

Renato Arantes Lima Simões

DETERMINAÇÃO DA TAXA DE OVULAÇÃO E SUA RELAÇÃO COM DIÂMETRO FOLICULAR E ISOFORMAS DE mRNA PARA RECEPTOR DE LH, EM VACAS DA RAÇA NELORE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Área Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Ciro Moraes Barros

Botucatu

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Simões, Renato Arantes Lima.

Determinação da taxa de ovulação e sua relação com diâmetro folicular e isoformas de mRNA para receptor de LH em vacas da raça Nelore / Renato Arantes Lima Simões. – Botucatu: [s.n.], 2009.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2009

Orientador: Ciro Moraes Barros

Assunto Capes: 21000000

1. Nelore (Bovino) - Reprodução - Estudos experimentais
2. Ovulação
3. Farmacologia veterinária

CDD 636.20824

Palavras-chave: *Bos indicus*; Expressão gênica; Folículo; LHR; Ovulação

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	4
AGRADECIMENTOS	6
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	12
CAPÍTULO 1	
Resumo	14
Abstract	17
Introdução e Objetivo	20
Revisão de Literatura	24
Referências	37
CAPÍTULO 2	
Resumo	54
1. Introdução	56
2. Materiais e Métodos	59
2.1. Local do experimento e animais.....	59
2.2. Tratamentos hormonais e ultrassonografia	59
2.3. Teste preliminar para determinação da dose mínima de LH (Exp. 1)	60
2.4. Determinação da taxa de ovulação em diferentes diâmetros foliculares (Exp. 2)	61
2.5. Expressão gênica das isoformas do LHR nas células da teca e granulosa em diferentes diâmetros foliculares e relação com a taxa de ovulação <i>in vivo</i>	62
2.5.1. Obtenção das amostras	62
2.5.2. Radioimunoensaio.....	63
2.5.3. Transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)	64
2.6. Análise estatística	66
3. Resultados	67
3.1. Experimento 1	67
3.2. Experimento 2	67
3.3. Experimento 3	69
4. Discussão.....	72
5. Referências	78
Anexo 1	85
Anexo 2	86

DEDICATÓRIA

DEDICO ESTE TRABALHO...

Aos meus pais José Rodrigues Simões Neto e Margaret Arantes Lima, ao meu irmão Marcelo Arantes Lima Simões e a minha namorada Thais Nabhan: sem a presença, amor, carinho e a força de vocês com certeza eu não teria finalizado mais esta etapa em minha vida. Não existe nada neste mundo que seja mais importante que tê-los ao meu lado.

AMO MUITO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos:

À Deus pela oportunidade de vida, felicidade, saúde e acima de tudo por ter me dado uma família maravilhosa.

Aos meus pais José Rodrigues Simões Neto e Margaret Arantes Lima e ao meu irmão Marcelo Arantes Lima Simões: obrigado pelos ensinamentos e sobretudo pelo esforço destinado a minha formação e caráter.

À minha namorada Thaís Nabhan que durante todos estes anos foi sinônimo de felicidade em minha vida. Você sempre esteve nos bons e maus momentos com muita lealdade e companheirismo. Espero durante a minha vida poder retribuir este carinho. Agradeço também a sua família: Sr. Jahjah, Nancy, Tata, Cynthia e Mário. Obrigado por todos os momentos de alegria, descontração e pelos treinos de ultrassonografia na fazenda que foram de grande importância para a realização deste trabalho.

Ao orientador de mestrado Prof. Dr. Ciro Moraes Barros pela paciência e oportunidade em me acolher em seu laboratório. Sou muito grato a este gesto que fez a diferença em minha vida pessoal e profissional. Espero ter contribuído com este imenso favor prestado.

Aos amigos de pós-graduação: Rafael Satrapa, Eduardo Razza, Cíntia Fernandes, Fernanda Rosa, Juliano Santos, Débora Penatti, Raquel Puelker, Ana Carolina Oliveira, Vinícius Pinheiro, Ronaldo Ereno, Marcelo Pegorer, Paulo Fernandes, Walter Cavalcanti, Mariana Machado, Anthony Castilho, Diego Guerra, Ana Cláudia Barcelos, Isabela Bazzo, Ester Caixeta, Rúbia Bueno, Celso Costa, Juliana Akinaga, Fernanda Nojimoto, Luciana Lima, Felipe Galvão, Paula Ripamonte e aos que aqui não foram mencionados. Obrigado por todas as trocas de informações, auxílios no experimento e o mais importante: pela amizade sincera de todos vocês.

Aos amigos em especial Rafael Satrapa e Eduardo Razza: obrigado por toda a força e ajuda que me deram durante esses anos. Vocês representam fielmente o significado da palavra amizade. Vou levá-la para o resto da vida.

À amiga Fernanda Rosa por todo seu empenho e dedicação me auxiliando nos experimentos à campo. Seu auxílio foi imprescindível para a realização deste trabalho.

Ao amigo Marcelo Piagentini: muito obrigado pela disponibilização da fazenda “Siriema do Lago” e pelo auxílio nos experimentos à campo. Sua prontidão naquele momento foi indispensável.

Ao Prof. Dr. Marcelo Fábio Gouveia Nogueira pela análise e interpretação dos resultados. Muito além, se mostrou sempre com grande interesse, sendo indispensável para a conclusão deste trabalho. Obrigado pela paciência e pelas trocas de informações que me fizeram crescer profissionalmente.

Ao Prof. Dr. José Buratini Júnior pelo auxílio e concessão de seu laboratório para a realização deste trabalho. Obrigado pela oportunidade deste aprendizado.

À Prof^a. Dr^a Luzia A. Trinca pela realização da análise estatística deste trabalho. Obrigado pela paciência e disponibilidade prestada.

Ao membro da banca examinadora Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo pela gentileza, paciência, atenção e contribuições oferecidas.

Aos suplentes da banca examinadora Prof. Dr. Roberto Sartori Filho e Prof. Dr. Paulo Fernandes pela disponibilidade e críticas ao presente estudo.

Aos funcionários da pós-graduação Luciene Tobias, Herivaldo Santos, Sérgio Primo Vicentini e Maria Helena Godói pela sempre grande disponibilidade e gentileza prestada no atendimento de nossas dúvidas.

Ao proprietário da fazenda “Siriema do Lago” Dr. Octaviano R. C. Silva, gerente Jaime Trajano e funcionários Juninho e Everaldo pela ajuda e disponibilidade nos experimentos à campo. Vocês não pouparam esforços para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Farmacologia (IB) e Reprodução Animal e Radiologia Veterinária (FMVZ) por todos os ensinamentos, auxílios e momentos agradáveis que obtive durante esses anos.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia Ana Cristina Murcia de Souza, Janete Teixeira, Luiz Antônio de Oliveira e Paulo César Mioni por toda a amizade e bons momentos compartilhados.

À FAPESP pelo auxílio financeiro (Processo nº 07/51 367-0) sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS

17 β -HSD - 17 β hidroxisteróide desidrogenase

3 β -HSD - 3 β hidroxisteróide desidrogenase

ARC – núcleo arqueado

AVPV - núcleo periventricular anteroventral

BE – benzoato de estradiol

cDNA - ácido desoxirribonucleico complementar

CL – corpo lúteo

DNA - ácido desoxirribonucleico

DNAse - enzima que degrada o ácido desoxirribonucleico

E₂ – estradiol

E₂/P₄ – razão estradiol/progesterona

ER α – receptor de estradiol tipo α

FSH - hormônio folículo estimulante

FSHR - receptor do hormônio folículo estimulante

GAPDH - gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

Gi – proteína G inibitória

GnRH - hormônio liberador de gonadotrofinas

Gs – proteína G estimulatória

HPB – Holandesa Preto e Branco

IA – inseminação artificial

IATF – inseminação artificial em tempo fixo

IGF - fator de crescimento semelhante à insulina

IGFBP - proteína específica de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina

IM - intramuscular

LH - hormônio luteinizante

LHR - receptor do hormônio luteinizante

MgCl₂ - cloreto de magnésio

MHz – megahertz

mRNA - ácido ribonucleico mensageiro

OV – ovulação

P₄ - progesterona

P450arom ou CYP19A1 - P450 aromatase

P450c17 ou CYP17A1 - P450 17 α hidroxilase

P450scc - P450 side chain cleavage

PAPP-A - proteína plasmática associada à prenhez

PBS – tampão fosfo salino (Phosphate buffered saline)

PCR - reação em cadeia da polimerase

PGF₂ α – prostaglandina F₂ α

RNA - ácido ribonucleico

RT-PCR - reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

TE – transferência de embriões

TETF – transferência de embriões em tempo fixo

TSH – hormônio estimulante da tireóide

US – ultrassom ou ultrassonografia

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1.** Protocolo para sincronização da ovulação (PEPE) realizado em vacas Nelore. BE= Benzoato de estradiol, PGF₂α= Prostaglandina F₂α, D= Dia, US= Exame ultrassonográfico, OV= ovulação.....60
- Figura 2.** Taxa de ovulação de acordo com a dose de LH utilizada em vacas com folículos de 10 a 11 mm de diâmetro.....67
- Figura 3.** Taxa de ovulação em vacas com folículos de 7,0 a 7,5 mm (G1); 7,6 a 8,0 mm (G2); 8,1 a 8,5 mm (G3); 8,6 a 9,0 mm (G4); e 9,1 a 10,0 mm (G5) tratados com 6,25 mg de LH.....68
- Figura 4.** Taxa de ovulação em vacas com folículos de 7,0 a 8,0 mm (G1+G2); 8,1 a 9,0 mm (G3+G4) e 9,1 a 10,0 mm (G5) tratados com 6,25 mg de LH.....69
- Figura 5.** Expressão gênica (valores em mediana) da somatória das isoformas do LHR (M1+M2+M3+M4; isoformas de mRNA LHR/mRNA GAPDH) nas células da granulosa de folículos com 8,0 a 9,0 mm (Grupo A); 9,1 a 10,0 mm (Grupo B) e 10,1 a 11,0 mm (Grupo C).....70
- Figura 6.** Expressão gênica das isoformas do LHR (M1□, M2▤, M3■ e M4▦) nas células da granulosa (Média±EPM; mRNA LHR/mRNA GAPDH) em folículos com 8,0 a 9,0 mm (Grupo A); 9,1 a 10,0 mm (Grupo B) e 10,1 a 11,0 mm (Grupo C).....71
- Tabela 1.** Diâmetro folicular mensurado com ultrassom (Experimento 2) ou paquímetro (Experimento 3), taxa de ovulação (Experimento 2) e expressão gênica da somatória (valores em mediana) das isoformas do LHR (M1+M2+M3+M4; isoformas de mRNA LHR/mRNA GAPDH) nas células da granulosa (Experimento 3).....72

CAPÍTULO 1

Resumo

Abstract

Introdução e Objetivo

Revisão de Literatura

Referências

RESUMO

Objetivou-se com o presente trabalho verificar a relação entre diâmetro folicular, taxa de ovulação e a expressão gênica das isoformas do receptor de LH em vacas da raça Nelore. O experimento 1 foi realizado para verificar a dose mínima de LH capaz de induzir ovulação em folículos com diâmetro entre 10 e 11 mm. Vacas Nelore (n=20) foram submetidas à sincronização da ovulação e o crescimento folicular passou a ser acompanhado diariamente por ultrassonografia (US). Quando os folículos atingiram diâmetro entre 10 e 11 mm, os animais foram divididos em quatro grupos para receber diferentes doses de LH (Lutropin-V[®], Bioniche, Ontario, Canada; IM): 1,56; 3,12; 6,25 e 12,5 mg. Os dados foram analisados pelo Teste Exato de Fisher (PROC FREQ, do SAS). As taxas de ovulação foram 0 (0/5), 80 (4/5), 80 (4/5) e 80% (4/5), respectivamente, ocorrendo diferença significativa entre o grupo 1,56 mg e os demais ($p<0,02$). No experimento 2, foram utilizados 6,25 mg de LH para induzir ovulação em vacas Nelore (n=53) submetidas a sincronização da ovulação e divididas em cinco grupos de acordo com o diâmetro folicular (mm) no momento da administração de LH: Grupo 1 (7,0 a 7,5); Grupo 2 (7,6 a 8,0); Grupo 3 (8,1 a 8,5); Grupo 4 (8,6 a 9,0) e Grupo 5 (9,1 a 10,0). Os resultados foram analisados por Regressão Logística (PROC GENMOD, do SAS). As taxas de ovulação foram 0 (0/11), 20 (2/10), 36 (4/11), 36 (4/11) e 90% (9/10), respectivamente. Houve diferença significativa entre G5 e os demais grupos ($p<0,01$). Ao associar G1+G2 (7,0 a 8,0 mm), G3+G4 (8,1 a 9,0 mm) e G5 (9,1 a 10,0 mm) as taxas de ovulação foram 9 (2/21), 36 (8/22) e 90% (9/10), respectivamente. Houve diferença significativa entre G1+G2 vs G5 ($p<0,01$), G3+G4 vs G5 ($p<0,02$) e G1+G2 vs G3+G4 ($p<0,03$). Após a administração de LH, o diâmetro do menor folículo capaz de ovular foi 7,65 mm. No experimento 3, células da teca e da granulosa provenientes de folículos de abatedouro foram submetidas a técnica de RT-PCR utilizando GAPDH como controle interno para avaliar a expressão gênica das isoformas do LHR (M1, M2, M3 e M4). Os folículos foram dissecados, mensurados com paquímetro e agrupados de acordo com o diâmetro folicular (mm): Grupo A (8,0 a 9,0) Grupo B (9,1 a 10,0) e Grupo C (10,1 a 11,0). Considerando que folículos mensurados com paquímetro são em média 1,0 mm maiores do que os obtidos por US, os grupos A, B e C correspondem aos grupos G1+G2; G3+G4 e G5 (experimento

2). Somente foram utilizados folículos com razão $E_2/P_4 > 1$. Desta forma, de um total de 400 ovários foram obtidas 5, 4 e 4 ($n=13$) amostras de células da granulosa e 7, 8 e 8 amostras de células da teca ($n=23$) para os Grupos A, B e C respectivamente. Os resultados foram analisados por ANOVA e Correlação de Pearson. Nas células da teca, não houve diferença significativa na expressão gênica da somatória das isoformas do LHR ($M1+M2+M3+M4$) entre os grupos A, B e C. Entretanto nas células da granulosa, folículos do Grupo A obtiveram menor expressão gênica do LHR (16,5; mRNA LHR/mRNA GAPDH) quando comparados aos do Grupo C (37,6; $p<0,05$). Houve correlação positiva entre o aumento da expressão gênica das isoformas M4 e M3 com o aumento no diâmetro folicular. Conclui-se que em fêmeas zebuínas a capacidade ovulatória está relacionada ao aumento do diâmetro folicular e consequente aumento da expressão gênica da somatória das isoformas do LHR nas células da granulosa.

Palavras-chave: *Bos indicus*; expressão gênica; folículo; LHR; ovulação

ABSTRACT

The aim of the present experiment was to verify the relationship between follicular diameter, ovulation rate and gene expression of LH receptor isoforms, in Nellore cows. Experiment 1 was performed to determine the lowest LH dose necessary to induce ovulation in follicles with 10 to 11 mm in diameter. Nellore cows (n=20) had their ovulation induced by hormonal treatment, and afterwards follicular growth was daily observed by ultrasonography (US). When the follicles reached 10 to 11 mm diameter, the cows were randomly allocated in four groups and treated with different doses of LH (Lutropin-V[®], Bioniche, Ontario, Canada): Groups 1.56; 3.12; 6.25 and 12.5 mg. The data were analyzed by Fisher's Exact Test (PROC FREQ, SAS). The ovulation rates were 0 (0/5), 80 (4/5), 80 (4/5) e 80% (4/5), respectively, and it was lower in group 1.56 when compared to the others ($P<0.02$). In experiment 2, the 6.25 mg LH dose was chosen to induce ovulation in Nellore cows (n=53), submitted to the same hormonal treatment used in experiment 1, and randomly allocated in five groups according to follicular diameter (mm) at the time of LH administration: Group 1 (7.0-7.5); Group 2 (7.6-8.0); Group 3 (8.1-8.5); Group 4 (8.6-9.0) and Group 5 (9.1-10.0). The results were analyzed by Logistic Regression (PROC GENMOD, SAS). The ovulation rates were 0 (0/11), 20 (2/10), 36 (4/11), 36 (4/11) and 90% (9/10), respectively, for G1, G2, G3, G4 and G5. There was significant difference between G5 and the others groups ($P<0.01$). When data from two groups (except Group 5) were combined G1+G2 (7.0-8.0 mm), G3+G4 (8.1-9.0 mm) and G5 (9.1-10.0) ovulation rates were, respectively, 9 (2/21), 36 (8/22) e 90% (9/10). There were significant differences when comparing G1+G2 v. G5 ($P<0.01$), G3+G4 v. G5 ($P<0.02$) and G1+G2 v. G3+G4 ($P<0.03$). After LH application, the smallest follicle that ovulated had a diameter of 7.65 mm. In experiment 3, granulosa and theca cells were recovered from follicles obtained in a local abattoir, and submitted to total RNA extraction, and expression of LHR isoforms (M1, M2, M3 and M4) was measured by semiquantitative RT-PCR using GAPDH as the internal control. Follicles were dissected, measured with a paquimeter and allocated in three groups according to follicular diameter (mm): Group A (8.0-9.0), B (9.1-10.0) and C (10.1-11.0). Considering that follicles measured with paquimeter are on average 1,0 mm larger than those measured by US, Groups A, B and C correspond to Groups G1+G2, G3+G4 and G5

(experiment 2). Only follicles with $E_2/P_4 > 1.0$ were used. Therefore, from a total of 400 ovaries, only 5, 4 and 4 granulosa ($n=13$) and 7, 8 and 8 theca samples ($n=23$) from Groups A, B and C, respectively, were obtained. The data were analyzed by ANOVA and Pearsons' correlation. There were no significant differences on total LHR expression ($M1+M2+M3+M4$) in theca cells from groups A, B and C. However, in granulosa cells, follicles from Group A had lower LHR expression (16.5; mRNA LHR/mRNA GAPDH) as compared to group C (37.6; $p<0.05$). There was a positive correlation between expression of M3 and M4 isoforms, and increase in follicular diameter. In conclusion, the ovulatory capacity in Nellore cattle is related to an increase in follicular diameter and LHR expression in granulosa cells.

