redor do início do desvio folicular (KULICK et al., 2001).

Existem evidências na literatura de que a aquisição de receptores de LH (LHr) é o primeiro passo para a manutenção do folículo selecionado após a diminuição nas concentrações sanguíneas de FSH. As células da teca expressam receptores de LH desde cedo em folículos pré-antrais a pré-ovulatórios (XU et al., 1995; BAO et al., 1997; BAO; GARVERICK, 1998; BEG et al., 2001; LUO et al., 2011). Embora esteja claro que a expressão de LHr ocorre também em células da granulosa de folículos dominantes (XU et al., 1995; BAO et al., 1997), há alguma controvérsia sobre o momento em que essas células começam a expressar receptores funcionais de LH e se estes são necessários para dar suporte ao crescimento do folículo dominante no momento do desvio.

Xu et al. (1995) demonstraram que RNAm para LHr começam a ser expressos nas células da granulosa no dia 4 da onda folicular em folículos a partir de 9 mm de diâmetro, estando ausentes em folículos dia 2 da onda. Posteriormente, BAO et al. (1997) comprovaram o achado anterior e observaram que em folículos maiores de 13,0 e 15,0 mm, a expressão de RNAm para LHr (detectáveis pela hibridização in situ) nas células da granulosa destes folículos foi 2 e 4 vezes maior, respectivamente, quando comparado a folículos de 10,8 mm de diâmetro.

Existem vários trabalhos que relatam sua detecção em células da granulosa de folículos dominantes, entretanto, alguns trabalhos não conseguem o mesmo resultado em diferentes diâmetros de folículo (FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004; NOGUEIRA et al., 2007). Pode-se citar como exemplo o trabalho de Evans et al. , no qual os autores demonstram aumento na concentração de E2 no folículo dominante em relação ao subordinado nos dias 2 (8,0 mm) e 3 (9,7 mm) do ciclo estral, porém, não encontraram níveis detectáveis de RNAm para LHr nas células da granulosa destes folículos.

Esta variação ocorre principalmente pelos delineamentos, bem como técnicas de análise e coleta de dados diferentes entre os trabalhos, o qual muitos deles utilizam técnicas menos sensíveis de detecção tanto dos genes alvo quanto de codificação de proteínas (FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004) além de sequências diferentes utilizadas como primers (NOGUEIRA et al., 2007).

A RT-PCR é um método *in vitro* utilizado para amplificar enzimaticamente determinadas sequências de RNA, sendo a técnica mais sensível para a detecção e quantificação de determinadas sequências de RNAm atualmente disponível. Comparada com as outras técnicas comumente usadas para quantificar RNAm, a RT-PCR pode ser utilizada para a quantificação de RNAm em amostras muito menores (ALMEIDA et al., 2010). A abundância de RNAm de LHr, medida por PCR em tempo real foi maior em células da granulosa do maior folículo da onda em comparação com o segundo maior folículo antes do desvio morfológico, sugerindo que a aquisição de responsividade ao LH pelas células da granulosa é parte do processo de desvio (BEG et al., 2001).

Outros estudos utilizando hibridização *in situ*, não conseguiram detectar RNAm de LHr em células da granulosa no momento esperado do desvio folicular (EVANS et al., 1997; FORTUNE et al., 2001; GARVERICK et al., 2002), o que corrobora resultados de estudos anteriores, que mostraram ligação de LH às células da granulosa apenas nos folículos com dominância estabelecida (IRELAND; ROCHE, 1982; WEBB; ENGLAND, 1982).

Sartori et al. (2001) mostraram que, folículos de 7,0 a 8,5 mm de vacas HPB lactantes não possuíam capacidade ovulatória a altas doses de LH (40 mg, i.m.), e a ovulação foi efetiva somente em folículos com mais de 10 mm de diâmetro. Sugerem que embora um aumento do LHr nas células da granulosa, seja necessário para a aquisição de dominância folicular, somente este aumento não é suficiente para a capacidade ovulatória. Da mesma forma, tratamento i.m. com 25 mg de LH em novilhas *Bos indicus* foi capaz de induzir ovulação em 33, 80 e 90% dos folículos com diâmetros entre 7 e 8,4, 8,5 e 10, e > 10 mm, respectivamente (GIMENES et al., 2008). Tal mecanismo, ainda não elucidado, parece ser decorrente de um aumento na quantidade de LHr, associado a alterações nas vias de sinalização intracelular que o LHr possui na fase pós desvio.

Como anteriormente citado, a expressão gênica do receptor de LH nas células da granulosa, pode ser detectada em folículos com cerca de 8 mm (BAO et al., 1997), mas não em folículos menores ou subordinados. Luo et al. (2011) mostraram que o mRNA para receptor de LH foi cerca de oito vezes maior no maior folículo do que no segundo maior no dia equivalente ao desvio e aumentou com o passar das horas. Outro estudo mostrou que o

aumento de expressão do receptor de LH ocorre cerca de 8 h antes do tempo esperado para o desvio (BEG et al., 2001).

Enquanto alguns autores sugerem ser o início da expressão do LHr, nas células da granulosa, a causa para a aquisição da dominância folicular (GINTHER, BEG, DONADEU, 2003), outros afirmam ser um evento decorrente da dominância já instalada (AUSTIN et al., 2001; FORTUNE et al., 2001). Fortune et al. (2001) não detectaram a expressão do LHr, no futuro folículo dominante imediatamente antes da seleção folicular. A primeira diferença observada entre os maiores folículos (dominante e subordinado) foi a indução, mediada pelo FSH, da protease da IGFBP-4, a PAPP-A (MONGET et al., 2003), que possibilita aumento de IGF-1 livre (biodisponível) que, em sinergismo com o FSH, induziria ao aumento da síntese de E2 e do crescimento folicular (seleção folicular).

Em fêmeas bovinas, inúmeras pesquisas acerca desta fase crítica do desenvolvimento folicular foram e estão sendo realizadas, no entanto utilizando-se apenas animais de raças europeias em seus modelos experimentais. A grande maioria do rebanho de corte brasileiro é composta por animais zebuínos ou cruzados e trabalhos anteriores avaliando o crescimento folicular monitorado por ultrassonografia foram efetivos em demonstrar diferenças, sobretudo no que se refere ao diâmetro folicular (FIGUEIREDO et al., 1997; GIMENES, 2006; GIMENES et al., 2008; SARTORI et al., 2010; BASTOS, 2012).

Em folículos de ovários de vacas Nelore, oriundos de abatedouro, Nogueira et al. (2007) demonstraram que apenas uma das amostras (n = 6) de folículos com 7 mm apresentou expressão de LHr nas células da granulosa, enquanto que em folículos ≥ 8 mm, a ocorrência foi 87,5%. Dados atuais de Simões et al. (2012) utilizando ovários de abatedouro provenientes de vacas Nelore, com quatro diferentes isoformas de receptor de LH, mostraram aumento na expressão conforme aumento do diâmetro, utilizando folículos a partir de 8 mm.

A maioria dos trabalhos sobre a expressão de receptores para gonadotrofinas, com enfoque no momento do desvio de crescimento folicular, utilizou como modelos experimentais *Bos taurus taurus*. Portanto, faltam informações a respeito da expressão de receptores para LH, nesta fase distinta da dinâmica folicular em fêmeas *Bos taurus indicus*.

O mecanismo completo que leva à seleção ou desvio no diâmetro não está completamente definido, mas parece estar claramente associado à aquisição de LHr pelas células da granulosa, ao aumento da concentração circulante de estradiol-17 β e ao decréscimo na concentração de FSH.

2.2.4 Inibina e Ativina

As frações proteicas do fluído folicular, que incluem as inibinas, são capazes de produzir modificações nas concentrações de FSH circulante (ADAMS et al., 1993; GINTHER, BERGFELT, 2001a). As inibinas são glicoproteínas diméricas (α e β), produzidas pelas células da granulosa de folículos em crescimento e podem ser encontradas em vários pesos moleculares diferentes, dependendo da forma de apresentação com ou sem alguma das subunidades (MIHM; AUSTIN, 2002). Formas de ativina e inibina sintetizadas pelas células da granulosa e estão envolvidas na produção de andrógenos pelas células da teca (FINDLAY, 1993).

A produção de E2 e inibina, sobretudo pelas células da granulosa do folículo dominante, atua inibindo a liberação de FSH pela hipófise anterior (FINDLAY; CLARKE, 1986; GOOD et al., 1995). Além do efeito sistêmico relacionado à supressão na liberação de FSH, a possível ação local da inibina durante o desvio folicular ainda é bastante controversa.

Kaneko et al. (1995; 1997) relataram que a concentração circulante total de inibina aumenta concomitantemente com a emergência das ondas e com o aumento do E2. Observaram também que o tratamento com uma substância anti-inibina 5 d após o estro (aparentemente após o início do desvio) resultou em um aumento do FSH (KANEKO et al., 1997), sugerindo que a inibina deve participar na diminuição das concentrações circulantes de FSH que ocorre após o desvio folicular nos bovinos (GINTHER, BEG, 2001).

Em novilhas, não foram observadas quaisquer diferenças nas concentrações de folistatina, inibina-A e várias outras formas de inibina com diferentes pesos moleculares no fluído folicular dos três maiores folículos (MIHM et al., 2000).

Em outro estudo, usando o momento do esperado início do desvio como referência (8,5 mm), também não houve diferença na quantidade total de inibina e inibina-A entre o folículo dominante e o maior subordinado (BEG et al., 2001). Por outro lado, Austin et al. (2001) observaram aumento significativo de formas precursoras da inibina (> 48 kDa) no maior folículo, porém apenas no início da onda (5 a 33 h após o pico de FSH), mantendo-se igual nos quatro maiores folículos após o desvio folicular e queda na concentração de FSH.

Ginther et al. (2002) ao promoverem ablação do futuro folículo dominante no momento esperado do desvio (8,5 mm), observaram que o segundo maior folículo tornou-se dominante e dentre as diversas modificações que sofreu, detectou-se um ligeiro aumento de Ativina-A no fluído deste folículo. As implicações deste aumento na concentração de Ativina-A no segundo maior folículo, que se tornou dominante, ainda precisam ser investigadas em estudos subseqüentes. A atividade supressora da inibina sobre a secreção de FSH tem sido demonstrada tanto por um aumento nas concentrações de FSH após a ablação de folículos

(GINTHER et al., 2000b), como pela diminuição do FSH após tratamento com frações protéicas do fluído folicular (BERGFELT et al., 2000). Além disso, a administração de anti-soro contra inibina aumenta a concentração plasmática de FSH, bem como o número de folículos grandes e ovulações (GINTHER et al., 2000b).

Em resumo, a inibina parece ser o principal agente responsável pela supressão sistêmica do FSH durante a fase de crescimento que antecede o desvio folicular nos bovinos. Entretanto, as concentrações sanguíneas de E2 aumentam próximo ao início do desvio e, possivelmente, tanto a inibina quanto o E2 contribuem para o contínuo declínio nas concentrações circulantes de FSH após o desvio

2.2.5 Sistema IGF

O sistema IGF inclui IGF-1 e -2, IGFBPs (IGF ligado a proteína) e IGFBP proteases (SPICER, 2004). O IGF-1 estimula a proliferação das células da granulosa em ação sinérgica com as gonadotrofinas, promove a diferenciação das células foliculares em estágios iniciais, além de, *in vitro*, estimular a produção de E2 (SPICER; ECHTERNKAMP, 1995; GLISTER et al., 2001). Aumenta também a sensibilidade das células da granulosa ao FSH (MONGET; MONNIAUX, 1994; SPICER; ECHTERNKAMP, 1995) e a produção de androgênios pelas células da teca (STEWART et al., 1995).

Aparentemente, o IGF-1 é capaz de exercer ação parácrina tanto nas células da teca quanto da granulosa, favorecendo o crescimento e a função esteroidogênica das mesmas (STEWART et al., 1995). GINTHER et al. (2004) ao injetarem IGF-1 no interior do maior folículo subordinado, no momento esperado do desvio, 3-6 h depois observaram aumento das concentrações intra-foliculares de E2 e 3-12 h após, de androstenediona, indicando que o IGF-1 atua, direta ou indiretamente por meio do aumento dos andrógenos, aumentando assim a produção de esteroides no folículo dominante.

A maioria dos trabalhos (MONGET; MONNIAUX, 1994; SPICER; ECHTERNKAMP, 1995) indica que as IGFBPs inibem as ações das gonadotrofinas no crescimento e diferenciação folicular. Portanto, mudanças nas concentrações intra-foliculares de IGFBPs podem causar alterações na biodisponibilidade de IGFs e consequentemente, aumentar ou diminuir as ações das gonadotrofinas nas células foliculares.

As proteases degradam as IGFBPs causando aumento na biodisponibilidade de IGF-1 nos folículos. Em bovinos, antes do diâmetro de desvio, ocorre um aumento desta atividade proteolítica no maior folículo enquanto no segundo maior aumenta a concentração de IGFBPs (RIVERA; FORTUNE, 2003). Portanto, uma baixa concentração de IGFBP-4 forneceria

grandes quantidades de IGF-1 biodisponível para ser utilizado como promotor de crescimento pelo folículo, amplificando os efeitos de FSH e promovendo um aumento na produção de E2. Essa concentração reduzida de IGFBP-4 está relacionada a uma maior degradação específica dessa proteína ligadora por uma enzima proteolítica, denominada de proteína sérica A associada a prenhez (PAPP-A) (MONGET et al., 2003) presente nos folículos dominantes desde a fase de recrutamento até o momento pré-ovulatório (FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004).

Beg et al. (2001) relataram que as concentrações de IGF-1 livre não se alteram quando o maior folículo está crescendo de 7,5 a 11,2 mm. Entretanto, neste mesmo período, as concentrações de IGF-1 livre diminuem progressivamente no segundo maior folículo, à medida que a proteína ligante IGFBP-2 aumenta, contribuindo para a redução ou parada de crescimento deste folículo. Os mesmos autores sugeriram que a baixa concentração de IGFBP-2 no folículo dominante, está associada à inibição da expressão do RNAm para IGFBP-2, induzida pelo FSH.

Além da participação das IGFBPs no controle da biodisponibilidade de IGF-1, Rivera e Fortune et al. (2001) chamaram a atenção para a importância das proteases que degradam as IGFBPs, ao constatarem que o folículo subordinado possui cerca de seis vezes mais IGFBP4 do que o folículo dominante e o futuro folículo dominante apresentou altas concentrações da enzima IGFBP-4 protease, responsável pela degradação da IGFBP-4 e IGFBP-5 (RIVERA ; FORTUNE, 2003). Rivera e Fortune (2003) confirmaram a hipótese que o aumento de FSH que precede a emergência da onda folicular induziria, no futuro folículo dominante, o aumento na atividade da IGFBP-4 protease, com consequente diminuição da IGFBP-4 e 5, e aumento da disponibilidade de IGF-1, que por sua vez, em sinergismo com o FSH, promoveria aumento de E2 e da taxa de crescimento do folículo dominante.

Austin et al. (2001) também propuseram que as primeiras mudanças intrafoliculares que distinguem o folículo, destinado a tornar-se dominante, dos outros folículos da população em crescimento, seria a capacidade aumentada em produzir E2 e a manutenção de baixas concentrações de IGFBPs. Corroborando essa hipótese, Fortune et al.(2001) , não detectaram a expressão do LHr, no futuro folículo dominante, imediatamente antes da seleção folicular. A diferença observada, entre os maiores folículos do grupo (futuro dominante e subordinados), foi a indução da protease IGFBP-4, mediada pelo FSH.

Santiago et al.(2005) relataram que folículos dominantes pré-ovulatórios possuem expressão de mRNA semelhante, para IGFBP3 e 4, e no que diz respeito à PAPP-A, não mostrou diferença significativa na expressão de RNAm para PAPP-A em folículos pré-

ovulatórios ($18,3 \pm 1,5$ mm) quando comparados a folículos subordinados ($8,0 \pm 1,5$ mm) cerca de 8 dias após a ovulação.

Um trabalho de Luo e colaboradores (2011), mostrou que, após um desafio de LH em vacas com folículos próximos ao momento do desvio, a expressão de PAPP-A nas células da granulosa, aumentou significativamente no maior folículo 24 horas após o tratamento, quando comparado ao segundo maior folículo.

Portanto, neste modelo o evento crítico da seleção é a indução, pelo FSH, de uma protease para a IGFBP-4 em um dos folículos recrutados. Esta seleção bioquímica (aumento da IGFBP-4 protease) é rapidamente seguida pela seleção morfológica (ou desvio folicular) e posteriormente pela diferenciação do folículo dominante.

3 EXPERIMENTO 1

3.1 Objetivos

Avaliar o crescimento folicular, mediante aspiração do maior folículo (F1), principalmente no que diz respeito ao comportamento do segundo maior folículo da onda (F2).

Avaliar a variação na concentração circulante de FSH durante as primeiras 24 horas, após a aspiração do maior folículo presente no ovário.

3.2 Hipóteses

Após a aspiração do primeiro maior folículo, o segundo maior deverá ser capaz de manter seu crescimento folicular estável e se tornar o folículo dominante, e ainda, neste momento deve ocorrer um aumento da concentração plasmática de FSH a partir do momento da aspiração que justifica esse fenômeno.

3.3 Material e Métodos

3.3.1 Animais e sincronização da onda folicular

Foram utilizadas 15 vacas HPB e 18 vacas NEL não-lactantes com escore de condição corporal (média $\pm$ desvio padrão) $2,9 \pm 0,4$ e $3,4 \pm 0,4$ respectivamente, peso corporal (PC) $548,45 \pm 80,0$ e $455,25 \pm 78,3$ e idade de 3 a 6 anos. Foram alojadas em baias aos pares, sem acesso a pastagem, com água à vontade e o sal mineral foi fornecido na dieta. A dieta foi formulada de modo a atender as necessidades de manutenção do peso e condição corporal.

As vacas foram contidas em brete de contenção manual, onde foi realizada a limpeza da ampola retal e da região perineal com água, sabão, álcool 70° e utilizando papel toalha para secagem. Procedeu-se a anestesia epidural, realizada no espaço entre a última vértebra sacral e a primeira coccígea, utilizando um volume de 3 a 5 mL de lidocaína a 2% sem vaso constritor (Anestésico L®, Pearson).

Dado o tempo de ação do anestésico, as vacas, em dias aleatórios do ciclo, tiveram suas ondas foliculares sincronizadas por meio de aspiração folicular guiada por ultrassom (probe microconvexa 7,5 MHz de frequência, Mindray DP-2200Vet, China, Guia de aspiração folicular, WTA, Cravinhos, SP, Brasil). Folículos maiores que 5 mm foram aspirados até o colapso total do antro, por meio de um sistema com linha de teflon de 1,7 mm de diâmetro e

80cm de comprimento (Linha de Aspiração WTA, Cravinhos, SP, Brasil), acoplada a uma agulha descartável 20 gauge (WTA, Cravinhos, SP, Brasil), inseridos na guia de aspiração. O sistema de aspiração foi submetido à pressão negativa por meio de seringa descartável de 60 mL. Este foi considerado o Dia 0 (D0).

Após isso, foi inserido um implante auricular de Norgestomet (Crestar®, MSD, São Paulo, SP, Brasil), um análogo de P4, com o objetivo de facilitar o procedimento de aspiração, bem como, evitar oscilação na pulsatilidade de LH ao longo do crescimento folicular da mesma forma exercida pelo implante intravaginal de P4. Além disso, as vacas receberam duas doses de PGF2 α (0,5 mg, Cloprostenol Sódico, Sincrocio®, Ouro Fino, Cravinhos, SP, Brasil) com 12 h de intervalo, associadas ao acompanhamento da regressão do CL via ultrassonografia.

3.3.2 Exames ultrassonográficos e dinâmica folicular

Foram feitos exames ultrassonográficos ovarianos transretais utilizando-se uma probe linear de 7,5 MHz duas vezes ao dia a partir do D2, após a aspiração até a aplicação dos tratamentos. Para as avaliações da dinâmica folicular, todos os folículos presentes eram localizados e medidos.

3.3.3 Distribuição dos tratamentos

Com base em resultados preliminares, foi determinado um tamanho médio do maior folículo (F1) em crescimento nos ovários de 8,5 mm para HPB e 6,5 mm para NEL para início da aplicação dos tratamentos de forma aleatória. Portanto, a partir da dinâmica folicular, foi aspirado F1 ao atingir 8,5 mm em vacas HPB ou 6,5 mm em vacas NEL até o colapso total do antro, sendo este tratamento denominado Aspiração (ASP); no outro tratamento, denominado Controle (CON), as vacas apenas eram submetidas ao acompanhamento da dinâmica folicular. As análises ultrassonográficas dos folículos remanescentes (F2 e F3), bem como de todos os folículos do grupo CON, foram mantidas até 48h após a aplicação dos tratamentos.

3.3.4 Colheita de sangue e dosagens hormonais

No momento em que, para ambos os tratamentos, os maiores folículos presentes atingiram os tamanhos de 8,5 mm (HPB) e 6,5 mm (NEL), realizaram-se colheitas de sangue seriadas nos momentos 0, 6, 12 e 24 h após a ultrassonografia, para posterior dosagem

hormonal de FSH por meio de um kit de radioimunoensaio (RIE) já validado no Laboratório de Endocrinologia, Departamento de Apoio e Produção em Saúde Animal, UNESP, Araçatuba, SP, Brasil.

Foram colhidos, aproximadamente 10 mL de sangue da veia jugular utilizando um tubo heparinizado e imediatamente refrigerado até o momento da centrifugação. O sangue foi centrifugado a 1700 x g por 15 min, e o sobrenadante foi armazenado a -20°C até a realização do ensaio.

A concentração de FSH foi avaliada por RIE validado para FSH bovino conforme metodologia utilizada por Castilho et al. (2007). A sensibilidade do ensaio foi de 0,01 ng/ml e os coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio foram 11,9% e 18,5%, respectivamente.

3.3.5 Análise Estatística

O experimento foi realizado em *cross-over*, onde imediatamente após o fim da primeira etapa, as vacas eram submetidas ao tratamento oposto. Ao final das duas rodadas, todas as vacas passaram pelos dois tratamentos. Não houve necessidade de período de descanso entre as duas etapas, visto que, ao início de cada réplica as vacas eram sincronizadas por meio de aspiração, eliminando todos os folículos remanescentes.

Dos resultados obtidos, 5 vacas foram retiradas da análise por apresentarem codominância tanto de F1 em relação F2 e F3 no grupo controle, quanto F2 em relação ao F3 no grupo ASP.

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk.