Keywords: *Bos indicus*; follicle; gene expression; LHR; ovulation

INTRODUÇÃO E OBJETIVO

O agronegócio brasileiro destaca-se por contribuir com 25,1% do produto interno bruto (PIB) do país (CEPEA, 2007). A pecuária bovina insere-se neste contexto por possuir o maior rebanho comercial do mundo com mais de 207 milhões de cabeças (BRASIL, 2005) consagrando o país como maior exportador de carne dessa espécie. Dentre as raças de corte, a Nelore (*Bos indicus*) é a que possui o maior contingente numérico (acima de 90 milhões de cabeças ACNB, 2006).

O emprego de técnicas reprodutivas como a inseminação artificial (IA) e transferência de embriões (TE) são fundamentais para o melhoramento genético de bovinos (Pinheiro et al., 1998; Barros et al., 2000; Barros & Nogueira 2001; Fernandes et al., 2001; Nogueira et al., 2004; Mapletoft & Hasler 2005; Baruselli et al., 2006; Bo et al., 2006, 2008). A inseminação artificial pode trazer benefícios econômicos, em curto prazo, para a grande maioria dos pecuaristas. Entretanto, a carência de pessoal treinado e deficiências básicas de manejo nas propriedades têm limitado uma utilização mais ampla. Um dos principais fatores que determinam o sucesso de um programa de inseminação artificial é a detecção do estro, a qual requer tempo e pessoal adequadamente treinado. Em fêmeas zebuínas, a curta duração do estro (cerca de 11 horas) dificulta a detecção do mesmo e prejudica a implantação de programas convencionais de IA (Pinheiro et al., 1998).

A partir do conhecimento detalhado da dinâmica folicular (Pierson & Ginther, 1988) tornou-se possível o desenvolvimento de tratamentos hormonais capazes de regular o crescimento folicular e o momento da ovulação, de forma a viabilizar a inseminação artificial em tempo fixo (IATF, ou seja, IA em tempo pré-determinado, sem a necessidade de observar estro) em taurinos (Pursley et al., 1995; Martinez et al., 2002; Perry et al., 2002; Bucher et al., 2009; Larson et al., 2009) e zebuínos (Barros et al., 1998, 2000; Fernandes et al., 2001; Carvalho et al., 2008; Meneghetti et al., 2009; Sá Filho et al., 2009; Ayres et al., 2008; Pinheiro et al., 2009). De forma similar, o desenvolvimento folicular e o momento da ovulação podem ser controlados farmacologicamente para melhorar os tratamentos superestimulatórios empregados na transferência de embriões (Barros & Nogueira, 2001; Mapletoft et al., 2002; Kanitz et al., 2002;

Andrade et al., 2003; Ax et al., 2005; Barros et al., 2006; Baruselli et al., 2006, Nogueira et al., 2007a; Bo et al., 2008).

Vários protocolos hormonais para IATF e transferência de embriões em tempo fixo (TETF) têm sido desenvolvidos graças ao melhor entendimento da dinâmica folicular bovina. Está bem caracterizado, tanto em raças européias (*Bos taurus*) quanto zebuínas (*Bos indicus*), que durante o ciclo estral bovino ocorrem duas a três ondas de crescimento folicular. Uma fase crítica para o desenvolvimento dos folículos ovarianos é o desvio folicular, momento em que ocorre a maior diferença na taxa de crescimento entre os dois maiores folículos da onda (Ginther et al., 1996, 1997). No momento do desvio folicular, o diâmetro do futuro folículo dominante é de 8,5 mm em animais taurinos (Ginther et al., 1997; 2000; 2003) e cerca de 6,0 mm em zebuínos (Sartorelli et al., 2005; Castilho et al., 2007; Gimenes et al., 2008; Ereno 2008).

Existe controvérsia na literatura a respeito do momento em que os folículos ovarianos adquirem receptores de LH (LHR) nas células da granulosa. Segundo alguns autores, o futuro folículo dominante adquire LHR antes da fase de desvio folicular (Beg et al., 2001; Ginther et al., 2001, 2003) enquanto que outros reportam que a expressão do LHR ocorre após o desvio folicular (Xu et al., 1995; Bao et al., 1997; Fortune et al., 2001; Garverick et al., 2002; Nogueira et al., 2007b; Ereno, 2008).

Em fêmeas predominantemente da raça Nelore (Nogueira et al., 2007b) e novilhas puras de origem Nelore (PO; Ereno, 2008), foi relatado que o início da expressão das isoformas do LHR na superfície das células da granulosa ocorreu somente a partir de 7,0 mm, sendo significativamente influenciado pelo diâmetro folicular. Os autores observaram que as células da granulosa não adquirem LHR funcionais até que a dominância folicular esteja estabelecida.

Desta forma, Nogueira et al. (2007b) avaliaram as diferentes isoformas do LHR nas células da teca e granulosa de vacas predominantemente Nelore, posicionando os oligonucleotídeos iniciadores nas regiões compreendidas entre os éxons 2 e 9 (LHR-A) e entre éxons 9 e 11 (LHR-B) do gene. Na região LHR-A verificou-se a existência de 2 isoformas: N1 ou LHR-A1 (forma completa ou “full-length”) e N2 ou LHR-A2 (deleção do éxon 3). Na região LHR-B observou-se a presença de 4 isoformas: M1 ou LHR-B3 (forma completa ou

“full lenght”), M2 ou LHRB-4 (deleção do éxon 10), M3 ou LHRB-5 (deleção de parte éxon 11) e M4 ou LHRB-6 (deleção do éxon 10 e parte do éxon 11).

Sartori et al. (2001), avaliando a capacidade ovulatória em vacas da raça Holandesa (*Bos taurus*), verificaram que folículos com 7,0 e 8,5 mm de diâmetro não ovularam, mesmo após a administração de uma dose elevada (40 mg) de LH. Entretanto, 80% (8/10) das vacas com folículos de 10 mm ovularam após o tratamento com LH. Os autores concluíram que o folículo dominante adquire capacidade ovulatória somente após o desvio folicular. Em novilhas zebuínas, Gimenes et al. (2008) observaram que a aplicação de 25 mg de LH induziu taxas de ovulação de 33,3; 80,0 e 90,0% quando os folículos possuíam diâmetros de 7,0 a 8,4; 8,5 a 10 e acima de 10 mm, respectivamente.

Considerando-se a controvérsia na literatura e a importância dos receptores de LH para a ovulação, objetivou-se com o presente trabalho verificar a relação entre diâmetro folicular, taxa de ovulação e a expressão gênica das isoformas do LHR nas células da teca e granulosa de fêmeas predominantemente da raça Nelore (aneloradas).

Hipótese a ser testada:

Com o aumento do diâmetro folicular, ocorre uma maior expressão gênica das isoformas do LHR nas células da teca e da granulosa aumentando, conseqüentemente, a taxa de ovulação de vacas predominantemente da raça Nelore tratadas com pLH.

REVISÃO DE LITERATURA

Ciclo estral bovino

Os eventos reprodutivos que ocorrem entre dois períodos de receptividade sexual (estro) são denominados ciclo estral. As fêmeas bovinas domésticas são poliéstricas, apresentando estro com intervalos regulares médios de 21 dias até que a prenhez tenha se estabelecido com sucesso. As raças indianas apresentam ciclo estral com variação entre 17 a 24 dias (Mukasa-Murgerwa, 1989; Galina & Arthur, 1990; Pinheiro et al., 1998).

O ciclo estral é regulado por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos envolvendo principalmente os hormônios hipotalâmicos (GnRH), hipofisários (LH e FSH) e gonadais (estradiol, progesterona e inibina).

O GnRH é um decapeptídeo sintetizado por células neuroendócrinas na área pré-óptica e núcleo arqueado do hipotálamo (Senger, 2003) e após ser liberado sob a forma de pulsos (Clarke, 1988), atinge a adenohipófise através do sistema porta-hipotalâmico-hipofisário, onde determina a secreção das gonadotrofinas LH e FSH.

As gonadotrofinas são glicoproteínas constituídas de uma sub-unidade α comum e uma sub-unidade β distinta. Essas gonadotrofinas são liberadas de maneira pulsátil na circulação sistêmica e atuam nas gônadas regulando a gametogênese e a secreção dos estrógenos gonadais (Stanislaus et al., 1998).

Uma recente descoberta sobre o mecanismo de retroalimentação (positiva e negativa) do estradiol na liberação do GnRH hipotalâmico ajudou a esclarecer o mecanismo molecular de modulação desse esteróide (Smith et al., 2006). Embora a estimulação positiva ou negativa sobre a liberação do GnRH sejam há muito conhecidas, o mecanismo pelo qual o estradiol estimulava diretamente os neurônios secretores de GnRH não o era (Nogueira & Barros, 2009).

Foi descoberto que um polipeptídeo, denominado de “kisspeptina” (um produto de 54 aminoácidos sintetizado a partir do gene *Kiss1*), é o responsável por esse estímulo direto, mediante a ligação com o receptor GPR54 (acoplado à proteína G) que está presente na superfície de neurônios secretores de GnRH. A transcrição e tradução do gene *Kiss1* em kisspeptina é realizada por neurônios específicos que não aqueles secretores de GnRH, sendo

estimuladas positivamente (nos neurônios localizados no núcleo periventricular anteroventral; AVPV) ou negativamente (em neurônios do núcleo arqueado; ARC) pelo estradiol (Nogueira & Barros, 2009).

Desse modo, a ligação do estradiol com o seu receptor ER α nos neurônios *Kiss1* induziria a secreção ou a inibição da kisspeptina (na dependência do núcleo estimulado – AVPV ou ARC – pelo estradiol). Sob baixas concentrações de estradiol, a kisspeptina (sintetizada pelo núcleo ARC) se ligaria ao receptor GPR54 dos neurônios GnRH (por contato sináptico na área pré-óptica), estimulando a liberação do GnRH e, conseqüentemente, das gonadotrofinas hipofisárias. Em última análise, as gonadotrofinas estimulariam o aumento do estradiol secretado pelos folículos antrais em crescimento, e o “circuito” seria fechado mediante a retroalimentação positiva dos neurônios *Kiss1* do núcleo AVPV (implicado na geração do pico pré-ovulatório de GnRH/LH nas fêmeas, Nogueira & Barros, 2009).

O aumento nas concentrações de FSH é importante para estimular o recrutamento folicular, ou seja, iniciar uma nova onda de crescimento folicular (Adams et al., 1992). Neste momento, é verificada a presença de dois picos de FSH (Bergfelt et al., 1997; Kulick et al., 1999). O primeiro ocorre concomitantemente com o pico pré-ovulatório de LH e o segundo cerca de 16 a 24 horas após, momento que estão baixas as concentrações de LH e estradiol. Isto pode ser relacionado com o estudo de Ereno (2008) em novilhas da raça Nelore que verificou o surgimento de um grupo de folículos ($10,2 \pm 4,08$) doze horas antes da ovulação, caracterizando a emergência de uma onda folicular. No momento da ovulação, (12 horas após a observação da emergência) o número de folículos recrutados aumentou para $14,9 \pm 2,96$.

Este segundo pico de FSH atinge as concentrações máximas quando os folículos apresentam cerca de 4 a 5 mm (Bodensteiner et al., 1996; Kulick et al., 1999), atingindo o nadir, ou seja, a mínima concentração no momento do desvio folicular (Kulick et al., 1999). Durante o intervalo entre o início da queda nas concentrações de FSH até o início do desvio folicular (nadir), múltiplos folículos contribuem para essa diminuição de FSH, por meio da produção de inibina e estradiol.

No momento do desvio folicular, o folículo dominante produz altas concentrações de estradiol que em conjunto com a inibina continuam o decréscimo nas concentrações de FSH (Ginther et al., 2001). Após o desvio folicular, somente o folículo dominante é capaz de utilizar baixas concentrações de FSH (Ginther et al., 2001) devido ao sinergismo com o sistema IGF (fator de crescimento semelhante à insulina), aumentando, desta forma, as concentrações intrafoliculares de estradiol e, conseqüentemente, o diâmetro folicular (Fortune et al., 2001).

O LH, secretado pela adenohipófise, é regulado pela progesterona e estradiol ovarianos. Durante a maior parte do ciclo estral, ambos os hormônios inibem a secreção de LH por meio de retroalimentação negativa sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário (Goodman & Karsch, 1980; Clarke, 1988; Price & Webb, 1988). O LH é liberado sob a forma de pulsos que variam em frequência e amplitude (Rahe et al., 1980; Wright & Malmo, 1992). Após a luteólise, a concentração sérica de progesterona diminui a valores inferiores a 1 ng/mL, o que permite o aumento na frequência dos pulsos de LH (Goodman & Karsch, 1980; Karsch, 1987; Wiltbank et al., 2002).

O aumento na frequência de pulsos de LH estimula a maturação do folículo dominante que passa a secretar quantidades crescentes de 17 β -estradiol (Ireland & Roche, 1987; Fortune et al., 2001). O estradiol, na ausência de progesterona, estimula a síntese de receptores para GnRH na hipófise (Schoenemann et al., 1985) tornando-a mais sensível ao GnRH (Kesner et al., 1981) ao mesmo tempo que aumenta a frequência e amplitude dos pulsos de GnRH (Hansel & Convey, 1983) e estimula a síntese de gonadotrofinas, o que resulta no pico pré-ovulatório de LH (Hurnik, 1987) e, conseqüentemente, na ovulação do folículo pré-ovulatório (Clarke, 1988; Mukasa-Mugerwa, 1989, Cassar et al., 2002).

Foliculogênese e dinâmica folicular

A foliculogênese bovina é um processo contínuo de crescimento e atresia dos folículos ovarianos (Matton et al., 1981; Woolums & Peter, 1994) que se inicia na vida fetal, passa pela puberdade (Evans et al., 1994) e continua na

vida reprodutiva até a senilidade (Hafez, 1993). Este processo está presente inclusive no período pós-parto que precede a ciclicidade (Roche et al., 1992; McDougall et al., 1995) e durante a prenhez (Taylor & Rajamahendran, 1991). Em bovinos, são necessários cerca de três meses para que folículos pré-antrais (folículo primordial) cresçam até o estágio de folículo pré-ovulatório (Webb et al., 2003).

Os folículos encontrados nos ovários de uma fêmea púbere podem ser classificados em: primordiais em repouso (primário); pré-antrais em crescimento (secundários); antrais em maturação (terciários) e folículo pré-ovulatório (Graaf, Woolums & Peter, 1994).

O início do crescimento folicular (ativação) inicia-se com a transformação das células planas da pré-granulosa do folículo primordial em uma única camada de células da granulosa cubóides, formando o folículo primário. O folículo secundário surge a partir da proliferação das células da granulosa em duas a seis camadas ao redor do oócito. Ambos são folículos pré-antrais. O passo seguinte da foliculogênese é a formação do antro, a partir da secreção do fluido folicular pelas células da granulosa (Lussier et al., 1987; Braw-tal et al., 1997).

O fluido folicular é um meio de suporte nutricional e de desenvolvimento do ovócito, bem como um veículo no qual o ovócito é transportado para a tuba uterina durante a ovulação (Woolums & Peter, 1994). O fluido é rico em glicoproteínas, como a inibina (inibe a secreção de FSH e o crescimento dos folículos subordinados, Dekrester & Robertson, 1989; Rice, 1991); a folistatina (suprime a liberação de FSH e se liga a ativina bloqueando sua atividade) e a ativina (estimula a síntese e/ou a liberação do FSH, Knight, 1996).

O processo contínuo de crescimento e regressão dos folículos antrais ovarianos que induz o desenvolvimento do folículo pré-ovulatório é conhecido como dinâmica de crescimento folicular, enquanto que o padrão de crescimento e atresia de um grupo de folículos ovarianos é denominado onda de crescimento folicular (Lucy et al., 1992). O crescimento folicular em padrão de ondas ocorre em vários estágios da vida reprodutiva, como no período anterior à puberdade (6 a 8 meses de idade, Adams et al., 1992; Evans et al.,

1994), durante o ciclo estral, gestação (Ginther et al., 1996b) e no pós-parto (Murphy et al., 1990; Savio et al., 1990a, b).

A dinâmica de crescimento folicular dos bovinos tanto de raças zebuínas (*Bos indicus*) como taurinas (*Bos taurus*) é caracterizada pela presença de duas ou três ondas de crescimento folicular (Savio et al., 1988; Sirois & Fortune, 1988; Ginther et al., 1989; Figueiredo et al., 1997; Viana et al., 2000; Sartorelli et al., 2005; Castilho et al., 2007; Gimenes et al., 2008) e, esporadicamente, uma ou quatro ondas (Savio et al., 1988; Sirois & Fortune, 1988; Murphy et al., 1990; Viana et al., 2000).

A emergência da onda folicular, também denominada de recrutamento folicular, consiste na emergência simultânea de um grupo de folículos com diâmetro de aproximadamente 4 a 5 mm (Ginther et al., 1996a), estimulados por um aumento transitório do FSH (Fortune, 1993). Mais recentemente, com o avanço na qualidade dos aparelhos de ultrassonografia acoplados a transdutores de 9,0 MHz, foi possível a visualização de folículos com diâmetro a partir de 1,0 mm (Jaiswal, et al., 2004; Ereno, 2008), observando-se a emergência da onda folicular cerca de 12 (Ereno, 2008) ou 48 (Jaiswal, et al., 2004) horas antes da ovulação.

Aproximadamente três dias após a emergência folicular (folículos com 4 a 5 mm), quando o maior folículo atinge o diâmetro médio de 8,5 mm para *Bos taurus* (Ginther et al., 1996a) e cerca de 6,0 mm para *Bos indicus* (Sartorelli et al., 2005; Gimenes et al., 2008; Ereno, 2008), ocorre o evento denominado desvio folicular, momento em que ocorre a maior diferença na taxa de crescimento entre os dois maiores folículos da onda (Ginther et al., 1996a, 1997).

Na presença de um corpo lúteo (CL) funcional e de altas concentrações plasmáticas de progesterona, há decréscimo na frequência de pulsos de LH (Roberson et al., 1989). Consequentemente, o folículo dominante sofre atresia e falha em ovular (Ginther et al., 1989; Lucy et al., 1992; Stock & Fortune, 1993).

Em determinado momento do ciclo estral (17 a 20 dias após a ovulação), o corpo lúteo sofre regressão morfológica e funcional causada pela liberação de PGF₂ α proveniente do endométrio (Horton & Poyser, 1975). Este processo,

denominado luteólise, é caracterizado pela queda na produção de progesterona e fragmentação dos componentes celulares, incluindo a redução do suporte vascular, proliferação do tecido conjuntivo, desorganização celular, degeneração e fagocitose das células luteais (Milvae et al., 1996). Como resultado, ocorre queda nas concentrações plasmáticas de progesterona (<1 ng/mL), permitindo a ovulação do folículo dominante por meio do pico pré-ovulatório de LH.

Diâmetro folicular e capacidade ovulatória

A ovulação é um fenômeno fisiológico semelhante ao processo inflamatório no qual o folículo pré-ovulatório é submetido ao pico de LH, liberando um oócito capaz de ser fertilizado (Espey, 1980, 1994; Robker et al., 2000; Richards et. al., 2002; Richards, 2005). Neste processo, ocorre uma extensiva formação vascular (angiogênese) e diferenciação celular (luteinização) na parede folicular durante o período entre o pico de LH e o desenvolvimento inicial do corpo lúteo (Acosta et al., 2003).

Herrlich et al. (1996) propuseram um modelo para a ativação do receptor de LH (LHR) no momento da ovulação, sendo constituído por duas cascatas de sinalização (proteínas Gs e Gi) onde a adenilciclase e a fosfolipase C seriam ativadas respectivamente, induzindo nas células da teca e granulosa um aumento rápido na expressão de genes específicos fundamentais para processo ovulatório. Os autores sugeriram que no momento da ovulação, a concentração de LH e os níveis de LHR são suficientemente altos para efetivamente estimular a adenilciclase e a fosfolipase C.

Na literatura há relatos que a capacidade ovulatória é adquirida após o desvio folicular (Sartori et al., 2001) aumentando à medida que o folículo adquire maior diâmetro (Martinez et al., 1999; Sartori et al., 2001; Bello et al. 2006; Colazo et al., 2008; Gimenes et al., 2008; Small et al., 2009; Meneghetti et al., 2009; Sá Filho et al., 2009).

Martinez et al. (1999) administraram 25 mg de LH ou 100 µg de GnRH em novilhas taurinas cruzadas (Simental x Charolês) no dia 3 após a ovulação e verificaram que as taxas de ovulação dos folículos com 7, 8, 9 e 10 mm foram

de 0% (0/2), 50% (2/4), 100% (3/3) e 100% (6/6), respectivamente. Foi verificado que o diâmetro folicular nas novilhas que ovularam no dia 3 era maior ($9,6 \pm 0,2$ mm) quando comparado as que não ovularam ($7,5 \pm 0,3$ mm). Da mesma forma, Sartori et al. (2001) avaliaram a capacidade ovulatória em vacas HPB divididas aleatoriamente em três grupos em relação ao diâmetro folicular para receber 40 mg de LH: 7,0; 8,5 e 10,0 mm. As taxas de ovulação foram 0% (0/9); 0% (0/9) e 80% (8/10), respectivamente. Em novilhas zebuínas, Gimenes et al. (2008) observaram que a aplicação de 25 mg de LH induziu taxas de ovulação de 33,3% (3/9), 80% (8/10) e 90% (9/10), quando os folículos possuíam diâmetros de 7,0 a 8,4; 8,5 a 10,0 e acima de 10,0 mm, respectivamente.

Expressão gênica do LHR no folículo ovariano

O LHR é uma proteína que pertence à superfamília dos receptores acoplados ao nucleotídeo guanina (proteína G), assim como os receptores do FSH e do hormônio estimulante da tireóide (TSH, Ascoli et al., 2002). O LHR possui uma grande região extracelular amino-terminal (366 aminoácidos - codificados pelos primeiros 10 éxons do gene), sete hélices (domínios) transmembrânicas (típica dessa família de receptores, com três alças intracelulares e três extracelulares) e uma curta região intracelular constituída por 72 aminoácidos (na qual a proteína G se acopla ao domínio carboxil-terminal). As hélices transmembrânicas e a região intracelular do LHR são codificadas pelo 11º éxon do mRNA (Huhtaniemi, 2000; Pierce et al., 2002).

As células do folículo ovariano possuem mRNA que traduz o receptor de LH em fases distintas do desenvolvimento folicular, isto é, desde antes do aparecimento do antro até a fase pré-ovulatória nas células da teca (Xu et al., 1995; Bao & Garverick, 1998; Berisha et al., 2000; Braw-tal & Roth, 2005) ou apenas a partir do desvio folicular até a fase pré-ovulatória nas células da granulosa (Xu et al., 1995; Bao & Garverick, 1998).

A expressão do LHR em células da granulosa, estudadas por hibridização *in situ*, ocorreu em folículos maiores que 8,0 mm de diâmetro e a quantidade do mRNA para o LHR aumentou com o tamanho do folículo (Xu et

al., 1995; Bao et al., 1997), atingindo valores máximos quando o folículo dominante se aproximou do seu maior diâmetro (Bao & Garverick, 1998). No trabalho de Bao et al. (1997) a expressão de receptores de LH foi maior em folículos esteroidogênicos quando comparados aos folículos atrésicos. De forma similar, Evans et al. (2004), utilizando PCR quantitativo (tempo real), verificaram maior expressão gênica do LHR em células da granulosa de folículos dominantes quando comparados a folículos subordinados.

A expressão do LHR, avaliada por PCR quantitativo (tempo real), precede o desvio folicular em 0,5 mm em novilhas de raça européia ($\pm 8,0$ mm de diâmetro), o que levou Beg et al. (2001) a sugerirem que a expressão precoce do mesmo em células da granulosa seria um evento importante para o desvio folicular.

A expressão do LHR, pelas células da granulosa, ocorreu cerca de 8 horas antes do início do desvio folicular, proporcionando ao folículo manter a dominância e continuar o desenvolvimento, mesmo sob níveis basais de FSH e de LH (Ginther et al., 2001 e 2003). Desta forma, Ginther et al. (2001) sugeriram que o início da expressão do LHR nas células da granulosa pode ser a causa para o desvio e conseqüentemente para a aquisição da dominância folicular.

Por outro lado, Austin et al. (2001) e Fortune et al. (2001), aventaram que a expressão do LHR nas células da granulosa seria apenas um evento decorrente da dominância já instalada. Fortune et al. (2001), utilizando hibridização *in situ*, não detectaram a expressão do LHR no futuro folículo dominante imediatamente antes do desvio folicular. A primeira diferença observada entre o futuro folículo dominante e os subordinados foi a maior síntese da protease das IGFBP-4 e 5 (PAPP-A, proteína plasmática associada à prenhez, proteína ligadora de IGF) induzida pelo FSH, com subsequente diminuição das concentrações das IGFBP-4 e 5 pela degradação proteolítica desde o recrutamento até o tamanho pré-ovulatório (Mazerbourg et al., 2001; Rivera et al., 2001; Rivera & Fortune, 2001; Fortune et al., 2004). A baixa concentração de IGFBP-4 e 5 permite que grande quantidade de IGF-1 esteja biodisponível para promover o crescimento folicular, amplificando os efeitos do FSH e a síntese de estradiol (Fortune et al., 2001). De forma semelhante,

Austin et al. (2001) propuseram que as primeiras mudanças intrafoliculares que distinguem o folículo destinado a tornar-se dominante dos outros folículos em crescimento seria a capacidade aumentada em produzir estradiol e a manutenção de baixos níveis de IGFBPs. Portanto, o sistema IGF parece desempenhar papel crítico no desvio folicular e na aquisição de dominância pelo folículo (Fortune et al., 2004).

Nogueira et al. (2007b), utilizando RT-PCR semi-quantitativo, verificaram que a expressão das isoformas do LHR em células da granulosa de fêmeas predominantemente Nelore somente ocorreu em folículos a partir de 7,0 mm de diâmetro. Neste estudo, nenhuma amostra de células da granulosa obtida de folículos de 5,0 e 6,0 mm de diâmetro e apenas uma amostra (16,7%, 1/6) dos folículos com diâmetro de 7,0 mm expressaram LHR, respectivamente. Porém, em folículos com diâmetro igual ou maior a 8,0 mm houve expressão de LHR em mais de 87,5% das amostras avaliadas.

Estes resultados foram confirmados por Ereno (2008) em novilhas puras de origem da raça Nelore, que detectou o início da expressão gênica das isoformas do LHR nas células da granulosa de folículos a partir de 7,0 mm, ou seja, após o desvio folicular que ocorreu com 5,4 mm. Neste experimento foram comparados os diâmetros foliculares obtidos por meio de exames ultrassonográficos com aqueles oriundos de mensurações realizadas com um paquímetro (escala de 1,0 mm), observando-se que as medidas foliculares obtidas por meio de paquímetro são em média 1,18 mm maiores daquelas obtidas por ultrassonografia. Desta maneira, considerando-se que o desvio folicular no experimento de Ereno (2008) ocorreu com 5,4 mm (medida realizada por ultrassonografia), a medida correspondente por paquímetro é 6,58 mm ($5,4 + 1,18$ mm), confirmando que a expressão gênica das isoformas do LHR nas células da granulosa obtidas neste experimento (a partir de folículos com 7,0 mm medidos por paquímetro) ocorre após o desvio folicular.

Portanto, estes dados não sustentam a hipótese de que expressão de LHR em células da granulosa ocorra antes do desvio folicular.

Isoformas de LHR (“splicing” alternativo)

A montagem do transcrito primário de um gene interrompido (pré-mRNA), com a remoção do material genético que não codifica aminoácidos presentes na proteína madura (íntrons) e o alinhamento das regiões codificadoras (éxons) é necessária para a formação do mRNA. A transcrição gênica poderá gerar mRNA contendo todos os éxons do gene (forma completa ou “full-length”) ou algumas formas de mRNA com deleções totais e/ou parciais de um ou mais éxons. O “splicing” alternativo surge quando se produz, a partir da transcrição de um mesmo gene, mais de uma sequência de mRNA (transcritos alternativos ou isoformas; Lewin, 2004).

No trabalho de Aatsinki et al. (1992), feito com ovários de ratas, foi demonstrado a ocorrência de quatro transcritos alternativos à forma “full-length”: deleção parcial do éxon 9, deleções dos éxons 3 e 4, deleção parcial do éxon 11 e deleção parcial do éxon 11 e total do éxon 5.

Isoformas do LHR (produtos de “splicing” alternativo) têm sido descritas em ovinos e bovinos e nem todas parecem ser funcionais. A investigação da região compreendida entre os finais dos éxons 9 e 11 revelou deleção alternativa do éxon 10 e/ou parte do éxon 11 (Abdennebi et al., 2002; Robert et al., 2003). Por outro lado, deleções nos éxons 3, 4, 5 ou 9 ainda não foram citadas (Bacich et al., 1999; Abdennebi et al., 2002; Robert et al., 2003; Kawate, 2004).

Recentemente, Nogueira et al. (2007b) avaliaram as diferentes isoformas do LHR nas células da teca e granulosa de vacas predominantemente Nelore, posicionando os oligonucleotídeos iniciadores nas regiões compreendidas entre os éxons 2 e 9 (LHR-A) e entre éxons 9 e 11 (LHR-B) do gene. Na região LHR-A verificou-se a existência de 2 isoformas: N1 ou LHR-A1 (forma completa ou “full-length”) e N2 ou LHR-A2 (deleção do éxon 3). Na região LHR-B observou-se a presença de 4 isoformas: M1 ou LHR-B3 (forma completa ou “full length”), M2 ou LHR-B4 (deleção do éxon 10), M3 ou LHR-B5 (deleção de parte do éxon 11) e M4 ou LHR-B6 (deleção do éxon 10 e parte do éxon 11).

Estes resultados foram corroborados posteriormente no estudo de Ereno (2008) que verificou, nas células da granulosa de novilhas puras de origem Nelore, a presença das quatro isoformas (M1, M2, M3 e M4) na região LHR-B.

Produção e concentração dos hormônios esteróides nos folículos ovarianos

Em ruminantes, a esteroidogênese ocorre primariamente por meio da via $\Delta 5$ (Conley & Bird, 1997) isto é, esteróides com dupla ligação entre os carbonos 4 e 5. Neste modelo, ocorre nas células da teca à conversão do colesterol em pregnenolona pela enzima P450 side chain cleavage (P450scc, Fortune, 1986). A pregnenolona é convertida em diidroepiandrostenediona pela P450 17 α hidroxilase (P450c17) e depois em androstenediona pela 3 β hidroxisteróide desidrogenase (3 β -HSD). A Androstenediona, ao entrar nas células da granulosa, pode seguir dois caminhos: ser modificada em estrona pela P450 aromatase (P450arom) e depois transformada posteriormente em estradiol pela 17 β hidroxisteróide desidrogenase (17 β -HSD) ou ser transformada em testosterona pela 17 β -HSD e convertida posteriormente em estradiol pela P450arom (Conley & Bird, 1997).

Convém lembrar que para o colesterol ser transformado em estradiol no folículo ovariano é necessário dois tipos de células (da teca e da granulosa) e dois hormônios (LH e FSH). Nas células da teca, sob a ação do LH, o colesterol (C27) é metabolizado em progestágenos (C21) e andrógenos (C19). Os andrógenos atravessam a membrana basal do folículo ovariano e, nas células da granulosa, são transformados em estrógenos pela enzima aromatase (Fortune & Quirk, 1988).

A viabilidade e o grau de capacitação atingido por um folículo são, em grande parte, refletidos pela composição bioquímica do fluido presente em sua cavidade antral. Os produtos resultantes do metabolismo das células do “*cumulus oophorus*”, da granulosa mural, e mesmo da teca são difundidos pelo fluido folicular, fornecendo um panorama da atividade esteroidogênica e da biodisponibilidade de fatores de crescimento (como o IGF-1 e as IGFBP-4 e 5). Estudos em folículos bovinos demonstraram que existe uma alta relação entre

as concentrações de IGF-I livre e de estradiol presentes no fluido folicular e a capacidade desses folículos atingirem a dominância e a capacitação final pré-ovulação (Mihm et al., 2000; Austin et al., 2001; Beg et al., 2001; Rivera et al., 2001; Rivera & Fortune, 2001; Ginther et al., 2001).