Foram incluídos no modelo os efeitos fixos de raça, rodada, tratamento e folículo (trat*fol), tempo, interação trat*fol*tempo e interação trat*fol*rod. As variáveis que não apresentaram interação foram retiradas do modelo estatístico ($P < 0,10$). Vaca foi colocada como efeito aleatório.

Os dados de contínuos de dinâmica folicular e concentração de FSH em medidas repetidas no tempo foram analisados por regressão logística utilizando o método PROC MIXED do SAS versão 9.3 (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC) com modelos respeitando uma distribuição de Gauss. Quando o teste F detectou diferença significativa $\leq 0,05$ as médias foram divididas utilizando o comando SLICE no SAS.

As comparações foram realizadas por meio das médias ajustadas pelo método dos quadrados mínimos e estão apresentadas na forma de média dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão, com as distribuições nas escalas originais.

3.4 Resultados

Os resultados de dinâmica folicular estão apresentados nas figuras 3, 4 e 5.

Nas vacas HPB, como observado na figura 3A, o grupo CON manteve seu padrão de crescimento folicular normal com início de desvio em média com $8,78 \pm 0,35$ mm, somente apresentando diferença entre os dois maiores folículos (F1 = $9,95 \pm 0,35$ e F2 = $8,27 \pm 0,35$ mm) 12 h após o momento do desvio ($P = 0,0004$). Na Figura 3B, não foi observada diferença entre os diâmetros de F1 no momento da aspiração e do F2 12 h após, no grupo ASP (F1 = $8,82 \pm 0,39$; F2 = $8,16 \pm 0,36$ mm; $P = 0,19$). Entretanto, em relação ao F3, obteve-se diferença significativa ($P = 0,001$) a partir de 12 h.

Figura 3. - Representação do diâmetro folicular dos três maiores folículos (F1, F2 e F3) de -12 h até 48 h em relação ao momento do desvio nos grupos CON e ASP para vacas holandesas. Dados apresentados na forma de média dos quadrados mínimos $\pm$ EP. * $P \leq 0,05$

Na raça NEL (Figura 4A), para o grupo CON, não foi detectada diferença no diâmetro entre os dois maiores folículos em 0 h (F1 = $6,76 \pm 0,21$; F2 = $6,40 \pm 0,21$; $P = 0,21$). Porém, no momento 12 h houve diferença ($P = 0,001$) entre F1 e F2 (F1 = $7,39 \pm 0,21$ vs F2 = $6,69 \pm 0,20$ mm) assim como com o F3 ($P = 0,03$; F3 = $6,32 \pm 0,21$).

Na Figura 4B, não foi observada diferença entre os diâmetros de F1 no momento da aspiração e do F2 12 h após, no grupo ASP (F1 = $6,93 \pm 0,21$; F2 = $6,94 \pm 0,21$ mm; $P = 0,96$). Entretanto, em relação ao F3, obteve-se diferença ($P = 0,03$) a partir de 12 h.

NEL

Figura 4 - Representação do diâmetro folicular dos três maiores folículos (F1, F2 e F3) de -12 h até 48 h em relação ao momento do desvio nos grupos CON (A) e ASP (B) para vacas Nelore. Dados apresentados na forma de média dos quadrados mínimos $\pm$ EP. * $P \leq 0,05$

A figura 5 mostra a comparação entre o F2 do grupo ASP e o F2 do grupo controle. O F2 do grupo ASP apresentou maior diâmetro ($P < 0.0001$) em relação ao F2 do grupo CON a partir de 24 h após o momento do desvio, em vacas NEL (F2 ASP = $7,88 \pm 0,21$ vs F2 CON = $6,71 \pm 0,20$ mm), enquanto para vacas HPB obteve-se uma tendência em diferir ($P = 0,07$) a partir de 12 h (F2 ASP = $9,14 \pm 0,36$ vs F2 CON = $8,27 \pm 0,35$ mm), e em 24 h (F2 ASP = $9,90 \pm 0,36$ vs F2 CON = $8,21 \pm 0,35$ mm) se tornou diferente de forma significativa ($P = 0,0007$).

Figura 5 - Comparação da dinâmica folicular em HPB e NEL, do F2 do grupo ASP com o F2 do grupo CON, objetivando verificar as diferenças nos padrões de crescimento entre eles. O F2 do grupo CON demonstrando o comportamento de um folículo que sempre foi subordinado desde sua emergência. Por outro lado, F2 do grupo ASP demonstra como o folículo se comporta na ausência de F1, aquele que possuía vantagem morfológica desde a emergência. Dados apresentados na forma de média dos quadrados mínimos $\pm$ EP. * $P \leq 0,05$. ** $P \leq 0,10$, considerado tendência

Os resultados das concentrações plasmáticas de FSH estão apresentados na figura 6. Não houve efeito de raça para as concentrações plasmáticas de FSH ($P \geq 0,05$) e por isso esta

variável foi retirada do modelo estatístico. Houve efeito de interação trat*hora ($P = 0,04$) sendo o momento 12 h do grupo ASP o único momento que diferiu ($P = 0,01$) das demais horas e em relação ao grupo controle.

Figura 6 - Concentração plasmática de FSH para os dois grupos (ASP e CON) ao longo das horas após o momento do desvio e/ou aplicação dos tratamentos (0, 3, 6, 12 e 24 h). Dados apresentados na forma de média dos quadrados mínimos $\pm$ EP. * $P \leq 0,05$

Conforme demonstrado nas Figuras 2B e 3B, 12 h após a aspiração do F1 ASP, ocorre o crescimento contínuo do folículo outrora subordinado (F2 ASP) de forma que neste momento ele não apresenta diferença significativa com o F1 ASP em 0 h. Atrelado a isso, os resultados apresentados na Figura 5, mostram aumento no FSH plasmático destes animais do grupo ASP no momento 12 h, aumento este que não esteve presente nem às 3 e nem às 6 h após a ablação do F1. Por sua vez, no grupo CON não há diferença alguma no perfil plasmático de FSH, ao longo das horas após o maior folículo atingir o tamanho de início de desvio.

4 EXPERIMENTO 2

4.1 Objetivos

Validar um modelo de obtenção das células da granulosa *in vivo*, sem a necessidade de ovariectomia, utilizando genes marcadores do desvio folicular.

Verificar a expressão de Aromatase, LHr e PAPP-A nas células da granulosa nos diferentes momentos do desvio: no momento em que o maior folículo (FD0h e FS0h) atinge o tamanho indicativo de desvio, 12 h após o início do mecanismo de desvio (FS→FD) e 12 h após o tamanho indicativo de desvio (FD12h e FS12h).

4.2 Hipóteses

Lavagem do folículo para aquisição de células da granulosa permite a obtenção de RNA suficiente para realização de análises de PCR para os genes PAPP-A, Receptor de LH e enzima aromatase.

A concentração de E2 é alta nos folículos dominantes (FD0h e FD12h) entretanto, intermediário no folículo subordinado que se torna dominante (FS→FD) e mais baixa que os demais nos folículos subordinados (FS0h e FS12h).

A concentração de P4 estará aumentada nos folículos subordinados (FS0h e FS12h) diminuída nos folículos dominantes (FD0h e FD12h). Já nos folículos de transição (FS→FD) estará em concentração intermediária aos demais.

O LHr está mais expresso em folículos dominantes (FD0h e FD12h) e que com a aspiração do maior folículo (FD0h) o segundo maior (FS→FD) alcança expressão relativa semelhante cerca de 12h depois e menor que um folículo que já possui 12hs pós-desvio (FD12h).

A PAPP-A aumenta no folículo subordinado que se torna dominante (FS→FD), dando início ao mecanismo de desvio, e permanece semelhante nos folículos dominantes (FD0h e FD12h) enquanto permanece baixa em folículos subordinados (FS0h e FS12h).

A expressão de CYP19A1 permanece aumentada nos folículos dominantes (FD0h, FS→FD e FD12h) e nos subordinados (FS0h e FS12h) permanece baixa e semelhante entre si.

4.3 Material e Métodos

4.3.1 Animais e sincronização da onda folicular

O experimento foi realizado nas mesmas condições do experimento 1 nas dependências da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP, no Departamento de Zootecnia. As vacas foram submetidas à mesma dieta de manutenção e mesmas condições ambientais. Foram utilizadas inicialmente 14 vacas adultas, não lactantes da raça Nelore, de 3 a 6 anos de idade, com ECC (média $\pm$ desvio padrão) de $3,4 \pm 0,4$ e peso corporal $455,25 \pm 78,3$.

No início de cada etapa os folículos ovarianos maiores que 5 mm foram aspirados e posteriormente as vacas receberam dispositivos de P4 intravaginais (CIDR®, Zoetis, Brasil) e duas aplicações de PGF2 α com 24 h de intervalo. Foi realizada ultrassonografia transretal duas vezes ao dia com 12 h de intervalo a fim de fazer a dinâmica folicular, onde todos os folículos presentes no ovário foram localizados e medidos.

4.3.1 Distribuição dos tratamentos

Neste experimento foi utilizada metodologia similar ao experimento 1. No momento em que o maior folículo obteve 6,5 mm de diâmetro, os animais foram divididos entre os tratamentos de maneira aleatória. No momento 0h, quando o maior folículo atingiu 6,5 mm (FD0h), foi aspirado e lavado, juntamente com o segundo maior folículo (FS0h); no momento 12h, quando os dois maiores folículos (FD12h e FS12h) foram aspirados e lavados somente 12h após o maior folículo atingir 6,5 mm; e o grupo desvio, onde o maior folículo (FD0h) foi aspirado e lavado quando atinge 6,5mm, e o segundo maior folículo (FS→FD) 12h depois do momento do início esperado do desvio.

4.3.2 Obtenção das Células da Granulosa

Utilizou-se um dispositivo adaptado a uma guia de aspiração folicular guiada por ultrassom (probe microconvexa 7,5 MHz de frequência, Mindray DP-2200Vet, China, Guia de aspiração folicular, WTA, Cravinhos, SP, Brasil) baseado na técnica utilizada por Kot, Gibbons e Ginther (1995), por meio de um sistema de dupla via, acoplado a uma seringa de 3 mL.

Após a limpeza da região perineal, o transdutor foi posicionado de maneira a permitir a visualização do folículo a ser aspirado, bem como o alinhamento com a agulha, que foi direcionada para a cavidade do folículo. O conteúdo folicular foi aspirado aos poucos (0,2 mL

por vez), e simultaneamente foi injetado 0,2 mL por vez de solução fisiológica contendo 100 UI/mL de heparina, totalizando em torno 1 mL de solução para lavagem de cada folículo. A lavagem foi monitorada via ultrassonografia, observando o turbilhonamento do líquido injetado na cavidade folicular. A cada aspiração a agulha era trocada e o sistema era lavado utilizando duas seringas de 10 mL de solução fisiológica com heparina, intercaladas com 10 mL de álcool 70° e por fim 120 mL de ar para secagem do sistema. Antes da próxima aspiração o sistema era preenchido com solução fisiológica e acoplado a uma nova seringa de 3 mL para a aspiração do próximo folículo. Na outra extremidade do sistema, ficava outra seringa de 3 mL contendo a solução fisiológica a ser injetada no próximo folículo.

A suspensão obtida foi colocada em um eppendorf e imediatamente refrigerada para ser levada ao laboratório para processamento da amostra. No laboratório, os eppendorfs foram centrifugados a 1200 X g por 1 min a fim de formar um pellet de células da granulosa, o sobrenadante foi dividido em duas alíquotas e congelado para posterior dosagem de E2 e P4.