Evans et al. (2004) demonstraram que a alta concentração de estradiol intrafolicular (132 ng/mL) foi positivamente relacionada com a expressão do mRNA para aromatase, LHR, FSHR, DICE1 e MCL1 no folículo dominante em crescimento, quando comparado aos outros folículos semelhantes em tamanho no início da onda folicular. Por outro lado, baixas concentrações de estradiol intrafolicular nos folículos subordinados foram positivamente associadas com maior expressão de mRNA em células da granulosa para ciclo-oxigenase-1, fator de necrose tumoral, DNase caspase-ativada, e DRAK-2 (genes associados com a apoptose). Estes autores verificaram que a queda nos níveis intrafoliculares de estradiol precede a apoptose nos folículos que irão entrar em atresia.

Desta forma, a razão estradiol/progesterona (E_2/P_4) no fluído folicular pode representar vários estágios no desenvolvimento folicular bovino (Grimes & Ireland, 1986). Uma baixa razão $E_2/P_4 < 0,01$ é o perfil de folículos altamente atrésicos (Ireland & Roche, 1982). A segunda categoria, razão E_2/P_4 entre 0,01 - 1, representa um estágio transicional, ou seja, folículos luteinizados após o pico de LH ou em estado de atresia. A terceira categoria com razão E_2/P_4 acima de 1, representa folículos ovulatórios antes do pico de LH ou folículos dominantes que não estão em atresia (estrógeno ativos, Ireland et al., 1994).

REFERÊNCIAS

AATSINKI, J.T., PIETILÄ, E.M., LAKKAKORPI, J.T., RAJANIEMI, H.J. Expression of the LH/CG receptor gene in rat ovarian tissue is regulated by an extensive alternative splicing of the primary transcript. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.84, p.127-35, 1992.

ABDENNEBI, L., LESPORT, A.S., REMY, J.J., GREBERT, D., PISSELET, C., MONNIAUX, D., SALESSE, R. Differences in splicing of mRNA encoding LH receptor in theca cells according to breeding season in ewes. **Reprod.**, v.123, p.819-26, 2002.

ACNB, Associação dos criadores de Nelore do Brasil, 2006. Disponível em: <http://www.nelore.org.br>. Acesso em: 13/03/2007.

ACOSTA, T.J., HAYASHI, K.G., OHTANI, M., MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. **Reprod.**, v. 125, p. 759-767, 2003.

ADAMS, G. P., MATTERI, R. L., KASTELIC, J. P., KO, J. C. H., GINTHER, O. J. Association between surges of FSH and emergence of follicular waves in heifers. **J. Reprod. and Fertil.**, Cambridge, v.94, p.177-88, 1992.

ASCOLI, M., FANELLI, F., SEGALOFF, D. The lutropin/choriogonadotropin receptor, a perspective. **Endocrinol. Rev.**, p.141-174. 2002.

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. **Biol. Reprod.**, v.64, p.839-48, 2001.

AYRES, H., MARTINS, C.M., FERREIRA, R.M., MELLO, J.E., DOMINGUEZ, J.H., SOUZA, A.H., VALENTIN, R., SANTOS, I.C., BARUSELLI, P.S. Effect of timing of estradiol benzoate administration upon synchronization of ovulation in suckling Nelore cows (*Bos indicus*) treated with a progesterone-releasing intravaginal device. **Anim. Reprod. Sci.**, v.109, p.77-87, 2008.

BACICH, D.J., EARL, C.R., O'KEEFE, D.S., NORMAN, R.J., RODGERS, R.J. Characterization of the translated products of the alternatively spliced luteinizing

hormone receptor in the ovine ovary throughout the oestrous cycle. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.147, p.113-24, 1999.

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. **Biol. Reprod.**, v.56, p.1158-1168, 1997.

BAO, B., GARVERICK, H.A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **J. Anim. Sci.**, v.76, p.1903-21, 1998.

BARROS, C.M., MOREIRA, M.B.P., FERNANDES, P. Manipulação farmacológica do ciclo estral para melhorar programas de inseminação artificial ou de transferência de embriões. **Arq. Fac.Vet.**, UFRGS, supl.26, p.179-89, 1998.

BARROS, C.M., MOREIRA, M.B.P., FIGUEIREDO, A.R., TEIXEIRA, A.B., TRINCA, L.A. Synchronization of ovulation in beef cows (*Bos indicus*) using GnRH, PGF₂ α and estradiol benzoate. **Theriogenology.**, v.53, p.1121-1134, 2000.

BARROS, C.M., NOGUEIRA, M.F.G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology.**, v.56, p. 1483-1496, 2001.

BARROS, C.M., BARCELOS, A.C.Z., NOGUEIRA, M.F.G. Superovulação com inseminação artificial em tempo fixo. **2º Simpósio de Reprodução Animal Aplicada**. p. 165-171, 2006.

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

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. **Biol. Reprod.**, v.64, p.432-441, 2001.

BERGFELT, D.R., SMITH, C.A., ADAMS, G.P., GINTHER, O.J. Surges of FSH during the follicular and early luteal phases of the estrous cycle in heifers. **Theriogenology**, v.48, p.757-768, 1997.

BERISHA, B., SCHAMS, D., KOSMANN, M., AMSELGRUBER, W., EINSPANIER, R. Expression and localization of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. **J. Endocrinol.**, v.167, p.371-82, 2000.

BO, G.A., BARUSELLI, P.S., CHESTA, P.M., MARTINS, C.M. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. **Theriogenology**, v.65, p.89-101, 2006.

BO, G.A., GUERRERO, D.C., ADAMS, G.P. Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. **Theriogenology**, v.69, p.81-87, 2008.

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

BRASIL, **Estatísticas da Pecuária**. Brasília, 2005. In: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 13/03/ 2007.

BRAW-TAL, R., YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of the follicle growth in the bovine ovary. **J. Reprod. Fertil.**, v.109, p. 165-171, 1997.

BRAW-TAL, R., ROTH, Z. Gene expression for LH receptor, 17 α -hydroxylase and StAR in the theca interna of preantral and early antral follicles in the bovine ovary. **Reprod.**, v.129, p.453-61, 2005.

BUCHER. A., KASIMANICKAM, R., HALL, J.B., DEJARNETTE, J.M., WHITTIER W.D., KÄHN, W., XU, Z. Fixed-time AI pregnancy rate following insemination with frozen-thawed or fresh-extended semen in progesterone supplemented CO-Synch protocol in beef cows. **Theriogenology**, v.71, p.1180-1185, 2009.

CARVALHO, J.B., CARVALHO, N.A., REIS, E.L., NICHI, M., SOUZA, A.H., BARUSELLI, P.S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v.69, p.167-175, 2008.

CASSAR, C.A., DOW, M.P.D., PURSLEY, J.R., SMITH, G.W. Effect of the prevulatory LH surge on bovine follicular progesterone receptor mRNA expression. **Dom. Anim. Endocrinol.**, v.22, p.179-187, 2002.

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. **Theriogenology**, v.98, p.189-196, 2007.

CEPEA, **Agronegócio**. Piracicaba. USP: 2007 In: Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Disponível em: <http://www.cepea.esalq.usp.br>. Acesso em: 13/04/2009.

CLARKE, J.J. GnRH secretion. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION. *Anais* Dublin, p.1-9, 1988.

CONLEY, A.J., BIRD, I.M. The role of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the delta 5 and delta 4 pathways of steroidogenesis in mammals. **Biol. Reprod.**, v.56, p.789-99, 1997.

DEKRESTER, D.M., ROBERTSON, P.M. The isolation and physiology of inhibin and related proteins. **Biol. Reprod.**, v.40, p.33-47, 1989.

ERENO, R.L. Expressão gênica do receptor do hormônio luteinizante (LHR), em células da granulosa de folículos de novilhas Nelore antes, durante e após a divergência folicular. 2008. 65p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ESPEY, L.L. Ovulation as an inflammatory reaction – A hypothesis. **Biol. Reprod.**, v. 22, p. 73-106, 1980.

ESPEY, L.L. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. **Biol. Reprod.**, v. 50, p. 233-238, 1994.

EVANS, A.C.O., ADAMS, G.P., RAWLINGS, N.C. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. **J. Reprod. Fertil.**, v.103, p.463-70, 1994.

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. **Biol. Reprod.**, v.70, p.1475-84, 2004.

FERNANDES, P., TEIXERIA, A.B., CROCCI, A.J., BARROS, C.M. Timed artificial insemination in beef cattle using GnRH agonist. PGF2alpha and estradiol benzoate. **Theriogenology.**, v.55, p.1521–1532, 2001.

FIGUEIREDO, R.A., BARROS, C.M., PINHEIRO, O.L., SOLER, J.M.P. Ovarian follicular dynamics in Nelore Breed (*Bos indicus*). **Theriogenology.**, v.47, p.1489-505, 1997.

FORTUNE, J.E. Bovine theca and granulosa cells interact to promote androgen production. **Biol. Reprod.**, v.35, p.292-299, 1986.

FORTUNE, J.E. Follicular dynamics during the bovine estrous cycle: a limiting factor in improvement of fertility? **Anim. Reprod. Sci.**, v.33, p.111–125, 1993.

FORTUNE, J.E., RIVERA, G.M., EVANS, A.C.O., TURZILLO, A.M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biol. Reprod.**, v.65, p.648-54, 2001.

FORTUNE, J.E., RIVERA, G.M., YANG, M.Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Anim. Reprod. Sci.**, v.82-83, p.109-126, 2004.

GALINA, C.S., ARTHUR, G.H. Review on cattle reproduction in the tropics. Part4. Oestrus cycles. **Anim. Breed., Abst.**, v.58, p.697-707, 1990.

GINTHER, O.J., KNOFF, L., KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycles with two and three follicular waves. **J. Reprod. Fert.**, v.887, p.223-30, 1989.

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

GINTHER, O.J., KOT, K., KULICK, L.J., MARTIN, S., WILTBANK, M.C. Relationships between FSH and ovarian follicular waves during last six months of pregnancy in cattle. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v.108, p.271-279, 1996b.

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**, v.48, p.75-87, 1997.

GINTHER, O.J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Anim. Reprod. Sci.**, v.60-61, p. 61-79, 2000.

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

GINTHER, O.J., BEG, M.A., DONADEU, F.X., BERGFELT, D.R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Anim. Reprod. Sci.**, v.78, p.239-257, 2003.

GIMENES, L.U., SÁ FILHO, M.F., CARVALHO, N.A.T., TORRES-JUNIOR, 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**, v.69, p.852-858, 2008.

GOODMAN, R.L., KARSCH, F.J. Pulsatile secretion luteinizing hormone: differential suppression by ovarian steroids. **Endocrinol.**, v.107, p.1286-90, 1980.

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. **Biol. Reprod.**, v.35, p.725-732, 1986.

HANSEL, W.; CONVEY, E.M. Physiology of the estrus cycle. **J. Anim. Sci.**, v.57, p.404-24, 1983.

HAFEZ, E.S.E. Reproduction in farm animals. 6. ed. **Philadelphia**, Lea & Febiger, 585p, 1993.

HERRLICH, A., KUHN, B., GROSSE, R., SCHMID, A., SCHULTZ, G., GUDERMANN, T. Involvement of Gs and Gi proteins in dual coupling of the luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phospholipase C. **J. Biol. Chem.**, v.28, p. 16764-72, 1996.

HUHTANIEMI, I. Mutations of gonadotrophin and gonadotrophin receptor genes: what do they teach us about reproductive physiology? **J. Reprod. Fertil.**, v.119, p.173-86, 2000.

HURNIK, J.F. Sexual behavior of female domestic mammals. **Vet. Clin. North A.: Food Anim. Pract.**, v.3, p.423-61, 1987.

IRELAND, J.L.H., GOOD, T.E.M., KNIGHT, P.G., IRELAND, J.J. Alterations in amounts of different forms of inhibin during follicular atresia. **Biol. Reprod.**, v.50, p.1265-1276, 1994.

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. **Endocrinol.**, v.111, p. 2077-2086, 1982.

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

JAISWALL, R.S.; SINGH, J.; ADAMS, G.P. Developmental patterns of small antral follicles in the bovine ovary. **Biol. Reprod.**, v.71, p.1244-1251, 2004.

KARSCH, F.J. Central actions of ovarian steroids in feed back regulation of pulsatile secretion of luteinizing hormone. **Ann. Rev. Physiol.**, v.49, p.365-82, 1987.

KAWATE, N. Studies on the regulation of expression of luteinizing hormone receptor in the ovary and the mechanism of follicular cyst formation in ruminants. **J. Reprod. Dev.**, v.50, p.1-8, 2004.

KESNER, J.S., CONVEY, E.M., ANDEERSOM, C.R. Evidence that estradiol induces the pre-ovulatory LH surge in cattle by increasing pituitary sensitivity to LHRH and then increasing LHRH release. **Endocrinol.**, v.108, p.1386-91, 1981.

KNIGHT, P.G. Roles of Inhibins, Activins, and Follistatin in the Female Reproductive System. **Front Neuroendocrinol.**, v.17, p.476–509, 1996.

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

LARSON, J.E., THIELEN, K.N., FUNNELL, B.J., STEVENSON, J.S., KESLER, D.J., LAMB, G.C. Influence of a controlled internal drug release after fixed-time artificial insemination on pregnancy rates and returns to estrus of nonpregnant cows. **J. Anim. Sci.**, v.87, p.914-921, 2009.

LEWIN, B. Genes VIII. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall, Pearson Education, Inc., chap.2; chap.28, 2004.

LUCY, M.C., SAVIO, J.D., BADINGA, L., DE LA SOTA, R.L., THATCHER, W.W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **J. Anim. Sci.**, v.70, p.3615-26, 1992.

LUSSIER, J.G., MATTON, P., DUFOUR, J.J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. **J. Reprod. Fertil.**, v.81, p. 301-307, 1987.

MAPLETOFT, R.J., HASLER, J.F. Assisted reproductive technologies in cattle: a review. **Rev. Sci. Tech.**, v.24, p. 393-403, 2005.

MARTINEZ, M.F., ADAMS, G.P., BERGFELT, D.R., KASTELIC, J.P., MAPLETOFT, R.J. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. **Ani. Reprod. Sci.**, v.57, p.23-33, 1999.

MARTINEZ, M.F., KASTELIC, J.P., ADAMS, G.P., MAPLETOFT, R.J. The use of a progesterone-releasing device (CIDR-B) or melengestrol acetate with GnRH, LH, or estradiol benzoate for fixed-time AI in beef heifers. **J. Anim. Sci.**, v.80, p.1746-1751, 2002.

MATTON, P., ADELAOUN, V., COUTURE, Y., DUFOUR, J.J. Growth and replacement of the bovine ovarian follicles during the estrous cycle. **J. Anim. Sci.**, v.52, p.813-20, 1981.

MAZERBOURG, S., OVERGAARD, T.M., OXVIG, C., CHRISTIAMSEN, M., CONOVER, A.C., LAURENDEAU, I., VIDAND, M., TOSSER-KLOPP, 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. **Endocrinol.**, v.142, p.5243-53, 2001.

MENEGHETTI, M., FILHO, O.G., PERES, R.F., LAMB, G.C., VASCONCELOS, J.L. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: Basis for development of protocols. **Theriogenology.**, 2009, *in press*.

MCDUGALL, S., BURKE, C.R., MACMILLAN, K.L., WILLIAMSON, N.B. Patterns of follicular development during periods of anovulation in pasture-fed dairy cows after calving. **Res. Vet. Sci.**, v.58, 212-6, 1995.

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. **Biol. Reprod.**, v.63, p.811-19, 2000.

MUKASA-MUGERWA, E. A review of reproductive performance of female *Bos indicus* (Zebu) cattle. **ILCA monog.**, v.6, p.1-34, 1989.

MURPHY, M.G., BOLAND, M.P., ROCHE, J.F. Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in post-partum beef suckler cows. **J. Reprod. Fert.**, v.90, p.523-33, 1990.

NOGUEIRA, M.F.G., MELO, D.S., CARVALHO, L.M., FUCK, E.J., TRINCA, L.A., BARROS, C.M. Do high progesterone concentrations decrease pregnancy rates in embryo recipients synchronized with PGF2 α and eCG? **Theriogenology.**, v.56, p.1283-1290, 2004.

NOGUEIRA, M.F.G., FRAGNITO, P.S., TRINCA, L.A., BARROS, C.M. The effect of type of vaginal insert and dose of pLH on embryo production, following fixed-time AI in a progestin-based superstimulatory protocol in Nelore cattle. **Theriogenology.**, v. 67, p.655-660, 2007a.

NOGUEIRA, M.F.G., BURATINI JR, 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. **Mol. Reprod. Develop.**, p. 1-7, 2007b.

NOGUEIRA, M.F.G; BARROS, C.M. Farmacologia Veterinária. 1^a Ed. São Paulo: **Editora Manole**, 2009, *in press*.

PERRY, G.A., SMITH, M.F., PATTERSON, D.J. Evaluation of a fixed-time artificial insemination protocol for postpartum suckled beef cows. **J. Anim. Sci.** v.80, p.3060-3064, 2002.

PIERCE, K.L., PREMONT, R.T., LEFKOWITZ, R.J. Seven-transmembrane receptors. **Mol. Cell. Biol.**, v.3, p.639-50, 2002.

PIERSON, R. A., GINTHER O. J. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. **Theriogenology.**, v.29, p.21-37, 1988.

PINHEIRO, O.L., BARROS, C.M., FIGUEREDO, R.A., VALLE, E.R. DO, ENCARNÇÃO, R.O., PADOVANI, C.R. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F₂ α or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology.**, v.49, p.667-81, 1998.

PINHEIRO, V.G., SOUZA, A.F., PEGORER, M.F., SATRAPA, R.A., ERENO, R.L., TRINCA, L.A., BARROS, C.M. Effects of temporary calf removal and eCG on pregnancy rates to timed-insemination in progesterone-treated postpartum Nellore cows. **Theriogenology**, v.71, p.519-524, 2009.

PRICE, C.A.; WEBB, R. Steroid control of gonadotropin secretion and ovarian function in heifers. **Endocrinol.**, v.122, p.2222-31, 1988.

PURSLEY, J.R., MEE, M.O., WILTBANK, M.C. Synchronization of ovulation in dairy cattle using GnRH and PGF2 α . **Theriogenology**, v.44, p.915-23, 1995.

RAHE, C.H., OWENS, R.E., FLEEEGER, J.L., NEWTON, H.J., HARMS, P.G. Patterns of luteinizing hormone in the cycling cow dependence upon period of the cycle. **Endocrinol.**, v.107, p.498-503, 1980.

RICE, C.A. The control of FSH secretion in the larger domestic species. **J. Endocrinol.**, v.131, p.177-84, 1991.

RICHARDS, J.S., RUSSELL, D.L., OCHSNER, S., ESPEY, L.L. Ovulation: New dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 64, p. 69-92, 2002.

RICHARDS, J.S. Ovulation: New factors that prepare the oocyte for fertilization. **Mol. Cell. Endocrinol.** v.234, p. 75-79, 2005.

RIVERA, G.M., CHANDRASEKHER, Y.A., EVANS, A.C.O., GIUDICE, L.C., FORTUNE, J.E. A potencial role for insulin-like growth factor binding protein-4 proteolysis in the establishment of ovarian follicular dominance in cattle. **Biol. Reprod.**, v.65, p.102-111, 2001.

RIVERA, G.M., FORTUNE, J.E. Development of co-dominant follicles in cattle is associated with a follicle-stimulating hormone –dependent insulin-like growth factor binding protein-4 protease. **Biol. Reprod.**, v.65, p.112-118, 2001.

ROBERT, C., GAGNÉ, 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. **Reprod.**, v.125, p.437-46, 2003.

ROBKER, R.L., RUSSELL, D.L., YOSHIOKA, S., SHARMA, S.C., LYDON, J.P., O'MALLEY, B.W., ESPEY, L.L., RICHARS, J.S. Ovulation: a multi-gene, multi-step process. **Steroids.**, v. 65, p. 559-570, 2000.

ROCHE, J.F., CROWE, M.A., BOLAND, M.P. Postpartum anestrous in dairy and beef cows. **Ani. Reprod. Sci.**, v.28, p.371-8, 1992.

SÁ FILHO, O.G., MENEGHETTI, M., PERES, R.F., LAMB, G.C., VASCONCELOS, J.L. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: Strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology.**, 2009, *in press*.

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.**, v.63, p.2382-2394, 2005.

SARTORI, R., FRICKE, P.M., FERREIRA, J.C.P., GINTHER, O.J., WILTBANK, M.C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biol. Reprod.**, v.65, p.1403-1409, 2001.

SAVIO, J.D., KEENAN, L., BOLAND, M.P., ROCHE, J.F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrus cycle of heifers. **J. Reprod. Fert.**, v.83, p.663-71, 1988.

SAVIO, J.D., BOLAND, M.P., HYNES, N., ROCHE, J.F. Resumption of follicular activity in the early postpartum period of dairy cows. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v.88, p.569-579, 1990a.

SAVIO, J.D., BOLAND, M.P., ROCHE, J.F. Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in postpartum dairy cows. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v.88, p.581-591, 1990b.

SCHOENEMANN, H.M., HUMPHREY, W.D., CROWDER, M.E, NETT, T.M., REEVES, J.J. Pituitary luteinizing hormone releasing receptors in

ovariectomized cows after challenge with ovarian steroids. **Biol. Reprod.**, v.32, p.574-83, 1985.

SENGER, P.L. Pathways to pregnancy and parturition. **Current Conceptions.**, 2^a ed, 2003.

SIROIS, J., FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrus cycle in heifers monitored by Real-Time Ultrasonography. **Biol. Reprod.**, v.39, p.308-17, 1988.

SMITH, J.T., CLIFTON, D.K., STEINER, R.A. Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. **Reprod.**, v.131, p.623–630, 2006.

STANISLAUS D., PINTER J.H., JANOVICK J.A., CONN P.M. Mechanisms mediating multiple physiological responses to gonadotropin-releasing hormone. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 144, p. 1-10, 1998.

STOCK, J., FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. **Endocrinol.**, v.132, p.1108-16, 1993.

TAYLOR, C., RAJAMAHENDRAN, R. Follicular dynamics and corpus luteum growth and function pregnant versus nonpregnant dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.74, p.115-23, 1991.

VIANA, J.H.M., FERREIRA, A.M., SÁ, W.F., CAMARGO, L.S.A. Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesq. agropec. bras.**, v.35, n.12, p.2501-2509, 2000.

WEBB, R., NICHOLAS, B., GONG, J.G., CAMPBELL, B.K., GUTIERREZ, C.G., GARVERICK, H.A., ARMSTRONG, D.G. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. **Reprod Suppl.** v. 61, p.71-90, 2003.

WILTBANK, M.C., GUMEN, A., SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology.**, v. 57, p. 21-52, 2002.

WOOLUMS, A.R., PETER, A.T. Cystic ovarian condition in cattle: Part I. Folliculogenesis and ovulation. **Compend. Cont. Educ. Article**, v.16, p.935-43, 1994.

WRIGHT, P.J.; MALMO, J. Pharmacological manipulation of fertility. **Appl. Food. Anim Pract.**, v.8, p.57-89, 1992.

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

CAPÍTULO 2

Determinação da taxa de ovulação e sua relação com diâmetro folicular e isoformas de mRNA para receptor de LH, em vacas da raça Nelore

Este artigo científico está de acordo com as normas para publicação na Theriogenology, exceto a apresentação das figuras, tabelas e idioma

Determinação da taxa de ovulação e sua relação com diâmetro folicular e isoformas de mRNA para receptor de LH, em vacas da raça Nelore

Running title:

Taxa de ovulação e expressão gênica de LHR

Renato A.L. Simões¹, Rafael A. Satrapa¹, Fernanda S. Rosa¹, Marcelo Piagentini⁴,
Anthony C.S. Castilho³, Ronaldo L. Ereno⁴, Luzia A. Trinca², Marcelo F.G. Nogueira⁵,
José Buratini Jr³, Ciro M. Barros^{1a}

Depto. de Farmacologia¹, Depto. de Biostatística², Depto. de Fisiologia³ – IB, Depto. de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária⁴ – FMVZ, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil e Depto. de Ciências Biológicas⁵, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Assis, São Paulo, Brasil

^aAutor para correspondência: Ciro M Barros; fax: +55 14 3815-3744; e-mail: cmbarros@ibb.unesp.br

Resumo

Objetivou-se com o presente trabalho verificar a relação entre diâmetro folicular, taxa de ovulação e a expressão gênica das isoformas do receptor de LH em vacas da raça Nelore. O experimento 1 foi realizado para verificar a dose mínima de LH capaz de induzir ovulação em folículos com diâmetro entre 10 e 11 mm. Vacas Nelore (n=20) foram submetidas à sincronização da ovulação e o crescimento folicular passou a ser acompanhado diariamente por ultrassonografia (US). Quando os folículos atingiram diâmetro entre 10 e 11 mm, os animais foram divididos em quatro grupos para receber diferentes doses de LH (Lutropin-V[®], Bioniche, Ontario, Canada; IM): 1,56; 3,12; 6,25 e 12,5 mg. Os dados foram analisados pelo Teste Exato de Fisher (PROC FREQ, do SAS). As taxas de ovulação foram 0 (0/5), 80 (4/5), 80 (4/5) e 80% (4/5), respectivamente, ocorrendo diferença significativa entre o grupo 1,56 mg e os demais ($p<0,02$). No experimento 2, foram utilizados 6,25 mg de LH para induzir ovulação em vacas Nelore (n=53) submetidas a sincronização da ovulação e divididas em cinco grupos de acordo com o diâmetro folicular (mm) no momento da administração de LH: Grupo 1 (7,0 a 7,5); Grupo 2 (7,6 a 8,0); Grupo 3 (8,1 a 8,5); Grupo 4 (8,6 a 9,0) e Grupo 5 (9,1 a 10,0). Os resultados foram analisados por Regressão Logística (PROC GENMOD, do SAS). As taxas de ovulação foram 0 (0/11), 20 (2/10), 36 (4/11), 36 (4/11) e 90% (9/10), respectivamente. Houve diferença significativa entre G5 e os demais grupos ($p<0,01$). Ao associar G1+G2 (7,0 a 8,0 mm), G3+G4 (8,1 a 9,0 mm) e G5 (9,1 a 10,0 mm) as taxas de ovulação foram 9 (2/21), 36 (8/22) e 90% (9/10), respectivamente. Houve diferença significativa entre G1+G2 vs G5 ($p<0,01$), G3+G4 vs G5 ($p<0,02$) e G1+G2 vs G3+G4 ($p<0,03$). Após a administração de

LH, o diâmetro do menor folículo capaz de ovular foi 7,65 mm. No experimento 3, células da teca e da granulosa provenientes de folículos de abatedouro foram submetidas a técnica de RT-PCR utilizando GAPDH como controle interno para avaliar a expressão gênica das isoformas do LHR (M1, M2, M3 e M4). Os folículos foram dissecados, mensurados com paquímetro e agrupados de acordo com o diâmetro folicular (mm): Grupo A (8,0 a 9,0) Grupo B (9,1 a 10,0) e Grupo C (10,1 a 11,0). Considerando que folículos mensurados com paquímetro são em média 1,0 mm maiores do que os obtidos por US, os grupos A, B e C correspondem aos grupos G1+G2; G3+G4 e G5 (experimento 2). Somente foram utilizados folículos com razão $E_2/P_4 > 1$. Desta forma, de um total de 400 ovários foram obtidas 5, 4 e 4 (n=13) amostras de células da granulosa e 7, 8 e 8 amostras de células da teca (n=23) para os Grupos A, B e C respectivamente. Os resultados foram analisados por ANOVA e Correlação de Pearson. Nas células da teca, não houve diferença significativa na expressão gênica da somatória das isoformas do LHR (M1+M2+M3+M4) entre os grupos A, B e C. Entretanto nas células da granulosa, folículos do Grupo A obtiveram menor expressão gênica do LHR (16,5; mRNA LHR/mRNA GAPDH) quando comparados aos do Grupo C (37,6; $p < 0,05$). Houve correlação positiva entre o aumento da expressão gênica das isoformas M4 e M3 com o aumento no diâmetro folicular. Conclui-se que em fêmeas zebuínas a capacidade ovulatória está relacionada ao aumento do diâmetro folicular e consequente aumento da expressão gênica da somatória das isoformas do LHR nas células da granulosa.

Palavras-chave: *Bos indicus*; expressão gênica; folículo; LHR; ovulação

1. Introdução

O agronegócio brasileiro destaca-se por contribuir com 25,1% do produto interno bruto (PIB) do país [1]. A pecuária bovina insere-se neste contexto por possuir o maior rebanho comercial do mundo com mais de 207 milhões de cabeças [2] consagrando o país como maior exportador de carne dessa espécie. Dentre as raças de corte, a Nelore (*Bos indicus*) é a que possui o maior contingente numérico (acima de 90 milhões de cabeças [3]).

O emprego de biotécnicas reprodutivas como a inseminação artificial (IA) e transferência de embriões (TE) são fundamentais para o melhoramento genético de bovinos [4-9]. A inseminação artificial pode trazer benefícios econômicos, em curto prazo, para a grande maioria dos pecuaristas. Entretanto, a carência de pessoal treinado e deficiências básicas de manejo nas propriedades têm limitado uma utilização mais ampla. Um dos principais fatores que determinam o sucesso de um programa de inseminação artificial é a detecção do estro, a qual requer tempo e pessoal adequadamente treinado. Em fêmeas zebuínas, a curta duração do estro (cerca de 11 horas) dificulta a detecção do mesmo e prejudica a implantação de programas convencionais de IA [10].

A partir do conhecimento detalhado da dinâmica folicular [11] tornou-se possível o desenvolvimento de tratamentos hormonais capazes de regular o crescimento folicular e o momento da ovulação, de forma a viabilizar a inseminação artificial em tempo fixo (IATF, ou seja, IA em tempo pré-determinado, sem a necessidade de observar estro) em taurinos [12-15] e zebuínos [4,16-21]. De forma similar, o desenvolvimento folicular e o momento da ovulação podem ser controlados farmacologicamente para melhorar os

tratamentos superestimulatórios empregados na transferência de embriões [5,7,8,22].

Vários protocolos hormonais para IATF e transferência de embriões em tempo fixo (TETF) têm sido desenvolvidos graças ao melhor entendimento da dinâmica folicular bovina. Está bem caracterizado, tanto em raças européias (*Bos taurus*) quanto zebuínas (*Bos indicus*), que durante o ciclo estral bovino ocorrem duas a três ondas de crescimento folicular. Uma fase crítica para o desenvolvimento dos folículos ovarianos é o desvio folicular, momento em que ocorre a maior diferença na taxa de crescimento entre os dois maiores folículos da onda [23,24]. No momento do desvio folicular, o diâmetro do futuro folículo dominante é de 8,5 mm em animais taurinos [23,25,26] e cerca de 6,0 mm em zebuínos [27-30].

Existe controvérsia na literatura a respeito do momento em que os folículos ovarianos adquirem receptores de LH (LHR) nas células da granulosa. Segundo alguns autores, o futuro folículo dominante adquire LHR antes da fase de desvio folicular [25,26,31] enquanto que outros reportam que a expressão do LHR ocorre após o desvio folicular [28,32-36].

Em fêmeas predominantemente da raça Nelore [35] e novilhas puras de origem (PO) Nelore [28], foi relatado que o início da expressão gênica das isoformas do LHR na superfície das células da granulosa ocorreu somente a partir de 7,0 mm, sendo significativamente influenciado pelo diâmetro folicular. Os autores observaram que as células da granulosa não adquirem LHR funcionais até que a dominância folicular esteja estabelecida.

Desta forma, Nogueira et al. [35] avaliaram as diferentes isoformas de mRNA para LHR nas células da teca e granulosa de vacas predominantemente

Nelore, posicionando os oligonucleotídeos iniciadores nas regiões compreendidas entre os éxons 2 e 9 (LHR-A) e entre éxons 9 e 11 (LHR-B) do gene. Na região LHR-A verificou-se a existência de 2 isoformas: N1 ou LHR-A1 (forma completa ou “full-length”) e N2 ou LHR-A2 (deleção do éxon 3). Na região LHR-B observou-se a presença de 4 isoformas: M1 ou LHR-B3 (forma completa ou “full length”), M2 ou LHR-B4 (deleção do éxon 10), M3 ou LHRB-5 (deleção de parte do éxon 11) e M4 ou LHR-B6 (deleção do éxon 10 e parte do éxon 11).

Sartori et al. [37] avaliando a capacidade ovulatória em vacas da raça Holandesa (*Bos taurus*), verificaram que folículos com 7,0 e 8,5 mm de diâmetro não ovularam, mesmo após a administração de uma dose elevada (40 mg) de LH. Entretanto, 80% (8/10) das vacas com folículos de 10 mm ovularam após o tratamento com LH. Os autores concluíram que o folículo dominante adquire capacidade ovulatória somente após o desvio folicular. Em novilhas zebuínas, Gimenes et al. [29] observaram que a aplicação de 25 mg de LH induziu taxas de ovulação de 33,3; 80,0 e 90,0% quando os folículos possuíam diâmetros de 7,0 a 8,4; 8,5 a 10 e acima de 10 mm, respectivamente.