Com o objetivo de verificar a presença de uma quantidade de células que permitisse a extração de RNAm suficiente para realizar o RT-PCR e fiscalizar a eficiência de recuperação das células por meio desta técnica. Foi realizada uma contagem de células semelhante à que é feita para células sanguíneas por meio de uma câmara de Neubauer. O pellet de células da granulosa foi ressuspensionado em 400 µL de DMPBS, homogeneizado em vórtex e 10 µL desta suspensão foi depositado em cada lado de uma câmara de Neubauer para contagem de células. As células foram contadas em ambos os lados nos quatro quadrados maiores. O número contado foi calculado para quantidade total obtida. Estes valores foram comparados posteriormente ao tamanho do folículo e concentração de RNA obtida.

Após a contagem, a suspensão foi novamente centrifugada. O sobrenadante foi dispensado e o pellet novamente ressuspensionado, mas desta vez em 500 µL de tampão de lise (primeiro passo do protocolo do kit RNeasy mini kit, Qiagen®) e armazenado a -80°C até a realização da extração.

4.3.3 Extração de RNA e transcrição reversa

O RNAm das células da granulosa foi extraído utilizando o kit RNAeasy® (Qiagen). As concentrações das amostras de RNA total foram mensuradas por espectrofotometria NanoDrop® (Thermo Scientific). A fim de evitar que uma eventual contaminação com DNA genômico interferisse nos resultados, todas as amostras de RNA total foram tratadas com DNase antes de serem submetidas ao RT-PCR. Conforme as instruções do protocolo DNase I – Amplification Grade® (Invitrogen), o volume da solução foi calculado a fim de conter no

mínimo 100 ng de RNA. As amostras de células da granulosa foram reversamente transcritas pela enzima Omniscript® (0,2 µL; Qiagen), utilizando oligo-d (T). O protocolo iniciou-se pela adição em tubo estéril de 8 µL da solução de RNA total tratada com DNase, 1 µL de oligonucleotídeo iniciador Oligo dt (500 µg/mL), 1 µL de dNTP Mix (10nM) e 3 µL de água estéril. Essa solução foi incubada à 65°C por 5 min e, em seguida, sofreu uma segunda incubação em gelo por 1,5 min. Após essas etapas, foi adicionado à solução 4 µL de tampão “First Strand” 5X, 1 µL de DTT (0,1 M) e 1 µL de “RNase OUT Inhibitor” (40 unidades/µL). Na sequência, foi acrescido 1 µL (200 UI) de transcriptase reversa e iniciou-se a incubação, primeiramente a 50°C por 50 min, depois a 70°C por 15 min e, finalmente, em gelo por 2 min. As amostras de cDNA produzidas ao final da transcrição reversa (RT) foram mantidas em gelo para utilização imediata na PCR ou armazenadas (-20°C).

4.3.4 Expressão gênica por PCR em tempo real (RT-PCR),

A expressão dos genes alvo foi investigada por ensaio de PCR em tempo real utilizando o sistema de detecção Power SybrGreen® (Applied Biosystems) no equipamento ABI Prism 7500 Sequence Detection System® (Applied Biosystem). Os primers utilizados foram delineados a partir de sequências bovinas disponíveis no banco de dados GenBank. As sequências dos primers, identificação no NCBI (National Center for Biotechnology Information), tamanhos dos fragmentos amplificados, temperatura de anelamento, e concentrações para cada par de primers utilizados nos experimentos são apresentados na Tabela 1. A PCR foi otimizada a fim de obter máxima eficiência de amplificação para cada gene. A expressão dos genes alvo foi realizada a partir de 0,5-1,0 µL de cDNA em reações com volume final de 25 µL, corridas em duplicata.

Tabela 1 - Informações sobre os primers específicos utilizados para o PCR em tempo real.
 Erro! Indicador não definido.

Genes	Sequência	NCBI	Tamanho de Fragmento (bp)	Temperatura de Anelamento (°C)	Concentração (nM)
PPIA	S 5' gccatggagcgcctttgg 3'	XM_005205570	65	60	300
	A 5' ccacagtcagcaatggtgatct 3'				
CYP19A1	S 5' tgaccagatccaaaccagacacca 3'	XM_010809326	182	62	400
	A 5' atgaggttgctaagagtcggc 3'				
PAPP-A	S 5' cagaatgcactgttacctgga 3'	XM_010798824	168	56	300
	A 5' gctgatcccaattctctttca 3'				
LHr (sem distinção de isoforma)	S 5' gggaaatcagcgttgccattga 3'	XM_005212546	204	60	300
	A 5' gcatccacaagcttcagatgttacga 3'				

4.3.5 Análise dos dados de PCR em tempo real

A expressão relativa de cada gene alvo foi calculada utilizando o método $\Delta\Delta C_t$ e foi corrigida pela eficiência de amplificação das reações utilizando-se a equação descrita por Pfaffl (2001). A PPIA foi escolhida como gene de referência para células da granulosa (MACHADO, 2012). Os valores médios de eficiência para cada gene foram calculados pelo perfil de amplificação de 43 amostras individualmente pelo programa LinRegPCR. Para cada primer, a linha de “threshold” foi fixada no ponto médio da janela de linearidade, determinada pelos valores mínimos e máximos de fluorescência.

4.3.6 Dosagens hormonais

As concentrações de E2 e P4 foram mensuradas por meio do método de ELISA (RASMUSSEN et al., 1996) modificado para fluido folicular (BODENSTEINER et al., 1996; GINTHER et al., 1997b) no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Zootecnia, ESALQ, USP. As amostras foram diluídas inicialmente 1:100 em tampão de ensaio (Assay Buffer). O intervalo das concentrações de E2 e P4 utilizadas na curva padrão foi de 0,1563-10 ng/mL. Conforme metodologia utilizada por (GIORDANO et al., 2012), amostras com baixa e alta porcentagem de ligação (menos de 10% e mais de 80% respectivamente) tiveram suas diluições corrigidas para obter uma porcentagem de ligação entre 30 e 60%. O coeficiente de variação intraensaio para E2 foi de 14,0% e para P4 3,35%.

4.3.7 Análise Estatística

Vacas que apresentaram concentração de E2 muito baixas, foram considerados tendo folículos atrésicos e retiradas da análise.

Todos os dados foram testados para normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk, e apresentados na forma de média dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão com as distribuições nas escalas originais. O modelo incluiu efeitos fixos de tratamento e folículo (trat*fol), réplica (rep), tempo, interação trat*fol*tempo, interação trat*fol*rep. A análise foi feita, para todas as variáveis, com o modelo original e as variáveis com valor de $P > 0,10$ foram retiradas do modelo estatístico para avaliação individual.

Os dados contínuos de dinâmica folicular em medidas repetidas no tempo, foram analisados por regressão logística utilizando o método PROC MIXED do SAS versão 9.3 (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC) com modelos respeitando uma distribuição de

Gauss. Quando o teste F detectou diferença significativa $\leq 0,05$ as médias foram divididas utilizando o comando SLICE no SAS.

Os demais dados contínuos de expressão gênica e concentração de hormônios foram comparados por meio das médias ajustadas pelo método dos quadrados mínimos. Diferenças com $P \leq 0,05$ foram consideradas significativas e diferenças com $P > 0,05$ e $\leq 0,10$ foram considerados tendência a significância.

Para expressão gênica, os dados não respeitaram a homogeneidade de resíduos pelo teste Shapiro-Wilk e foram transformados para raiz quadrada para a realização da análise paramétrica pelo teste t do PROC MIXED do SAS.

Com o objetivo de verificar como as variáveis se comportam umas em relação às outras, foi feita o teste de correlação. As correlações foram calculadas pelo método CORR, para compreender as relações entre expressão de PAPP-A, Aromatase, LHr, concentrações de E2 e P4 no fluido folicular, tamanho do folículo no momento da aspiração (diâmetro), contagem de células da granulosa e concentração total de RNAm obtido. Os coeficientes de correlação de Pearson foram considerados para dados com distribuição normal. Para dados transformados, considerou-se as correlações de Spearman, conforme metodologia estatística descrita por Sampaio (1943). Valores de r com $P \leq 0,05$ foram considerados significativos.

4.4 Resultados

Os resultados (média dos quadrados mínimos $\pm$ EP) para os dados de dinâmica folicular estão apresentados na Figura 7. Na Figura 7A observa-se que já havia diferença entre os dois maiores folículos (FD0h e SF0h) no momento da aspiração ($6,89 \pm 0,14$ e $6,02 \pm 0,17$ mm; $P < 0,001$), o que demonstra que de fato, o FD0h já apresentava vantagem morfológica em relação ao FS0h. A figura 7B representa o grupo 12 h (FD12h e FS12h) e mostra que FD12h mantém uma vantagem morfológica em relação ao FS12h desde 12 h antes do momento do desvio ($6,54 \pm 0,26$ vs $5,88 \pm 0,23$ mm; $P = 0,03$) que continua até 12 h depois.

Figura 7 – Padrão de dinâmica dos folículos dominante e subordinado (FD e FS) nos diferentes grupos. Setas representam o momento em que os folículos foram aspirados. (A) Grupo aspirado 0h, no momento em que o maior folículo atinge o tamanho médio de início do desvio (6,5 mm). (B) Grupo aspirado 12h após o momento de desvio. (C) Grupo desvio, aspiração do maior folículo no desvio e 12h depois aspiração do segundo maior. (D) Comparação entre o folículo subordinado que se torna dominante (FS→FD) e o folículo sempre subordinado (FS12h). Trt*Fol = $P < 0,0001$. Hora = $P < 0,0001$. Trt*Fol*Hora = $P = 0,0799$. * $P < 0,05$

A figura 7C mostra o padrão de crescimento de FS→FD, antes e depois da ablação do FD0h, onde pode-se observar que novamente o padrão de crescimento se mantém e o folículo alcança tamanho semelhante ($P = 0,34$) ao FD0h ($7,12 \pm 0,23$ vs $7,05 \pm 0,22$ mm).

Na figura 7D, quando se compara o padrão de crescimento do folículo subordinado (FS→FD) que se tornou dominante após a aspiração do primeiro dominante (FD0h), observa-se um padrão de crescimento semelhante até o momento 0 h, e 12 h depois eles já diferem ($P = 0,03$), demonstrando que de fato, o folículo outrora subordinado, obteve sucesso em desencadear o processo de desvio.

A concentração intrafolicular de E2 (ng/mL) pode ser observada na Figura 7. Nota-se que o FS→FD ($176,9 \pm 48,8$) diferiu ($P \leq 0,02$) de FS0h ($34,2 \pm 35,8$) e FS12h ($28,9 \pm 46,0$), e não diferiu ($P > 0,05$) de FD0h e FD12h (FD0h: $188,9 \pm 30,3$; FD12h: $244,4 \pm 46,0$) comprovando que FS→FD a partir da ausência de um FD0h da mesma forma que sofre um aumento de tamanho demonstrado na Figura 7C, aumenta sua concentração de E2 de maneira semelhante aos folículos dominantes de ambos os grupos, enquanto os folículos subordinados (FS0h e FS12h) mantêm concentrações baixas e semelhantes entre si ($P = 0,93$).

Figura 8 - Resultados da concentração intrafolicular de estradiol no momento da aspiração. Grupo FS e FD 0h (n = 7), Grupo FS→FD (n = 4) e Grupo FS e FD 12h (n = 4). Dados apresentados na forma de média dos quadrados mínimos $\pm$ EP. a,b,c Médias seguidas de letras distintas diferem ($P < 0,05$)

Na figura 9, observa-se que não há diferença entre os grupos/folículos ($P = 0,77$), no que diz respeito a concentração de P4 no fluido folicular.

Figura 9 - Resultados da concentração intrafolicular de Progesterona no momento da aspiração independente de raça (NEL e HPB). Grupo 0h (n=7), Grupo 0-12h (n=4) e Grupo 12h (n=4). Dados apresentados na forma de média dos quadrados mínimos $\pm$ EP

Utilizando-se como base para uma análise descritiva os valores de Ct, que equivale ao ciclo de PCR em que a amostra atinge o nível de quantificação na fase exponencial da amplificação (BUSTIN et al., 2009), constatou-se que não houve diferença ($P = 0,69$) na abundância relativa de mRNA para PAPP-A entre os grupos (FD0h: $0,14 \pm 0,05$; FS0h: $0,14 \pm 0,07$; FS→FD: $0,31 \pm 0,08$; FD12h: $0,14 \pm 0,08$; e FS12h: $0,14 \pm 0,08$; Figura 9).

Figura 10 - Representação gráfica da abundância relativa de mRNA para PAPP-A (Pappalysin 1). Dados apresentados na forma de média dos quadrados mínimos $\pm$ EP. $P > 0,05$

Tampouco, houve diferença para Aromatase (FD0h: $0,38 \pm 0,13$; FS0h: $0,27 \pm 0,15$; FS→FD: $0,49 \pm 0,20$; FD12h: $0,47 \pm 0,19$; e FS12h: $0,06 \pm 0,19$, $P = 0,22$; Figura 10).

Figura 11 - Representação gráfica da abundância relativa de mRNA para CYP19A1 (Aromatase). Dados apresentados na forma de média dos quadrados mínimos $\pm$ EP. $P > 0,05$

Para LHr, houve efeito de fol*trat ($P = 0,04$), apresentando tendência ($P = 0,07$) de aumento na expressão de RNAm nos folículos FS→FD ($3,86 \pm 1,43$), quando comparados ao do grupo 0h (FD0h: $0,56 \pm 0,86$ e FS0h: $0,46 \pm 1,08$). Não houve diferença entre FS→FD e o grupo 12h (FD12h: $5,71 \pm 1,43$; e FS12h: $1,04 \pm 1,43$; $P \geq 0,23$). FD12h diferiu do grupo 0h (FD0h e FS0h; $P = 0,01$) e FS12h ($P = 0,01$).

Figura 12 - Representação gráfica da abundância relativa de mRNA para receptor de LH (LHr) sem distinção de isoformas. Dados apresentados na forma de média dos quadrados mínimos $\pm$ EP. $abP \leq 0,05$. $*P \leq 0,10$

Foi observada correlação positiva entre a expressão do gene da aromatase e a expressão de LHr ($P = 0,0004$), bem como com a expressão de PAPP-A ($P = 0,0007$; Tabela 2). Ainda, E2 e Aromatase obtiveram correlação altamente significativa tanto entre si ($P = 0,0007$) quanto em relação ao diâmetro folicular ($P = 0,0006$ e $0,0098$). As demais correlações podem ser observadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Coeficientes de correlação de Pearson/Spearman entre as variáveis analisadas

	E2	P4	CYP19A1	LHr	PAPP-A	Diâmetro	Total CG	RNA
E2	--	-0,21	0,60**	0,25	0,29	0,61**	0,26	
P4	--	--	-0,27	-0,12	0,02	0,07	0,22	
CYP19A1	--	--	--	0,62**	0,60**	0,48**	0,21	
LHr	--	--	--	--	0,39*	0,56	0,05	
PAPP-A	--	--	--	--	--	0,32	0,15	
Diâmetro	--	--	--	--	--	--	0,04	
Total CG	--	--	--	--	--	--	--	0,76**
RNA	--	--	--	--	--	--	--	--

Abreviaturas: E2 – Estradiol; P4 – Progesterona; CYP19A1 – Aromatase; PAPP-A – Pappalysin 1; Diâmetro – diâmetro folicular no momento da aspiração; Total GC – total de células da granulosa e RNA – Concentração de RNA.

* $P \leq 0,05$.

** $P \leq 0,001$.

5 DISCUSSÃO

De fato, se obteve sucesso em desencadear o desvio a partir de um folículo subordinado tanto em vacas NEL quanto HPB, como relatado por outros autores (BEG et al., 2001; GINTHER, BERGFELT, 2001a; b). Com essa técnica, permitiu-se obter um padrão de crescimento do F2 outrora subordinado, semelhante ao do folículo dominante desde a emergência nas figuras 3, 4 e 5 e 7 bem como, a concentração de E2 compatível com a dos folículos dominantes apresentada na figura 8. Além disso o modelo utilizado no experimento 2 permitiu a obtenção de material biológico suficiente para obtenção de RNAm e verificação de genes de interesse, sem a necessidade de realizar ovariectomia, procedimento o qual foi utilizado em estudos anteriores (MAZERBOURG et al., 2001; LUO et al., 2011), que limitou os estudos a no máximo duas utilizações por animal o que não permite a identificação de variação individual.

Muitos modelos de estudo tem se baseado apenas no diâmetro folicular como referência para o início do desvio (BEG et al., 2001; GINTHER et al., 2002) outros utilizam a dosagem de E2, entretanto não permitem o acompanhamento da dinâmica após a colheita da amostra. Existem métodos de colheita de fluido folicular que permitem a sobrevivência do folículo (GINTHER et al., 1997b; GASTAL et al., 1999). Entretanto, nenhum destes métodos permitiu estabelecer um padrão de identificação do momento exato em que ocorre o desvio, de forma que todos os trabalhos supracitados apresentam um intervalo de diâmetro em que foi identificado o início do desvio e foram todos realizados por meio de análises retrospectivas da dinâmica folicular. Por meio do método de aspiração foi observada a capacidade de determinar o preciso momento em que ele inicia o mecanismo de desvio.

Alguns estudos (SANTIAGO et al., 2005; GASPERIN et al., 2012) com o objetivo de avaliar os mecanismos endócrinos e moleculares do desvio folicular e estabelecimento da dominância, utilizam modelos passíveis de confusão, por também fazerem uso de métodos de sincronização os quais não permitem identificar o exato momento em que o folículo inicia o processo de transformação em dominante. Porém, a utilização desta técnica fica limitada ao método de sincronização, de forma que só consegue utilizar folículos que já apresentavam vantagem desde a emergência, não sendo um bom modelo para o estudo do primeiro gatilho que desencadeia o desvio. Ainda, muitos deles não permitem a obtenção de material celular adequado para verificação dos genes envolvidos no processo. Desta forma, este trabalho propiciou o preenchimento destas lacunas na metodologia por meio do modelo sugerido.

Trabalhos anteriores (IRELAND; ROCHE, 1982; GRIMES; IRELAND, 1986; MIHM; AUSTIN, 2002) utilizaram a relação E2/P4 como critério de avaliação da viabilidade de folículos de ovários de abatedouro, entretanto, os deste trabalho dados não mostraram relação alguma entre a concentração de P4 com o status do folículo ($P = 0,77$) como mostrado na Figura 9. Esta relação potencialmente permitiria uma identificação mais precisa do início do desvio, mas como foi também demonstrado em outros estudos (BEG et al., 2001; BEG et al., 2002) existe uma certa inconsistência nas respostas obtidas, que leva a crer que a P4 exerça um papel insignificante na formação da dominância.

As duas raças representam grupos genéticos distintos com fisiologia da dinâmica folicular diferentes entre si (SARTORI; BARROS, 2011), portanto não é possível comparar entre raças, dado que, o experimento foi delineado de maneira a realizar a aplicação dos tratamentos em momentos de diâmetros diferentes mas em momentos semelhantes do ciclo adaptando-se à condição ovariana racial. Entretanto, observou-se no grupo CON que 12 h após o F1 atingir seu tamanho esperado ao desvio, houve diferença de seu diâmetro com o dos demais (F2 e F3), caracterizando a dominância em ambas as raças (NEL e HPB). O que prova que o modelo funciona para ambos os grupos raciais, permitindo novos estudos que explorem as diferenças entre elas.

O norgestomet utilizado no experimento 1, é um dispositivo que contém um progestágeno em baixa concentração, além disso, ainda não existem formas conhecidas de detectar exatamente sua quantidade e presença circulante. De fato, a utilização deste tipo de fonte de progestágeno, facilitou a aspiração folicular, pois não foi necessário a retirada do implante a cada coleta, entretanto, causou seis casos de codominância no estudo, devido à ausência de CL viável associado a baixa concentração de progestágeno. Algumas vacas (5 no total: 1 NEL e 4 HPB) apresentaram padrão anormal culminando em codominância por isso foram eliminadas da análise. Estudos mostraram que um aumento na concentração de LH de maneira transiente, permite a formação da codominância (KULICK et al., 2001; LOPEZ; SARTORI, 2005), como pode ter acontecido no caso em questão, visto que a baixa concentração de progestágeno permite o aumento da pulsatilidade de LH mimetizando o aumento transiente de LH que ocorre no momento do desvio (BERGFELD et al., 1996).

A ausência de aumento do FSH nas primeiras horas após a aspiração do folículo dominante, embora contrário à hipótese inicial, sugere que talvez a interferência do E2 na supressão de FSH possa ser indireta, ou haja ação também da inibina, e o período de 12 h talvez seja necessário para a síntese desta proteína. Ginther et al. (1999) demonstraram que

após aspiração folicular, demora cerca de 8 h para o aumento do FSH circulante, entretanto, a concentração foi medida com intervalo de 8 h diferentemente deste estudo.

Existem várias evidências que suportam a hipótese que o LH possui um importante papel neste momento no desvio. Primeiramente, existe um aumento na concentração de LH logo antes da seleção do folículo dominante. Em segundo lugar, embora o FSH esteja baixo, os folículos dominantes continuam seu crescimento e este momento está associado com aumento na pulsatilidade de LH, enquanto na atresia e a ovulação estão associadas a diminuição da pulsatilidade de LH ou aumento transiente, respectivamente. E por fim, Mihm e colaboradores (2006) mostram queda na expressão de receptor de FSH bem como de genes estimulados por FSH, associado ao aumento de LHr no momento do desvio, o que sugere que o crescimento folicular não depende completamente do FSH

A concentração intrafolicular de E2 foi maior nos folículos dominantes bem como, no folículo subordinado que se tornou dominante, como já relatado em outros trabalhos (GINTHER, BERGFELT, 2001b; BEG et al., 2002; GINTHER et al., 2002), entretanto, a aromatase não acompanhou este aumento de maneira significativa, embora outros trabalhos tenham mostrado alta correlação (MAZERBOURG et al., 2001; LUO et al., 2011).