Considerando-se a controvérsia na literatura e a importância dos receptores de LH para a ovulação, objetivou-se com o presente trabalho verificar a relação entre diâmetro folicular, taxa de ovulação e a expressão gênica das isoformas do LHR nas células da teca e granulosa de fêmeas predominantemente da raça Nelore.

2. Materiais e Métodos

2.1. Local do experimento e animais

Os experimentos 1 e 2 foram realizados na fazenda Siriema do Lago no município de Bernardino de Campos, estado de São Paulo, Brasil (Latitude: -23° 00' 36" sul, Longitude: -49° 28' 44" oeste; Altitude: 695 m) durante o período de novembro de 2007 a abril de 2008 . Vacas Nelore multíparas, puras de origem (*Bos indicus* n=73), com média de idade entre cinco e sete anos, escore de condição corporal acima de 3 (escala de 1 a 5, [38]) e com mais de 60 dias pós-parto foram mantidas em pastagens de *Brachiaria decumbens* com suplementação mineral e água *ad libitum*.

2.2. Tratamentos hormonais e ultrassonografia

Os animais foram submetidos à sincronização da ovulação por meio do protocolo PEPE (progesterona-estrógeno-prostaglandina-estrógeno): em dia aleatório do ciclo estral (D0) os animais receberam um dispositivo intravaginal contendo progesterona (1,0 g, Primer[®], Tecnopec, São Paulo, Brasil) e 2,5 mg de benzoato de estradiol (BE, IM, RIC-BE[®], Syntex, Buenos Aires, Argentina). Oito dias depois (D8) as vacas foram tratadas com PGF₂ α (150 μ g d-cloprostenol, IM, Prolise[®], ARSA S.R.L., Buenos Aires, Argentina) e o dispositivo intravaginal contendo progesterona foi removido. Após 24 horas da remoção do dispositivo, as vacas receberam BE (1,0 mg, IM, Figura 1).

No início dos tratamentos hormonais (D0), todos os animais foram submetidos à ultrassonografia (US, Aloka[®] 900, Tokyo, Japão, transdutor retal de 7,5 a 9,0 MHz) para avaliar a condição ovariana. Foram selecionados somente animais com folículos acima de 8,0 mm e/ou corpo lúteo (CL) em pelo menos um dos ovários. Nos dias nove (D9) e onze (D11), a ultrassonografia foi

realizada para detectar a presença do folículo dominante e a taxa de ovulação, respectivamente. Considerou-se como ovulação no D11 a não visualização do folículo dominante verificado no D9 pela ultrassonografia.

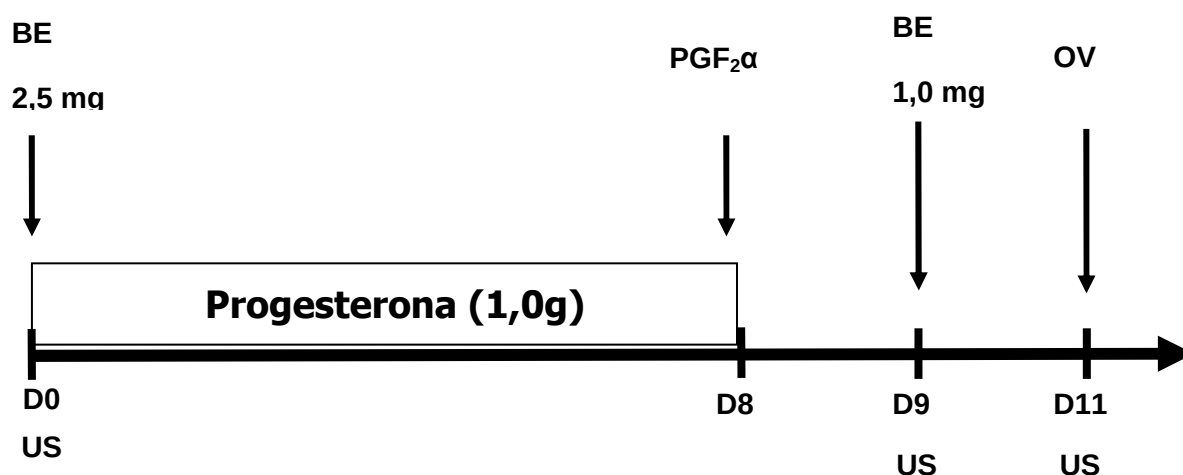


Figura 1. Protocolo para sincronização da ovulação (PEPE) realizado em vacas Nelore. BE= Benzoato de estradiol, $\text{PGF}_{2\alpha}$ = Prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$, D= Dia, US= Exame ultrassonográfico, OV= ovulação.

2.3. Teste preliminar para determinação da dose mínima de LH (Experimento 1)

O experimento 1 foi realizado para determinar a dose mínima de LH (Lutropin[®], Bioniche Animal Health, Inc., Belleville, Ontário, Canadá) capaz de induzir ovulação em pelo menos 80% das vacas com folículo pré-ovulatório com diâmetro entre 10 e 11 mm. Vacas Nelore (n=20) foram previamente sincronizadas com o protocolo PEPE e a partir do terceiro dia após a ovulação, o crescimento folicular passou a ser acompanhado diariamente por ultrassonografia.

Quando os folículos atingiram diâmetro entre 10 e 11 mm, as vacas foram divididas aleatoriamente em quatro grupos e tratadas com diferentes doses de LH (IM): Grupos 1,56 (n=5); 3,12 (n=5); 6,25 (n=5) e 12,5 mg (n=5). Vinte e quatro e 48 horas após a administração de LH, a taxa de ovulação foi determinada por meio de ultrassonografia.

2.4. Determinação da taxa de ovulação em diferentes diâmetros foliculares (Experimento 2)

Após a determinação da dose de LH (experimento 1), 53 vacas Nelore foram submetidas ao protocolo PEPE e a partir do terceiro dia após ovulação o crescimento folicular passou a ser acompanhado diariamente por ultrassonografia e os animais foram divididos em cinco grupos (escala de 0,5 mm), de acordo com o diâmetro folicular no momento da aplicação de 6,25 mg de LH: Grupo 1 (7,0 a 7,5 mm, n=11), Grupo 2 (7,6 a 8,0 mm, n=10), Grupo 3 (8,1 a 8,5 mm, n=11), Grupo 4 (8,6 a 9,0 mm, n=11) e Grupo 5 (9,1 a 10,0 mm, n=10). Vinte e quatro e 48 horas após a aplicação de LH, a ultrassonografia foi realizada para determinar a taxa de ovulação.

Quando se avaliou a taxa de ovulação considerando-se a escala de 1,0 mm, os animais foram divididos em três grupos: G1+G2 (7,0 a 8,0 mm, n=21), G3+G4 (8,1 a 9,0 mm, n=22) e G5 (9,1 a 10,0 mm, n=10).

2.5. Expressão gênica das isoformas do LHR nas células da teca e granulosa em diferentes diâmetros foliculares e relação com a taxa de ovulação verificada in vivo (Experimento 3)

2.5.1. Obtenção das amostras

Com o objetivo de relacionar as taxas de ovulação obtidas no experimento 2 (escala de 1,0 mm) com a expressão gênica das isoformas do LHR nas células da teca e da granulosa, cerca de 400 ovários foram obtidos de vacas predominantemente Nelore (*Bos indicus*) em frigorífico situado a 50 Km da UNESP, campus de Botucatu, e transportados ao laboratório em solução fisiológica (NaCl 0,9%) refrigerada. Destes ovários, foi obtido um total de 189 folículos que foram mensurados com o auxílio de um paquímetro.

Os folículos foram dissecados de acordo com o diâmetro folicular e separados nos seguintes grupos: Grupo A (8,0 a 9,0 mm), Grupo B (9,1 a 10,0 mm) e Grupo C (10,1 a 11,0 mm). Levando-se em consideração que folículos dissecados são em média 1,0 mm maiores em diâmetro em relação aos mensurados por meio de ultrassonografia [28], estes diâmetros foliculares determinados com paquímetro correspondem aos seguintes diâmetros mensurados por ultrassonografia: 7,0 a 8,0; 8,1 a 9,0 e 9,1 a 10,0 mm, respectivamente (Experimento 2).

O fluido folicular foi aspirado e congelado para a determinação das concentrações de progesterona e estradiol 17- β por radioimunoensaio. A cavidade folicular foi lavada repetidamente com solução fisiológica refrigerada e as células da granulosa foram obtidas por centrifugação a 5.000xg por 1 minuto para concentrar as células e possibilitar a remoção da solução fisiológica. Logo após a recuperação das células da granulosa, o folículo foi

dividido ao meio com auxílio de uma lâmina de bisturi e a camada de células da teca foi destacada da face interna da parede folicular com pinças oftálmicas e lavada em solução fisiológica por meio de repetidas passagens em seringa de 1 mL, a fim de eliminar células da granulosa remanescentes. As amostras foram colocadas em Trizol[®] (Invitrogen, São Paulo, Brazil) e homogeneizadas com Politron (Ultraturrax[®]). O RNA total foi extraído de acordo com o protocolo Trizol e armazenado a -70°C .

2.5.2. Radioimunoensaio

Para determinar as concentrações intrafoliculares de estradiol e progesterona foram utilizados os kits de Estradiol DSL-4400[®] (Diagnostics Systems Laboratories, Texas, USA) e Progesterona DSL-3400[®] (Diagnostics Systems Laboratories, Texas, USA). Além disso, uma curva padrão específica foi construída a partir de estradiol e progesterona liofilizada (Sigma; St.Louis, MO, USA), respectivamente.

O intervalo das concentrações de estradiol utilizado na curva padrão foi de 0,031 a 250 pg/100 μL . As concentrações de estradiol no fluido folicular foram determinadas, e os coeficientes de variação intra e inter-ensaios foram de 5,17% e 11,3%, respectivamente. O limite de detecção do estradiol foi de 0,1 ng/mL e a diluição utilizada (PBS) para o fluido folicular foi de 1:500.

O intervalo das concentrações de progesterona utilizado na curva padrão foi de 3,9 a 1000 pg/25 μL . As concentrações de progesterona no fluido folicular foram determinadas, e os coeficientes de variação intra e inter-ensaios foram de 2,5% e 8,7%, respectivamente. O limite de detecção foi de 1,56 ng/mL e a diluição utilizada (PBS) para o fluido folicular foi de 1:10.

Foram selecionados somente folículos com razão $E_2/P_4 > 1$, por serem considerados folículos não atresícos [39,40]. Portanto, baseado neste critério, dos 189 folículos dissecados foram utilizados somente 26 (13,7%).

2.5.3. *Transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)*

Após a extração do RNA total, as amostras foram tratadas com DNase I[®] (Invitrogen), para evitar a interferência de DNA genômico nas análises de expressão gênica. A transcrição reversa foi realizada utilizando-se 1 µg de RNA pelo protocolo SuperScript III[®] (Invitrogen).

A expressão gênica das isoformas do LHR-B (região compreendida entre os éxons 9 e 11) foi avaliada por RT-PCR semi-quantitativo utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores que abrangeram as isoformas M1 (forma completa ou “full length”), M2 (deleção do éxon 10), M3 (deleção parcial do éxon 11) e M4 (deleção do éxon 10 e parcial do éxon 11) de acordo com Nogueira et al. [35]. O iniciador “sense” foi posicionado no éxon 9 (5'-AAACTTGCCAACAAACGA-3') e o “anti-sense” no éxon 11 que codifica o domínio intracelular (5'ATAGCAAGTCTTGTCCAGGA-3').

Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores para o gene constitutivo gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) descritos por Buratini et al. [41]. A PCR foi realizada com 0,5 µL de cDNA no PCR “mastermix” contendo 1,25 U de Platinum Taq DNA polimerase[®] (Invitrogen), 0,4 µM de oligonucleotídeos iniciadores para LHR, 0,16 µM de oligonucleotídeos iniciadores para GAPDH, 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂ e água para completar o volume total de 25 µL.

Para avaliar a expressão do mRNA para LHR nas células da teca e da granulosa, as amostras foram desnaturadas por 3 minutos a 95 °C, seguidas

por 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, anelamento a 60 °C por 1 minuto e extensão a 70 °C por 1 minuto. Para o GAPDH, a PCR foi realizada com 24 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 segundos, anelamento a 60 °C por 45 segundos e extensão a 70 °C por 1 minuto. Os ciclos foram adaptados de acordo com Nogueira et al. [35].

Todas as reações de PCR foram realizadas com controles positivos (RNA de “pools” de células da teca) e negativos (água). Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2,5%, corados com GelRed® (Nucleic Acid Gel Stain, Biotium, USA) e as bandas específicas foram quantificadas por densitometria (Image Gauge®, Fuji Photo Film Co., Ltd, Tokyo, Japão).

Contaminação cruzada das células da teca e da granulosa foram testadas por PCR em todas as amostras pela detecção do mRNA das enzimas citocromo P450 aromatase (CYP19A1) para as células da teca e 17 α -hidroxilase (CYP17A1) para as células da granulosa, como previamente descrito [41]. A presença de amplicons CYP19A1 nas amostras de células da teca ou CYP17A1 nas amostras de células da granulosa indicou contaminação cruzada e estas amostras foram descartadas.

Do total de 26 folículos com razão $E_2/P_4 > 1$, três apresentaram contaminação de células da granulosa nas células da teca, obtendo-se, desta maneira, 23 amostras de RNA para as células da teca. Nas células da granulosa, quatro folículos não apresentaram bandas com expressão nitidamente identificáveis e em nove foram observadas contaminações com células da teca. Portanto, restaram 13 amostras de RNA para LHR nas células da granulosa.

Desta forma, levando-se em consideração o diâmetro folicular, razão E_2/P_4 , bandas não nitidamente identificáveis e os testes de contaminação, os folículos foram distribuídos nos seguintes grupos: Grupo A (n=7), Grupo B (n=8) e Grupo C (n=8) nas células da teca e Grupo A (n=5), Grupo B (n=4) e Grupo C (n=4) nas células da granulosa.

2.6. Análise Estatística

Os resultados dos experimentos 1 e 2 foram analisados pelo Teste Exato de Fisher (PROC FREQ) e por Regressão Logística (PROC GENMOD) respectivamente, utilizando o programa Statistical Analysis System [42]. Para analisar a expressão gênica da somatória das isoformas do LHR ($M1+M2+M3+M4$) nas células da teca e da granulosa, bem como cada isoforma do LHR nas células da teca entre os grupos A, B e C foi realizada Análise de Variância (ANOVA) não paramétrica (Kruskal-Wallis) e quando houve diferença significativa foi realizado o teste *a posteriori* de Dunn. Para analisar a expressão das isoformas do LHR nas células da granulosa entre os grupos A, B e C foi realizada Análise de Variância (ANOVA) paramétrica (One way). A relação entre a expressão das isoformas do LHR nas células da granulosa e o diâmetro folicular foi determinada pela Correlação de Pearson, incluindo como co-variável a razão E_2/P_4 . A análise da relação entre taxa de ovulação e a expressão gênica das isoformas do LHR foi realizada mediante estatística descritiva. Os testes de Análise de Variância e Correlação de Pearson foram realizados utilizando-se o SigmaStat [43].

3. Resultados

3.1. Experimento 1

As taxas de ovulação nos grupos 1,56; 3,12; 6,25 e 12,5 mg encontram-se sumariadas na figura 2. Houve diferença significativa entre o grupo 1,56 mg e os demais ($p<0,02$).

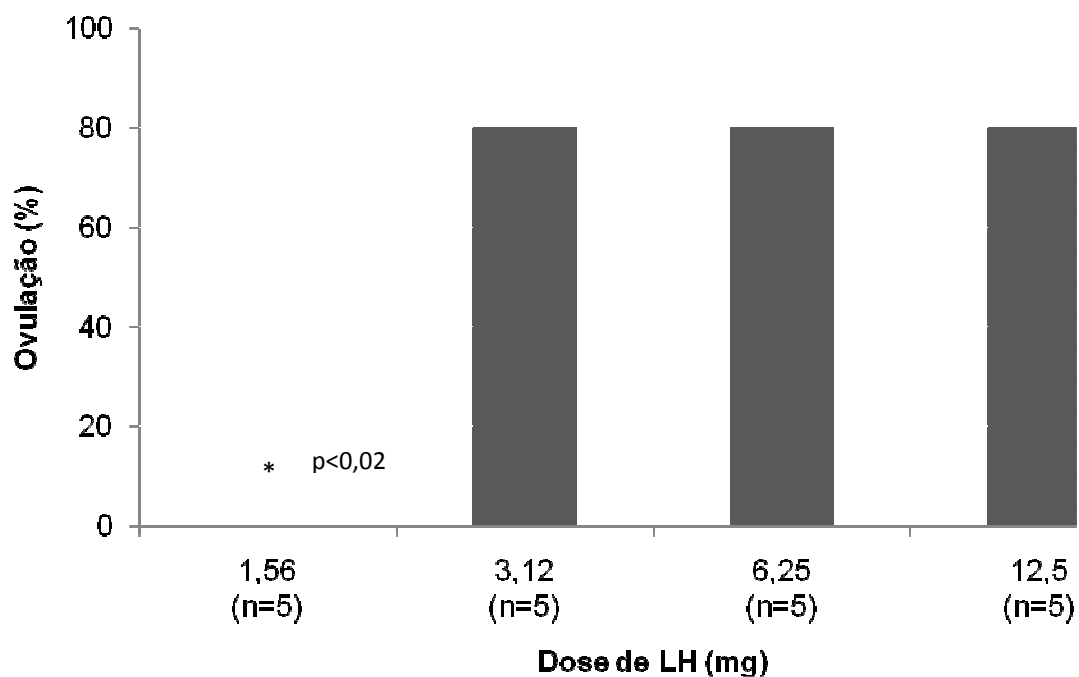


Figura 2. Taxa de ovulação de acordo com a dose de LH utilizada em vacas com folículos de 10 a 11 mm de diâmetro.