A PAPP-A também não sofreu oscilação ao longo do desvio folicular, o que sugere que talvez a regulação da biodisponibilidade de IGF-1 seja de maneira pós transcricional, ou seja, na atividade da enzima. Muitos trabalhos apresentam dados referentes a atividade da PAPP-A por meio da taxa de degradação das proteínas ligadas a IGF-1 (IGFBPs) (FORTUNE et al., 2001; FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004) e de fato se mostra diferente quando se compara o folículo dominante ao subordinado, entretanto não representa a expressão da enzima. Mazerbourg et al. (2001) mostraram que a expressão de PAPP-A em folículos saudáveis cresce ao longo do desenvolvimento folicular, entretanto é ausente em folículos atresícos e aumentada em folículos já diferenciados. Os dados aqui apresentados, de fato utilizam folículos saudáveis em um momento muito delicado de transição, o que nos faz compreender que talvez não seja um fator determinante para o estabelecimento do desvio. Entretanto, estes autores (MAZERBOURG et al., 2001) ainda mostram alta correlação da expressão de PAPP-A com os demais marcadores de crescimento folicular (LHr e Aromatase), que de fato se confirmou com os resultados supracitados. As correlações porém, foram mais baixas do que as encontradas por estes autores, os quais utilizaram apenas duas novilhas para a obtenção das células da granulosa.

Com base nos dados do experimento 2, sugere-se que dos genes avaliados, ao início do processo de dominância de um folículo sobre os demais, o receptor de LH parece ser o fator

que mais importante, corroborando os dados de Luo et al. (2011). Entretanto, diferentemente do que foi mostrado pelos mesmos autores, a expressão em folículos subordinados, embora pequena, não foi inexistente no presente estudo.

A concentração de IGF-1 é maior no fluido folicular do maior folículo quando comparado ao segundo maior da mesma onda, mesmo antes do aumento de E2 e diâmetro, o que sugere a existência da modulação do sistema IGF antes do desvio diferentemente nos folículos dominantes dos subordinados (BEG et al., 2002).

O splicing alternativo ocorre quando mais de uma sequência de RNAm é produzida pelo mesmo gene, formando isoformas da mesma proteína. Este processo não é completamente compreendido, principalmente os motivos pelo qual alguns genes tem mais predisposição a originar este fenômeno (NOGUEIRA et al., 2010).

Nogueira et al. (2010) afirma que existem isoformas do LHr em bovinos que não aparentam funcionalidade, tanto nas células da granulosa de vacas quanto de novilhas. Ainda, a funcionalidade está associada a diferença na composição de aminoácidos do domínio extracelular do receptor. Entretanto, não existem estudos mais aprofundados visando entender quais isoformas são efetivamente mais expressas em cada grupo de animais (vacas vs novilhas), apenas estudos que mostram a expressão aumentada de LHr em geral.

Beg et al. (2001) detectaram expressão de LHr por q-PCR em células da granulosa de folículos maiores que 8 mm cerca de 36h depois do início da onda folicular com em torno de 0,5 mm antes do diâmetro de desvio em novilhas europeias. Por outro lado, Fortune et al. (2001) não detectou expressão de LHr por hibridização *in situ* nas células da granulosa do future folículo dominante nos dias 1,5 e 2,5 da primeira onda folicular. Trabalhos mais recentes em vacas e novilhas aneladas entretanto (NOGUEIRA et al., 2007; NOGUEIRA et al., 2010; SIMÕES et al., 2012), corroboraram os dados anteriores que verificaram a expressão de LHr a partir de 7 mm de diâmetro.

A indução do início de expressão do LHr é um ponto controverso na fisiologia do desvio. *In vitro*, este processo é prontamente demonstrado em células da granulosa proveniente de ovários de vacas aneladas de abatedouro (NOGUEIRA et al., 2007) onde o tratamento com FSH (1-10 ng/mL no meio de cultura) ocasionou um aumento nos transcritos de LHr.

De fato, outros autores, utilizando células da granulosa de folículos no pós desvio (> 10 mm), mostraram não ser o estradiol um fator determinante para o aumento da expressão de LHr, que apenas ocorreu nos grupos suplementados com FSH (SHI; SEGALOFF, 1995; HAMPTON et al., 2004). Mas, houve um aumento na concentração de estradiol nos grupos

suplementados com FSH e LH quando comparado ao grupo com somente FSH. Esses achados sugerem que pelo menos para folículos pré-ovulatórios, o E2 não é um fator determinante para o aumento na expressão de LHr.

Alguns autores observaram correlação positiva entre as concentrações de E2 e os receptores de LHr (BERISHA; PFAFFL; SCHAMS, 2002; EVANS et al., 2004) em raças europeias. Entretanto, em animais anelorados, Nogueira et al. (2007) não observaram qualquer correlação entre concentrações foliculares de E2 e a expressão de LHr nas células da granulosa, como de fato se confirmou com os dados de correlação apresentados na Tabela 2. Dados de hibridização *in situ* em taurinos sugerem que folículos menores que 9 mm não apresentam RNAm para LHr (XU et al., 1995; FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004), entretanto, quando se utiliza RT-PCR, há alguns trabalhos que mostram sua expressão desde 4 mm (ROBERT et al., 2003). Nogueira et al. (2007), utilizando cultivo de células da granulosa de folículos de tamanhos diferentes e submetidos a PCR semiquantitativo, mostraram que apesar da expressão pequena em folículos menores que 7 mm, existem apenas formas não funcionais expressas. A controvérsia nos dados de receptor de LH no processo de desvio folicular se deve, em parte, às diferentes técnicas utilizadas para detectar o RNAm para LHr (hibridização *in situ* vs RT-PCR) e a validação das mesmas para as diferentes isoformas do receptor de LH.

As concentrações de P4 intrafolicular ao não apresentarem diferença, corroboraram dados previamente descritos (BEG et al., 2001; BEG et al., 2002) que indicavam a não relevância da P4 no mecanismo de desvio, e sua inconsistência de resultados. Contrariamente aos autores (MIHM; AUSTIN, 2002) que apresentam relação E2/P4 como uma boa classificação para identificação de folículos saudáveis pode-se sugerir que a classificação E2/P4 depende principalmente da concentração de E2, já que tem relação diretamente proporcional, o que garante que apenas sua concentração é o determinante para sabermos se um folículo é saudável ou não.

Durante o crescimento folicular, existe um aumento no plexo vascular das células da teca que circunda as células da granulosa. Este achado é sugestivo de que existe um fornecimento preferencial de nutrientes e gonadotrofinas por meio do maior desenvolvimento vascular em alguns folículos de éguas (ACOSTA et al., 2004). Este achado foi confirmado em vacas HPB (ACOSTA et al., 2005), que apresentaram aumento de fluxo no maior folículo em comparação ao segundo maior em média um dia antes do desvio. Isso indica que o sistema vascular exerce alguma função na seleção e crescimento do folículo dominante e que a

insuficiência na proliferação vascular pode contribuir para a atresia folicular. Entretanto, estes achados ainda foram pouco estudados e não é bem compreendido.

Um dos fatores de desenvolvimento vascular estudado como possível componente do processo de formação do desvio é o sistema angiotensina, em particular a enzima ECA (enzima conversora da angiotensina). A ECA catalisa a transformação de Angiotensina I em Angiotensina II e a metabolização de bradicinina em produtos inativos (FERREIRA, et al., 2011a; FERREIRA et al., 2011b). Foi demonstrada sua expressão nas células da teca e atividade no fluido folicular e sabe-se que sua ausência impede a maturação ovocitária e ovulação. Já a Angiotensina II é supra regulada em folículos dominantes e não se modificou em subordinados (FERREIRA et al., 2011b). Embora sugestivos, estes experimentos novamente não apresentam delineamento que permita identificar a mudança na expressão desses fatores como processo integrante do início do desvio.

6 CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS

No experimento 1, a hipótese que o folículo subordinado permanece com padrão de crescimento constante e adquire desvio morfológico após a aspiração do subordinado foi confirmada, e se repetiu no experimento 2, onde 12 h após a aspiração do dominante, o subordinado apresentava o mesmo tamanho do dominante quando aspirado. Ainda, no experimento 2, em vacas NEL, a concentração de E2 compatível com um folículo dominante confirmou a aquisição da dominância neste intervalo. Conclui-se que o modelo sugerido é um bom estimador do momento em que se inicia o desvio folicular, propiciando outros estudos que elucidem as lacunas ainda existentes no processo.

Outra hipótese do experimento 1 foi a oscilação do FSH mediante aspiração do folículo dominante, que de fato se confirmou, cerca de 12 h após a aspiração e não difere entre os grupos raciais apresentados. Entretanto, seu aumento não foi a partir do momento da aspiração como outrora esperado. Se faz necessário, mais estudos visando entender o papel da inibina neste processo, já que até então não se verifica estudos consistentes, ainda confrontar as respostas obtidas até então sobre o FSH em associação as inbinas e ativinas. Além disso, os estudos verificando capacidade de ligação aos receptores de FSH neste período ainda são escassos, o que seria uma boa forma de identificar o papel do FSH no desvio.

O E2 aumentou no folículo em transição como era esperado, entretanto a hipótese de que a P4 seria elevada nos folículos subordinados não se confirmou, sugerindo que não é um fator a ser levado em consideração quando se trata de estabelecimento do desvio.

Embora esperássemos que a expressão PAPP-A fosse diferente no folículo que se torna dominante, ela não sofreu oscilação ao longo da transição de subordinado para dominante. O mesmo ocorreu para a expressão da enzima Aromatase. Mais estudos devem ser realizados, com um número maior de animais, a fim de confirmar se esses fatores realmente não exercem influência no período de estabelecimento do desvio ou se efetivamente a regulação destas enzimas não se dá pela sua expressão neste momento e sim por sua atividade.

O modelo experimental utilizado de fato, permitiu efetivamente a colheita de amostras viáveis para identificação de genes expressos diferencialmente dentro do modelo. Mais estudos podem ser realizados, visando identificar novos genes que possam estar associados ao desvio folicular, como por exemplo, identificar a degradação das proteínas ligadoras ao IGF-1 e possivelmente compreender melhor como funciona o sistema IGF como um todo e qual o seu papel no processo de formação da dominância. Ainda, não se sabe ainda o papel do fluxo

sanguíneo e dos fatores vasoativos na formação do futuro folículo dominante, e o modelo experimental criado pode auxiliar a identificar se de que maneira eles interferem neste processo fisiológico.

A expressão do receptor de LH de fato aumentou no folículo subordinados ao adquirir dominância após ablação do previamente dominante, e mais uma vez se confirma como um ótimo marcador de desvio folicular, corroborando com vários estudos citados anteriormente. Resta elucidar o que exatamente desencadeia este processo, se antes mesmo da emergência as modificações bioquímicas no ambiente ovariano estabelecem alguma influência sobre os futuros folículos dominantes. Ainda, estabelecer se efetivamente as diferentes isoformas do LHr são responsáveis pelo sucesso ou não no estabelecimento no desvio e de que forma se comportam nas diferentes raças e categorias animais.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, T.J.; GASTAL, E; GASTAL, M.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Differential blood flow changes between the future dominant and subordinate follicles precede diameter changes during follicle selection in mares. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 71, n. 2, p. 502-507, 2004.
- ACOSTA, T.J.; HAYASHI, K.G.; MATSUI, M.; MYAMOTO, A. Changes in follicular vascularity during the first follicular wave in lactating cows. **Journal of Reproduction and Development**, Melbourne, v. 51, n. 2, p. 273-280, 2005.
- ADAMS, G. P.; KOT, K.; SMITH, C.A.; GINTHER, O.J. Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 30, n. 4, p. 259-271, 1993.
- ALMEIDA, A. P.; CELESTINO, J. J. H.; SARAIVA, M. V. A.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Aplicabilidade das técnicas de biologia molecular para a compreensão da foliculogênese inicial em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.34, n.3, p.133-148, 2010.
- ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA. **Boletim Agropecuário Anual**. São Paulo, 2010, 53p.
- ARMSTRONG, D. G.; WEBB, R. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. **Reviews of Reproduction**, Cambridge, v. 2, n. 3, p. 139-146, 1997.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE. **Estatísticas: Balanço da pecuária**. São Paulo, 2014. 19 p.
- AUSTIN, E. J.; MIHM, M.; EVANS, A. C. O.; KNIGHT, P. G.; IRELAND, J. L. H.; IRELAND, J. J.; ROCHE, J. F. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 64, n. 3, p. 839-848, 2001.
- BAO, B.; GARVERICK, H. A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **Journal Of Animal Science**, Champaign, v. 76, n. 7, p. 1903-1921, 1998.
- BAO, B.; GARVERICK, H. A.; SMITH, G. W.; SMITH, M. F.; SALFEN, B. E.; YOUNGQUIST, R. S. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 56, n. 5, p. 1158-1168, 1997.
- BASTOS, M.R. **Diferenças fisiológicas reprodutivas entre *Bos taurus* e *Bos indicus***. 2012. 156 p. (Doutorado em Reprodução Animal e Radiologia Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2012.

BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; KOT, K.; GINTHER, O. J. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 66, n. 1, p. 120-126, 2002.

BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; KOT, K.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 64, n. 2, p. 432-441, 2001.

BEG, M. A.; MEIRA, C.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Role of oestradiol in growth of follicles and follicle deviation in heifers. **Reproduction**, Cambridge, v. 125, n. 6, p. 847-854, 2003.

BERGFELD, E. G.; KOJIMA, F. N.; CUPP, A. S.; WEHRMAN, M. E.; PETERS, K. E.; MARISCAL, V.; SANCHEZ, T.; KINDER, J. E. Changing dose of progesterone results in sudden changes in frequency of luteinizing hormone pulses and secretion of 17 beta-estradiol in bovine females. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 54, n. 3, p. 546-553, 1996.

BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT, K.; GINTHER, O. J. Follicular and hormonal response to experimental suppression of FSH during follicle deviation in cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 54, n. 8, p. 1191-1206, NOV, 2000.

BERISHA, B.; PFAFFL, M.; SCHAMS, D. Expression of estrogen and progesterone receptors in the bovine ovary during estrous cycle and pregnancy. **Endocrine**, Tokyo, v. 17, n. 3, p. 207-214, 2002/04/01 2002.

BODENSTEINER, K. J.; WILTBANK, M. C.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Alterations in follicular estradiol and gonadotropin receptors during development of bovine antral follicles. **Theriogenology**, Stoneham, v. 45, n. 2, p. 499-512, 1996.

BURATINI, J.; PRICE, C. A.; VISINTIN, J. A.; BO, G. A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Theriogenology**, Stoneham, v. 54, n. 3, p. 421-431, 2000.

CASTILHO, A. C. S.; NOGUEIRA, M. F. G.; FONTES, P. K.; MACHADO, M. F.; SATRAPA, R. A.; RAZZA, E. M.; BARROS, C. M. Ovarian superstimulation using FSH combined with equine chorionic gonadotropin (eCG) upregulates mRNA-encoding proteins involved with LH receptor intracellular signaling in granulosa cells from Nelore cows. **Theriogenology**, Stoneham, v. 82, n. 9, p. 1199-1205, 12// 2014.

CASTILHO, C.; GARCIA, J. M.; RENESTO, A.; NOGUEIRA, G. P.; BRITO, L. F. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 98, n. 3/4, p. 189-196, 4// 2007.

CROWE, M. A.; MULLEN, M. P. Relative roles of fsh and lh in stimulation of effective follicular responses in cattle. **Gonadotropin**, Rijeka, Dr. Jorge Vizcarra (Ed.), 20 p., 2013.

DRIANCOURT, M. A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 35, n. 1, p. 55-79, 1// 1991.

EVANS, A. C. O.; IRELAND, J. L. H.; WINN, M. E.; LONERGAN, P.; SMITH, G. W.; COUSSENS, P. M.; IRELAND, J. J. Identification of genes involved in apoptosis and dominant follicle development during follicular waves in cattle. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 70, n. 5, p. 1475-1484, 2004.

EVANS, A. C.; KOMAR, C. M.; WANDJI, S. A.; FORTUNE, J. E. Changes in androgen secretion and luteinizing hormone pulse amplitude are associated with the recruitment and growth of ovarian follicles during the luteal phase of the bovine estrous cycle. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 57, n. 2, p. 394-401, 1997.

FERREIRA, R.; GASPERIN, B.; ROVANI, M.; SANTOS, J.; BARRETA, M.; BOHRER, R.; PRICE, C.; GONÇALVES, P.B.D. Angiotensin ii signaling promotes follicle growth and dominance in cattle. **Endocrinology**, Baltimore, v. 152, n. 12, p. 4957-4965, 2011.

FERREIRA, R.; GASPERIN, B.; SANTOS, J.; ROVANI, M.; SANTOS, R. A.; GUTIERREZ, K.; OLIVEIRA, J.F.; REIS, A.M.; GONÇALVES, P. B. Angiotensin II profile and mRNA encoding RAS proteins during bovine follicular wave. **Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, London, v. 12, n. 4, p. 475-482, 2011.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L.; SOLER, J. M. P. Ovarian follicular dynamics in nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 47, n. 8, p. 1489-1505, 6// 1997.

FINDLAY, J.; CLARKE, I. Regulation of the secretion of FSH in domestic ruminants. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, Cambridge, v. 34, p. 27-37, 1986.

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

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; EVANS, A. C. O.; TURZILLO, A. M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 65, n. 3, p. 648-654, 2001.

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; YANG, M. Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82-83, n. 0, p. 109-126, 7// 2004.

FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS. **Food Outlook Global Market Analysis**. Roma, ITA, 143 p, 2012.

GARVERICK, H. A.; BAXTER, G.; GONG, J.; ARMSTRONG, D. G.; CAMPBELL, B. K.; GUTIERREZ, C. G.; WEBB, R.. Regulation of expression of ovarian mRNA encoding steroidogenic enzymes and gonadotrophin receptors by FSH and GH in hypogonadotrophic cattle. **Reproduction**, Cambridge, v. 123, n. 5, p. 651-661, 2002.

GASPERIN, B. G.; FERREIRA, R.; ROVANI, M. T.; SANTOS, J. T.; BURATINI, J.; PRICE, C. A.; GONCALVES, P. B. D. FGF10 inhibits dominant follicle growth and estradiol secretion *in vivo* in cattle. **Reproduction**, Cambridge, v. 143, n. 6, p. 815-823, 2012.

GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Follicle deviation and intrafollicular and systemic estradiol concentrations in mares. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 61, n. 1, p. 31-39, 1999.

GIBBONS, J. R.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and the follicle-stimulating hormone surge in heifers. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 57, n. 5, p. 1066-1073, 1997.

GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; CARVALHO, N. A. T.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; SOUZA, A. H.; MADUREIRA, E. H.; TRINCA, L. A.; SARTORELLI, E. S.; BARROS, C. M.; CARVALHO, J. B. P.; MAPLETOFT, R. J.; BARUSELLI, P. S. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, Stoneham, v. 69, n. 7, p. 852-858, 2008.

GIMENES, L. U. **Estudo da divergência folicular e da capacidade ovulatória em bubalinos (*Bubalus bubalis*) e zebuínos (*Bos indicus*)**. 2006. 115 p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; DONADEU, F. X.; KOT, K. Follicle selection in monovular species. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 65, n. 3, p. 638-647, 2001.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; KOT, K. Activin A, estradiol, and free insulin-like growth factor I in follicular fluid preceding the experimental assumption of follicle dominance in cattle. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 67, n. 1, p. 14-19, 2002.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; DONADEU, F. X.; BERGFELT, D. R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 78, n. 3, p. 239-257, 2003.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; KOT, K.; MEIRA, C.; BERGFELT, D. R. Associated and independent comparisons between the two largest follicles preceding follicle deviation in cattle. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 68, n. 2, p. 524-529, 2003.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; BEG, M. A.; KOT, K. Effect of LH on circulating oestradiol and follicular fluid factor concentrations during follicle deviation in cattle. **Reproduction**, Cambridge, v. 122, n. 1, p. 103-110, JUL 2001a.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; BEG, M. A.; KOT, K. Follicle selection in cattle: relationships among growth rate, diameter ranking, and capacity for dominance. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 65, n. 2, p. 345-350, 2001b.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; BEG, M. A.; KOT, K. Follicle selection in cattle: Role of luteinizing hormone. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 64, n. 1, p. 197-205, JAN 2001c.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; BEG, M. A.; MEIRA, C.; KOT, K. *In vivo* effects of an intrafollicular injection of insulin-like growth factor 1 on the mechanism of follicle deviation in heifers and mares. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 70, n. 1, p. 99-105, 2004.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT, K. Pulsatility of systemic FSH and LH concentrations during follicular-wave development in cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 50, n. 4, p. 507-519, SEP 1998.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: Role of estradiol. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 63, n. 2, p. 383-389, AUG 2000 2000a.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: Role of two-way functional coupling between follicle-stimulating hormone and the follicles. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 62, n. 4, p. 920-927, APR 2000 2000b.

GINTHER, O. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; CHECURA, C. M.; BEG, M. A. Dose-response study of intrafollicular injection of insulin-like growth factor-I on follicular fluid factors and follicle dominance in mares. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 70, n. 4, p. 1063-1069, 2004.

GINTHER, O. J.; KOT, K.; KULICK, L. J.; WILTBANK, M. C. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 48, n. 1, p. 75-87, JUL 1 1997 1997a.

GINTHER, O. J.; KOT, K.; KULICK, L. J.; WILTBANK, M. C. Sampling follicular fluid without altering follicular status in cattle: oestradiol concentrations early in a follicular wave. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 109, n. 2, p. 181-186, 1997b.

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

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of fsh concentrations. **Theriogenology**, Stoneham, v. 52, n. 6, p. 1079-1093, // 1999.

GINTHER, O. J.; RAKESH, H. B.; BASHIR, S. T.; HOFFMAN, M. M. Minor FSH surge, minor follicular wave, and resurgence of preovulatory follicle several days before ovulation in heifers. **Theriogenology**, Stoneham, v. 81, n. 3, p. 437-45, Feb 2014.

GIORDANO, J. O.; FRICKE, P. M.; GUENTHER, J. N.; LOPES, G.; HERLIHY, M. M.; NASCIMENTO, A. B.; WILTBANK, M. C. Effect of progesterone on magnitude of the luteinizing hormone surge induced by two different doses of gonadotropin-releasing hormone in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, n. 7, p. 3781-3793, 2012.

GLISTER, C.; TANNETTA, D. S.; GROOME, N. P.; KNIGHT, P. G. Interactions between follicle-stimulating hormone and growth factors in modulating secretion of steroids and

inhibin-related peptides by nonluteinized bovine granulosa cells. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 65, n. 4, p. 1020-1028, 2001.

GOOD, T. E.; WEBER, P. S.; IRELAND, J. L.; PULASKI, J.; PADMANABHAN, V.; SCHNEYER, A. L.; LAMBERT-MESSERLIAN, G.; GHOSH, B.R.; MILLER, W.L.; GROOME, N. Isolation of nine different biologically and immunologically active molecular variants of bovine follicular inhibin. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 53, n. 6, p. 1478-1488, 1995.