3.2. Experimento 2

As taxas de ovulação nos grupos G1, G2, G3, G4 e G5 foram 0 (0/11), 20 (2/10), 36 (4/11), 36 (4/11) e 90% (9/10), respectivamente. Houve diferença significativa entre G5 e os demais grupos ($p<0,01$; figura 3).

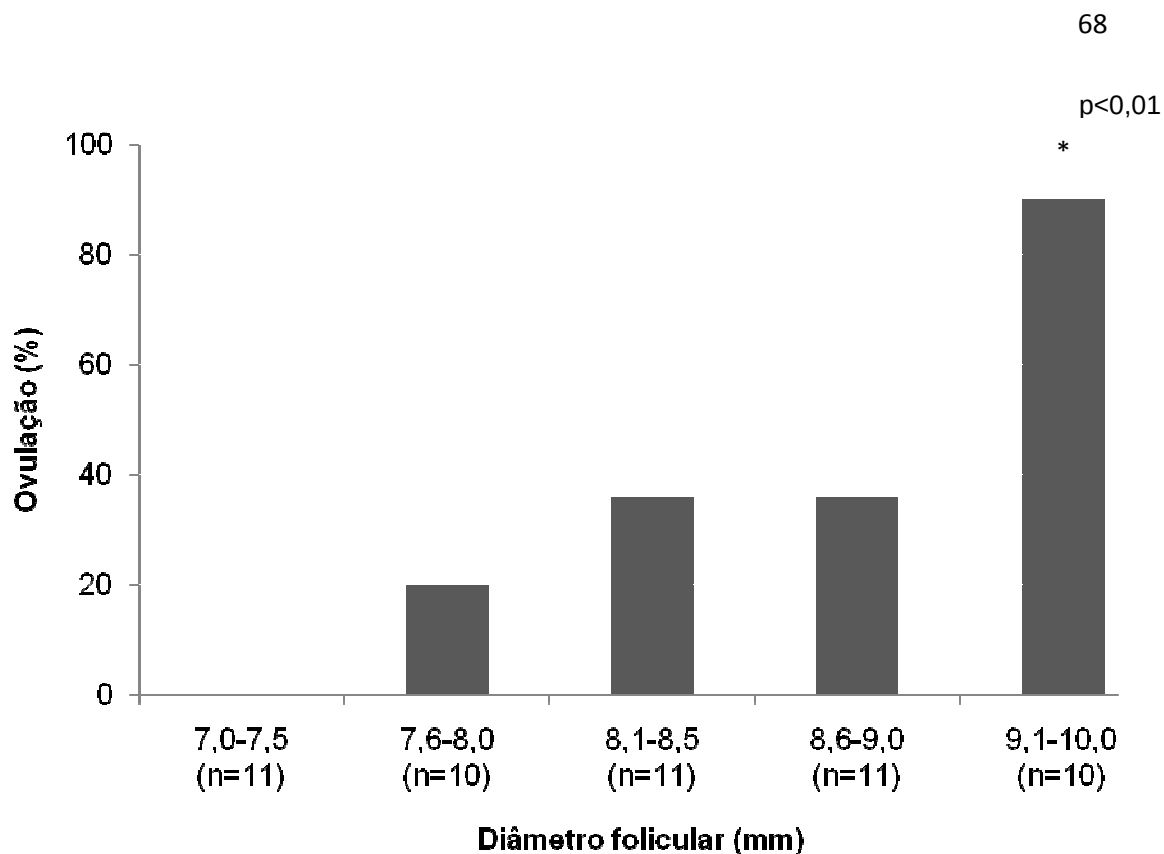


Figura 3. Taxa de ovulação em vacas com folículos de 7,0 a 7,5 mm (G1); 7,6 a 8,0 mm (G2); 8,1 a 8,5 mm (G3); 8,6 a 9,0 mm (G4) e 9,1 a 10,0 mm (G5) tratados com 6,25 mg de LH.

Ao associar-se o grupo G1 com G2 (7,0 a 8,0 mm) e G3 com G4 (8,1 a 9,0 mm) para comparar diâmetros foliculares com intervalos de 1,0 mm, obteve-se as seguintes taxas de ovulação: 9 (2/21) e 36% (8/22), respectivamente. Foram observadas diferenças significativas ao comparar-se G1+G2 vs G5 ($p<0,01$), G3+G4 vs G5 ($p<0,02$) e G1+G2 vs G3+G4 ($p<0,03$; figura 4).

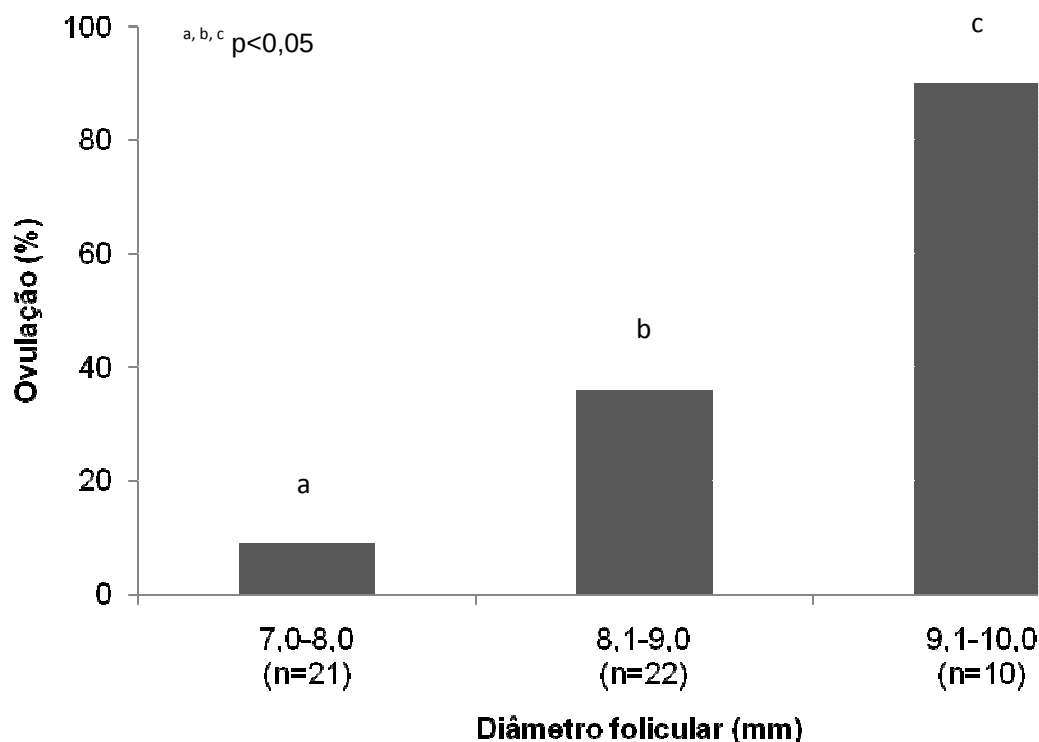


Figura 4. Taxa de ovulação em vacas com folículos de 7,0 a 8,0 mm (G1+G2); 8,1 a 9,0 mm (G3+G4) e 9,1 a 10,0 mm (G5) tratados com 6,25 mg de LH.

3.3. Experimento 3

Nas células da teca, não houve diferença significativa ($p > 0,9$) na expressão gênica da somatória (valores em mediana) das isoformas do LHR (isoformas de mRNA LHR/mRNA GAPDH) nos Grupos A (64,71), B (62,00) e C (72,83), respectivamente. Entretanto, nas células da granulosa houve diferença entre os Grupos A e C ($p < 0,05$), observando-se aumento na expressão gênica da somatória (valores em mediana) das isoformas do LHR nas células da granulosa de acordo com o aumento no diâmetro folicular (Figura 5 e Tabela 1).

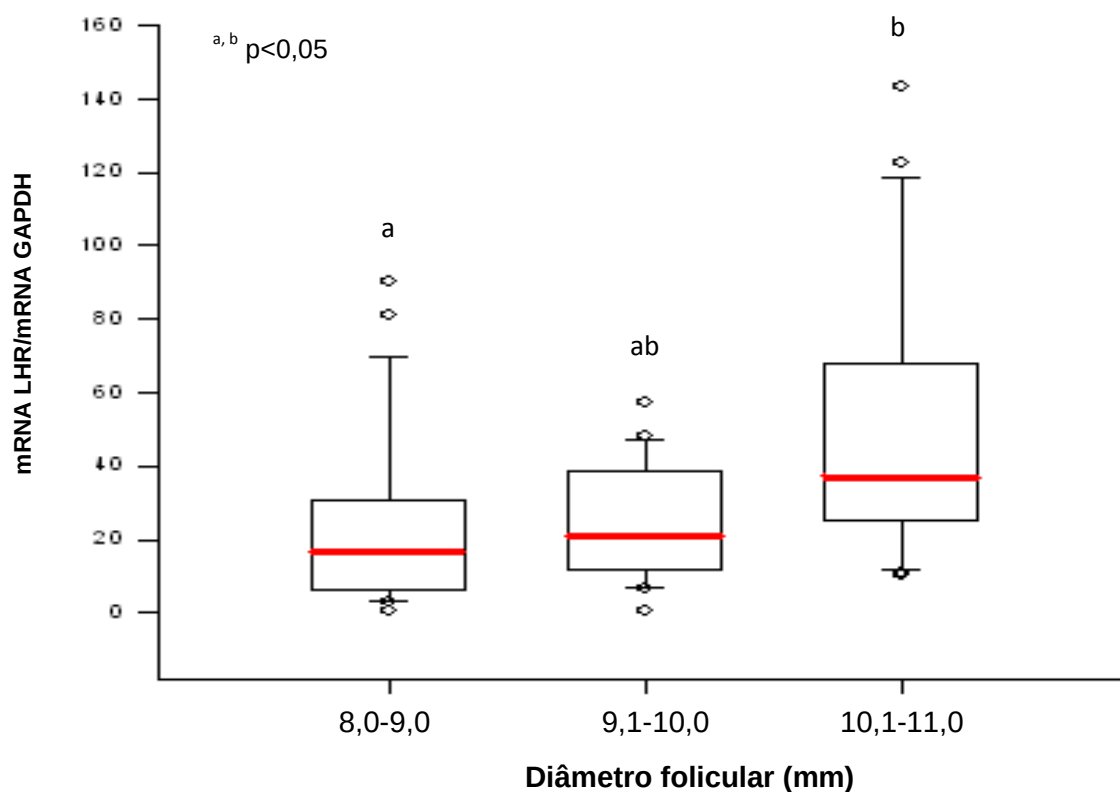


Figura 5. Expressão gênica (valores em mediana) da somatória das isoformas do LHR (M1+M2+M3+M4; isoformas de mRNA LHR/mRNA GAPDH) nas células da granulosa de folículos com 8,0 a 9,0 mm (Grupo A); 9,1 a 10,0 mm (Grupo B) e 10,1 a 11,0 mm (Grupo C).

Não foi observada diferença significativa quando se comparou a expressão gênica de cada isoforma (M1, M2, M3 e M4) das células da teca e da granulosa entre os grupos A, B e C (Figura 6; Anexo 1 e 2). Entretanto, quando se avaliou a expressão gênica das isoformas do LHR nas células da granulosa de acordo com o diâmetro individual de cada folículo (n=13), sem considerar o grupo experimental, foi observada correlação positiva entre o

aumento das isoformas M4 ($r = 0,635$; $p = 0,02$) e M3 ($r = 0,541$; $p = 0,056$) com o aumento no diâmetro folicular.

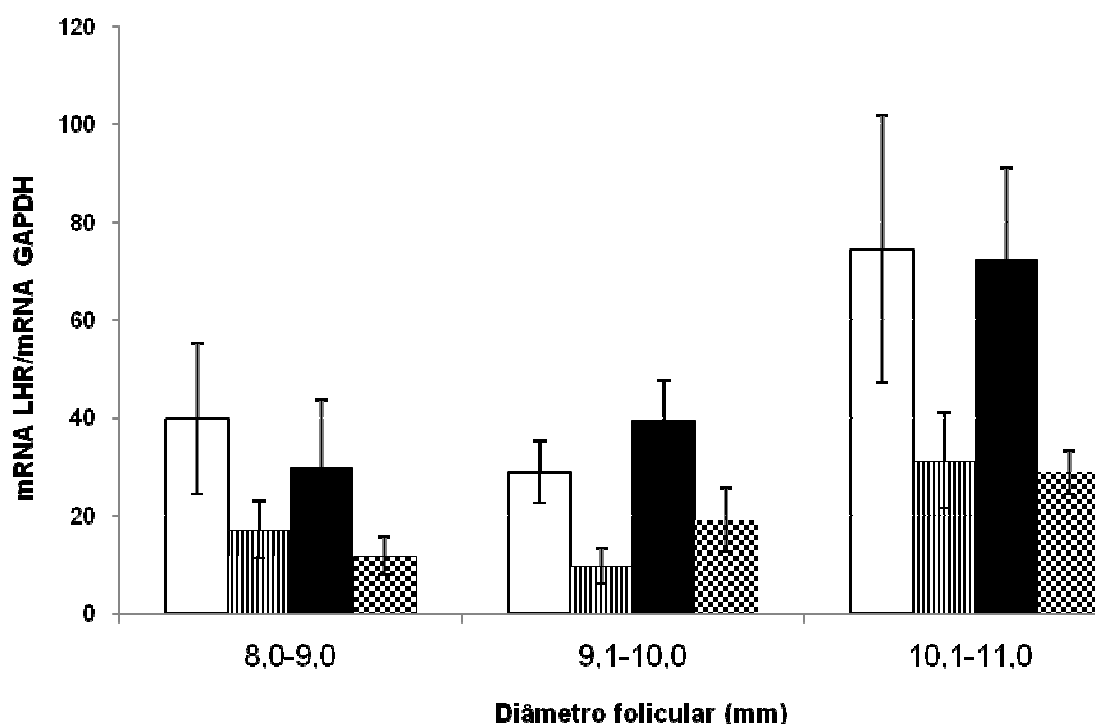


Figura 6. Expressão gênica das isoformas do LHR (M1 □ , M2 ▨ , M3 ■ e M4 ▩) nas células da granulosa (Média±EPM; mRNA LHR/mRNA GAPDH) em folículos com 8,0 a 9,0 mm (Grupo A); 9,1 a 10,0 mm (Grupo B) e 10,1 a 11,0 mm (Grupo C).

Para avaliar a relação entre as taxas de ovulação obtidas no experimento 2 (escala de 1,0 mm) com a expressão gênica da somatória das isoformas do LHR (M1+M2+M3+M4) ou com a expressão individual de cada isoforma (M1, M2, M3 e M4) observada no experimento 3 (nas células da teca e da granulosa), foram comparados os seguintes grupos: G1+G2 vs Grupo A, G3+G4 vs Grupo B e G5 vs Grupo C. Houve relação entre a expressão gênica

da somatória das isoformas do LHR nas células da granulosa (Grupos A, B e C) e as taxas de ovulação observadas no experimento 2 (Grupos G1+G2, G3+G4 e G5), respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Diâmetro folicular mensurado com ultrassom (Experimento 2) ou paquímetro (Experimento 3), taxa de ovulação (Experimento 2) e expressão gênica da somatória (valores em mediana) das isoformas do LHR (M1+M2+M3+M4; mRNA LHR/mRNA GAPDH) nas células da granulosa (Experimento 3).

Diâmetro Folicular (mm) +			
Ultrassom	Paquímetro	Taxa de Ovulação (%)	mRNA LHR/mRNA GAPDH
(Exp. 2)	(Exp. 3)	(Exp. 2)	(Exp. 3)
7,0-8,0	8,0-9,0	9,0 ^a	16,5 ^a
8,1-9,0	9,1-10,0	36,0 ^b	21,0 ^{ab}
9,1-10,0	10,1-11,0	90,0 ^c	37,6 ^b

^{a,b,c} Letras diferentes na mesma coluna ($p < 0,05$)

+ Folículos mensurados com paquímetro são em média 1,0 mm maiores do que os determinados por meio de ultrassonografia. Portanto, o diâmetro dos folículos do Experimento 3 corresponde aos do Experimento 2.