GRIMES, R. W.; IRELAND, J. J. Relationship of macroscopic appearance of the surface of bovine ovarian follicles concentrations of steroids in follicular fluid, and maturation of oocytes *in vitro*. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 35, n. 3, p. 725-732, 1986.

HAMPTON, J. H.; BADER, J. F.; LAMBERSON, W. R.; SMITH, M. F.; YOUNGQUIST, R. S.; GARVERICK, H. A. Gonadotropin requirements for dominant follicle selection in GnRH agonist-treated cows. **Reproduction**, Cambridge, v. 127, n. 6, p. 695-703, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal 2014**. Brasília, 2014, 80 p.

IRELAND, J. J.; ROCHE, J. F. Development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormones, steroids in follicular fluid, and gonadotropin receptors. **Endocrinology**, Baltimore, v. 111, n. 6, p. 2077-2086, 1982/12/01 1982.

JIANG, J. Y.; MACCHIARELLI, G.; TSANG, B. K.; SATO, E. Capillary angiogenesis and degeneration in bovine ovarian antral follicles. **Reproduction**, Cambridge, v. 125, n. 2, p. 211-223, 2003.

KANEKO, H.; KISHI, H.; WATANABE, G.; TAYA, K.; SASAMOTO, S.; HASEGAWA, Y. Changes in plasma concentrations of immunoreactive inhibin, estradiol and fsh associated with follicular waves during the estrous cycle of the cow. **Journal of Reproduction and Development**, Cambridge, v. 41, n. 4, p. 311-320, 1995.

KANEKO, H.; TAYA, K.; WATANABE, G.; NOGUCHI, J.; KIKUCHI, K.; SHIMADA, A.; HASEGAWA, Y. Inhibin is involved in the suppression of FSH secretion in the growth phase of the dominant follicle during the early luteal phase in cows. **Domestic Animal Endocrinology**, Auburn, v. 14, n. 4, p. 263-271, 7// 1997.

KO, J. C. H.; KASTELIC, J. P.; DEL CAMPO, M. R.; GINTHER, O. J. Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 91, n. 2, p. 511-519, 1991.

KOT, K.; GIBBONS, J. R.; GINTHER, O. J. A technique for intrafollicular injection in cattle: effects of hcg. **Theriogenology**, Stoneham, v. 44, n. 1, p. 41-50, 7// 1995.

KULICK, L. J.; BERGFELT, D. R.; KOT, K.; GINTHER, O. J. Follicle selection in cattle: follicle deviation and codominance within sequential waves. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 65, n. 3, p. 839-846, 2001.

KULICK, L. J.; KOT, K.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. **Theriogenology**, Stoneham, v. 52, n. 5, p. 913-921, OCT 1 1999.

LOPEZ, H.; SARTORI, R.; WILTBANK, M. C. Reproductive hormones and follicular growth during development of one or multiple dominant follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 72, n. 4, p. 788-795, 2005.

LUCY, M. C.; SAVIO, J. D.; BADINGA, L.; DE LA SOTA, R. L.; THATCHER, W. W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 11, p. 3615-3626, 1992.

LUO, W.; GUMEN, A.; HAUGHIAN, J. M.; WILTBANK, M. C. The role of luteinizing hormone in regulating gene expression during selection of a dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 84, n. 2, p. 369-378, 2011.

MACHADO, M.F. **Expressão e função de membros das subfamílias FGF-8 e FGF-9 em folículos antrais bovinos**. 2012. 89 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Farmacologia) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2012.

MAZERBOURG, S.; OVERGAARD, M. T.; OXVIG, C.; CHRISTIANSEN, M.; CONOVER, C. A.; LAURENDEAU, I.; VIDAUD, M.; TOSSER-KLOP, G.; ZAPF, J. ; MONGET, P. Pregnancy-associated plasma protein-a (papp-a) in ovine, bovine, porcine, and equine ovarian follicles: involvement in igf binding protein-4 proteolytic degradation and mrna expression during follicular development. **Endocrinology**, Baltimore, v. 142, n. 12, p. 5243-5253, 2001.

MIHM, M.; AUSTIN, E. The final stages of dominant follicle selection in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, Auburn, v. 23, n. 1, p. 155-166, 2002.

MIHM, M.; AUSTIN, E. J.; GOOD, T. E. M.; IRELAND, J. L. H.; KNIGHT, P. G.; ROCHE, J. F.; IRELAND, J. J. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 63, n. 3, p. 811-819, 2000.

MIHM, M.; BAKER, P. J.; IRELAND, J. L. H.; SMITH, G. W.; COUSSENS, P. M.; EVANS, A. C. O.; IRELAND, J. J. Molecular evidence that growth of dominant follicles involves a reduction in follicle-stimulating hormone dependence and an increase in luteinizing hormone dependence in cattle. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 74, n. 6, p. 1051-1059, 2006.

MONGET, P.; MAZERBOURG, S.; DELPUECH, T.; MAUREL, M. C.; MANIÈRE, S.; ZAPF, J.; LALMANACH, G.; OXVIG, C. ; OVERGAARD, M. T. Pregnancy-associated plasma protein-A is involved in insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) proteolytic degradation in bovine and porcine preovulatory follicles: identification of cleavage site and characterization of IGFBP-2 degradation. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 68, n. 1, p. 77-86, 2003.

MONGET, P.; MONNIAUX, D. Growth factors and the control of folliculogenesis. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, Cambridge, v. 49, p. 321-333, 1994.

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

NOGUEIRA, M.; FERNANDES, P.; ERENO, R.; SIMOES, R.; BURATINI, J., ; BARROS, C. Luteinizing hormone receptor (lhr): basic concepts in cattle and other mammals. A review. **Animal Reproduction**, v. 7, n. 2, p. 51-64, 2010.

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

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonography of the bovine ovary. **Theriogenology**, Stoneham, v. 21, n. 3, p. 495-504, 3// 1984.

RASMUSSEN, F. E.; WILTBANK, M. C.; CHRISTENSEN, J. O.; GRUMMER, R. R. Effects of fenprostalene and estradiol-17 β benzoate on parturition and retained placenta in dairy cows and heifers. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, n. 2, p. 227-234, 1996.

RIVERA, G.; FORTUNE, J. E. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins-4 and-5 in bovine follicular fluid: implications for ovarian follicular selection and dominance. **Endocrinology**, Baltimore, v. 144, n. 7, p. 2977-2987, 2003.

RIVERA, G. M.; FORTUNE, J. E. Development of codominant follicles in cattle is associated with a follicle-stimulating hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein-4 protease. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 65, n. 1, p. 112-118, 2001.

ROBERT, C.; GAGNE, D.; LUSSIER, J. G.; BOUSQUET, D.; BARNES, F. L.; SIRARD, M. A. Presence of LH receptor mRNA in granulosa cells as a potential marker of oocyte developmental competence and characterization of the bovine splicing isoforms. **Reproduction**, Cambridge, v. 125, n. 3, p. 437-446, 2003..

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 3ª. Belo Horizonte, MG Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1943. 264.

SANTIAGO, C. A.; VOGEL, J. L.; AAD, P. Y.; ALLEN, D. T.; STEIN, D. R.; MALAYER, J. R.; SPICER, L. J. Pregnancy-associated plasma protein-A and insulin-like growth factor binding protein mRNAs in granulosa cells of dominant and subordinate follicles of preovulatory cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, Auburn, v. 28, n. 1, p. 46-63, 2005.

SARTORELLI, E. S.; CARVALHO, L. M.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J.; BARROS, C. M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, n. 9, p. 2382-2394, JUN 2005 2005.

SARTORI, R.; BARROS, C. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 124, n. 3, p. 244-250, 2011.

SARTORI, R.; BASTOS, M. R.; BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; ERENO, R. L.; BARROS, C. M. Physiological differences and implications to reproductive management of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle in a tropical environment. **Society of Reproduction and Fertility Supplement**, Cambridge, v. 67, p. 357-75, 2010.

SARTORI, R.; FRICKE, P. M.; FERREIRA, J. C.; GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 65, n. 5, p. 1403-1409, 2001.

SHI, H.; SEGALOFF, D. L. A role for increased lutropin/choriogonadotropin receptor (LHR) gene transcription in the follitropin-stimulated induction of the LHR in granulosa cells. **Molecular Endocrinology**, Baltimore, v. 9, n. 6, p. 734-744, 1995.

SIMÕES, R. A.; SATRAPA, R. A.; ROSA, F. S.; PIAGENTINI, M.; CASTILHO, A. C.; ERENO, R. L.; TRINCA, L. A.; NOGUEIRA, M. F. G.; BURATINI JR; J. ; BARROS, C. M. Ovulation rate and its relationship with follicle diameter and gene expression of the LH receptor (LHR) in Nelore cows. **Theriogenology**, Stoneham, v. 77, n. 1, p. 139-147, 1/1/ 2012.

SIROIS, J.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 39, n. 2, p. 308-317, 1988.

SPICER, L. J. Proteolytic degradation of insulin-like growth factor binding proteins by ovarian follicles: a control mechanism for selection of dominant follicles. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 70, n. 5, p. 1223-1230, 2004.

SPICER, L. J.; ALONSO, J.; CHAMBERLAIN, C. S. Effects of thyroid hormones on bovine granulosa and thecal cell function *in vitro*: dependence on insulin and gonadotropins. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 5, p. 1069-1076, 5// 2001.

SPICER, L. J.; ECHTERNKAMP, S. E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, Auburn, v. 12, n. 3, p. 223-245, 7// 1995.

STEWART, R. E.; SPICER, L. J.; HAMILTON, T. D.; KEEFER, B. E. Effects of insulin-like growth factor I and insulin on proliferation and on basal and luteinizing hormone-induced steroidogenesis of bovine thecal cells: involvement of glucose and receptors for insulin-like growth factor I and luteinizing hormone. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, n. 12, p. 3719-3731, 1995.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Milk cows and production by state and region (Annual)**. Washington, DC, USA, 2015, 2 p.

WEBB, R.; CAMPBELL, B. K.; GARVERICK, H. A.; GONG, J. G.; GUTIERREZ, C. G.; ARMSTRONG, D. G. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. **Journal of Reproduction and fertility Supplement**, Cambridge, v. 54, p. 33-48, 1999.

WEBB, R.; ENGLAND, B. G. Relationship between LH receptor concentrations in thecal and granulosa cells and in-vivo and in-vitro steroid secretion by ovine follicles during the

preovulatory period. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 66, n. 1, p. 169-180, 1982.

WILTBANK, M. C.; GRUMMER, R. R.; SHAVER, R. D.; SANTOS, J. E.; SARTORI, R.; CARVALHO, P. D.; SOUZA, A.H. ; TOLEDOA, M. Z. Nutrition and reproductive efficiency: transition period management, energy status, and amino acid supplementation alter reproduction in lactating dairy cows. **2015 Florida Ruminant Nutrition Symposium**, Florida, 2015. p.39.

WILTBANK, M. C.; PURSLEY, J. R. The cow as an induced ovulator: timed ai after synchronization of ovulation. **Theriogenology**, Stoneham, v. 81, n. 1, p. 170-185, 2014.

WRATHALL, J. H. M.; KNIGHT, P. G. Effects of inhibin-related peptides and oestradiol on androstenedione and progesterone secretion by bovine theca cells *in vitro*. **Journal of Endocrinology**, Baltimore, v. 145, n. 3, p. 491-500, 1995.

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