4. Discussão

No presente estudo, foi confirmada a hipótese de que com o aumento no diâmetro folicular ocorre aumento na taxa de ovulação e maior expressão gênica da somatória das isoformas do LHR (M1+M2+M3+M4) nas células da granulosa de folículos provenientes de vacas aneloradas, enquanto que nas células da teca o perfil de expressão gênica não foi alterado.

No experimento 1, foi verificado que a dose de 1,56 mg não induziu ovulação em nenhum folículo com diâmetro entre 10,0 e 11,0 mm. Desta forma, a dose mínima de LH capaz de induzir ovulação em 80% dos animais foi 3,12 mg e ao aumentar-se a dose de LH (6,25 e 12,5 mg) a taxa de ovulação manteve-se em 80%. Sartori et al. [37] observaram baixa taxa de ovulação (7,7 e 17%) quando administraram 4 mg de LH em vacas HPB com folículos de 10,0 e 11,0 mm de diâmetro respectivamente. Desta maneira, ao comparar-se doses semelhantes de LH (3,12 vs 4,0 mg) em animais com folículos dominantes entre 10,0 e 11,0 mm observou-se ovulação em 80% nas vacas Nelore (presente trabalho) e apenas 10,5% (2/19) nas HPB [37], indicando desta maneira que a taxa de ovulação pode ser diferente de acordo com a espécie bovina (*indicus* vs *taurus*).

De acordo com Ereno [28] folículos mensurados com paquímetro são em média 1,0 mm maiores que os determinados por ultrassonografia. Portanto, folículos com 10,0 a 11,0 mm no exame ultrassonográfico (Experimento 1) correspondem a folículos com 11,0 a 12,0 mm de diâmetro quando mensurados com paquímetro. No presente estudo, folículos acima de 10,0 mm de diâmetro (mensurados com paquímetro) apresentaram alta expressão gênica da somatória das isoformas do LHR nas células da granulosa (Experimento 3), indicando que a elevada taxa de ovulação (80%) mesmo com dose reduzida de LH (3,12 mg) está relacionada a uma elevada expressão gênica da somatória das isoformas do LHR nas células da granulosa em folículos com mais de 10,0 mm de diâmetro na raça Nelore.

No experimento 2, após a administração de 6,25 mg de LH, observou-se aumento na taxa de ovulação (9, 36 e 90%) de acordo com o aumento no

diâmetro folicular (7,0 a 8,0; 8,1 a 9,0 e 9,1 a 10,0 mm, respectivamente). Estes resultados corroboram os de Gimenes et al. [29] que avaliaram a capacidade ovulatória de novilhas zebuínas de acordo com o diâmetro folicular (7,0 a 8,4; 8,5 a 10,0 e acima de 10,0 mm) e, após administração de 25 mg de LH, observaram taxas de ovulação de 33, 80 e 90%, respectivamente. Por outro lado, discordam daqueles relatados por Sartori et al. [37] que avaliaram a capacidade ovulatória de folículos com 7,0; 8,5 e 10,0 mm em vacas HPB tratadas com 40 mg de LH e observaram taxas de ovulação de 0 (0/9); 0 (0/9) e 80% (8/10), respectivamente. Os dados acima indicam que os zebuínos adquirem capacidade ovulatória com folículos menores do que os relatados para a raça HPB. No entanto, Martinez et al. [44], observaram em novilhas mestiças taurinas (Charolês x Simental) taxas de ovulação de 0, 50, 100 e 100%, em folículos com 7, 8, 9 e 10 mm, respectivamente.

Similar a capacidade ovulatória, o desvio folicular ocorre em folículos menores para raças zebuínas (6,0 mm; [27-30]) quando comparado a raça HPB (8,5 mm; [23,25,26]) e a aquisição de LHR nas células da granulosa, é detectada em folículos com diâmetro inferior (a partir de 7,0 mm) em zebuínos [28,35] quando comparado a raça HPB, que se inicia a partir de 8,0 mm [31] ou após o desvio folicular [33].

Ao analisar os resultados do presente experimento considerando-se a taxa de ovulação de folículos com 7,0 a 10,0 mm de diâmetro, verifica-se que a mesma foi menor (35,8% 19/53) do que a relatada por Gimenes et al. [29] (57,8%, 11/19). Esta diferença na taxa de ovulação pode ser explicada pela menor dose de LH utilizada no experimento 2 (6,25 mg), quando comparada a administrada por Gimenes et al. [29] (25 mg), uma vez que Sartori et al. [37]

observaram aumento na taxa de ovulação (7,7; 69,2 e 80%), de folículos com 10,0 mm de diâmetro, a medida em que incrementaram a dose de LH (4, 24 e 40 mg, respectivamente).

No experimento 3, não houve relação entre diâmetro folicular e expressão gênica das isoformas do LHR nas células da teca. Estes dados estão de acordo com aqueles publicados por Evans & Fortune [45] e Nogueira et al. [35], e diferem dos relatados por Xu et al. [36] e Bao et al. [32]. Com relação às células da granulosa, o aumento da expressão gênica das isoformas do LHR coincidiu com o aumento do diâmetro folicular, corroborando resultados previamente publicados [31,32,35,36,46] e contrariando os dados de Bodensteiner et al. [47]. Estes resultados contraditórios podem ser explicados, ao menos em parte, pela diferentes técnicas (RT-PCR semi-quantitativo, hibridização *in situ*, radioreceptor e RT-PCR quantitativo) e “primers” utilizados na determinação da expressão do LHR, os quais podem influenciar a obtenção e interpretação dos resultados.

Outro aspecto a ser considerado é o fato de que nos trabalhos em que foram utilizados ovários de abatedouros ([31,35] e experimento 3 do presente trabalho) não é possível determinar se os folículos se encontravam em fase inicial de crescimento ou de atresia (mesmo em folículos com a razão E_2/P_4 superior a 1), uma vez que genes particularmente sensíveis a apoptose nas células da granulosa, como o da aromatase e do LHR [48], poderiam ter a sua transcrição terminada antes que mudanças relevantes do estradiol, no fluido folicular, fossem detectadas. Sendo assim, poderia haver redução na expressão gênica do LHR nas células da granulosa antes mesmo que a razão E_2/P_4 fosse negativa.

Apesar das limitações acima descritas, Nogueira et al. [35] e Ereno [28], ao utilizarem a mesma técnica (RT-PCR semi-quantitativo) e o mesmo “primer”, porém com folículos provenientes de abatedouro ou de vacas cujo desenvolvimento folicular foi acompanhado por meio de ultrassonografia, respectivamente, obtiveram o mesmo resultado, ou seja, constataram que a expressão gênica do LHR nas células da granulosa em animais zebuínos ocorreu a partir de folículos com 7,0 mm de diâmetro.

No presente estudo, houve correlação positiva entre o aumento das isoformas M4 (deleção do éxon 10 e parte do éxon 11) e M3 (deleção de parte do éxon 11) e aumento no diâmetro folicular. Até o momento não é totalmente conhecida a função destas isoformas, entretanto os transcritos alternativos com deleção do éxon 11 traduziram um receptor truncado pela introdução de um códon de parada precoce [49,50]. Esse LHR truncado não é transportado até a superfície celular, ficando aprisionado no citoplasma, apesar de conservar sua capacidade de ligação. Nesta condição, o LH não ativa a proteína G, portanto, seria um transcrito afuncional [49]. Entretanto, hipóteses de cooperação de dímeros, trímeros ou oligômeros de receptores, na obtenção de funcionalidade de receptores acoplados a proteína G (mediando o transporte e posicionamento da isoforma incompleta ou o controle da biodisponibilidade do ligante), poderiam incluir uma função para as isoformas truncadas [50-53].

É importante notar que apesar da expressão gênica do LHR nas células da granulosa ter sido relacionada a capacidade ovulatória, não foi determinado no presente estudo a tradução deste mRNA em proteína, ou seja, a quantificação do receptor presente nas células da granulosa. Portanto, novos

estudos são necessários para determinar a correlação entre a capacidade ovulatória e a presença do receptor de LH nas células da granulosa.

Em resumo, observou-se que a dose mínima de LH capaz de induzir ovulação em vacas com folículos de 10 a 11 mm foi 3,12 mg. Embora o diâmetro do menor folículo capaz de ovular após a administração de 6,25 mg de LH foi de 7,65 mm, taxas elevadas de ovulação (90%) foram observadas apenas em folículos com diâmetro superior a 9,0 mm. Houve aumento na expressão gênica da somatória das isoformas do LHR nas células da granulosa de acordo com o aumento no diâmetro folicular, entretanto nas células da teca o perfil de expressão gênica não foi alterado. Foi observada correlação positiva entre o aumento da expressão das isoformas M3 e M4 nas células da granulosa com o aumento no diâmetro folicular. Conclui-se que em fêmeas zebuínas a capacidade ovulatória está relacionada com o aumento do diâmetro folicular e consequente aumento na expressão gênica da somatória das isoformas do LHR nas células da granulosa.

Agradecimentos:

Os autores agradecem a Tecnopec pela doação dos hormônios utilizados nos experimentos 1 e 2, e a FAPESP (São Paulo, Brasil) pelo auxílio financeiro e bolsa para Renato A. L. Simões (Processo nº 07/51 367-0). Agradecem também a Octaviano R. C. Silva e Jaime Trajano, proprietário e gerente respectivamente da fazenda Siriema do Lago, onde foram realizados os experimentos 1 e 2.

5. Referências

- [1] CEPEA. Agribusiness. Piracicaba: CEPEA, 2007: www.cepea.esalq.usp.br
- [2] BRASIL. Livestock Statistics. Brasilia: MAPA, 2005: www.agricultura.gov.br
- [3] ACNB. Brazilian Association of Nelore Breeders, 2006: www.acnb.org.br
- [4] Barros CM, Moreira MB, Figueiredo RA, Teixeira AB, Trinca LA. Synchronization of ovulation in beef cows (*Bos indicus*) using GnRH, PGF2alpha and estradiol benzoate. *Theriogenology* 2000;53: 1121-1134.
- [5] Barros CM, Nogueira MF. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* 2001;56: 1483-1496.
- [6] Mapletoft RJ, Hasler JF. Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Rev Sci Tech* 2005;24: 393-403.
- [7] Baruselli PS, de Sa Filho MF, Martins CM, Nasser LF, Nogueira MF, Barros CM, Bo GA. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* 2006;65: 77-88.
- [8] Bo GA, Baruselli PS, Chesta PM, Martins CM. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology* 2006;65: 89-101.
- [9] Bo GA, Guerrero DC, Adams GP. Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. *Theriogenology* 2008;69: 81-87.
- [10] Pinheiro OL, Barros CM, Figueiredo RA, do Valle ER, Encarnacao RO, Padovani CR. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with

- prostaglandin F2 alpha or norgestomet and estradiol valerate. *Theriogenology* 1998;49: 667-681.
- [11] Pierson RA, Ginther OJ. Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology* 1984;21: 495-504.
- [12] Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2alpha and GnRH. *Theriogenology* 1995;44: 915-923.
- [13] Martinez MF, Kastelic JP, Adams GP, Mapletoft RJ. The use of a progesterone-releasing device (CIDR-B) or melengestrol acetate with GnRH, LH, or estradiol benzoate for fixed-time AI in beef heifers. *J Anim Sci* 2002;80: 1746-1751.
- [14] Bucher A, Kasimanickam R, Hall JB, Dejarnette JM, Whittier WD, Kahn W, Xu Z. Fixed-time AI pregnancy rate following insemination with frozen-thawed or fresh-extended semen in progesterone supplemented CO-Synch protocol in beef cows. *Theriogenology* 2009;71: 1180-1185.
- [15] Larson JE, Thielen KN, Funnell BJ, Stevenson JS, Kesler DJ, Lamb GC. Influence of a controlled internal drug release after fixed-time artificial insemination on pregnancy rates and returns to estrus of nonpregnant cows. *J Anim Sci* 2009;87: 914-921.
- [16] Ayres H, Martins CM, Ferreira RM, Mello JE, Dominguez JH, Souza AH, Valentin R, Santos IC, Baruselli PS. Effect of timing of estradiol benzoate administration upon synchronization of ovulation in suckling Nelore cows (*Bos indicus*) treated with a progesterone-releasing intravaginal device. *Anim Reprod Sci* 2008;109: 77-87.
- [17] Carvalho JB, Carvalho NA, Reis EL, Nichi M, Souza AH, Baruselli PS. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos*

- indicus, Bos indicus x Bos taurus, and Bos taurus heifers. Theriogenology 2008;69: 167-175.
- [18] Fernandes P, Teixeira AB, Crocci AJ, Barros CM. Timed artificial insemination in beef cattle using GnRH agonist, PGF2alpha and estradiol benzoate (EB). Theriogenology 2001;55: 1521-1532.
- [19] Meneghetti M, Filho OG, Peres RF, Lamb GC, Vasconcelos JL. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for Bos indicus cows I: Basis for development of protocols. Theriogenology 2009.
- [20] Pinheiro VG, Souza AF, Pegorer MF, Satrapa RA, Ereno RL, Trinca LA, Barros CM. Effects of temporary calf removal and eCG on pregnancy rates to timed-insemination in progesterone-treated postpartum Nelore cows. Theriogenology 2009;71: 519-524.
- [21] Sa Filho OG, Thatcher WW, Vasconcelos JL. Effect of progesterone and/or estradiol treatments prior to induction of ovulation on subsequent luteal lifespan in anestrous Nelore cows. Anim Reprod Sci 2009;112: 95-106.
- [22] Mapletoft RJ, Steward KB, Adams GP. Recent advances in the superovulation in cattle. Reprod Nutr Dev 2002;42: 601-611.
- [23] Ginther OJ, Kot K, Kulick LJ, Wiltbank MC. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. Theriogenology 1997;48: 75-87.
- [24] Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K. Selection of the dominant follicle in cattle. Biol Reprod 1996;55: 1187-1194.
- [25] Ginther OJ. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. Anim Reprod Sci 2000;60-61: 61-79.

- [26] Ginther OJ, Beg MA, Donadeu FX, Bergfelt DR. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim Reprod Sci* 2003;78: 239-257.
- [27] Castilho C, Garcia JM, Renesto A, Nogueira GP, Brito LF. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Anim Reprod Sci* 2007;98: 189-196.
- [28] Ereno RL. Gene expression of luteinizing hormone receptor (LHR) isoforms in granulosa cells of follicles from Nelore heifers before, during and after follicular deviation. Botucatu: University of Sao Paulo State, 2008;67.
- [29] Gimenes LU, Sa Filho MF, Carvalho NA, Torres-Junior JR, Souza AH, Madureira EH, Trinca LA, Sartorelli ES, Barros CM, Carvalho JB, Mapletoft RJ, Baruselli PS. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology* 2008;69: 852-858.
- [30] Sartorelli ES, Carvalho LM, Bergfelt DR, Ginther OJ, Barros CM. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology* 2005;63: 2382-2394.
- [31] Beg MA, Bergfelt DR, Kot K, Wiltbank MC, Ginther OJ. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biol Reprod* 2001;64: 432-441.
- [32] Bao B, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Salfen BE, Youngquist RS. 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. *Biol Reprod* 1997;56: 1158-1168.

- [33] Fortune JE, Rivera GM, Evans AC, Turzillo AM. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol Reprod* 2001;65: 648-654.
- [34] Garverick HA, Baxter G, Gong J, Armstrong DG, Campbell BK, Gutierrez CG, Webb R. Regulation of expression of ovarian mRNA encoding steroidogenic enzymes and gonadotrophin receptors by FSH and GH in hypogonadotrophic cattle. *Reproduction* 2002;123: 651-661.
- [35] Nogueira MF, Buratini J, Jr., Price CA, Castilho AC, Pinto MG, Barros CM. Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: changes with follicle size and regulation by FSH in vitro. *Mol Reprod Dev* 2007;74: 680-686.
- [36] Xu Z, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Hamilton SA, Youngquist RS. Expression of messenger ribonucleic acid encoding cytochrome P450 side-chain cleavage, cytochrome p450 17 alpha-hydroxylase, and cytochrome P450 aromatase in bovine follicles during the first follicular wave. *Endocrinology* 1995;136: 981-989.
- [37] Sartori R, Fricke PM, Ferreira JC, Ginther OJ, Wiltbank MC. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol Reprod* 2001;65: 1403-1409.
- [38] Lowman BG SN, Somerville SH,. *Condition Scoring of Cattle*, Volume 6. Edinburgh: College of Agriculture, 1976;1-31.
- [39] Grimes RW, Ireland JJ. Relationship of macroscopic appearance of the surface of bovine ovarian follicles concentrations of steroids in follicular fluid, and maturation of oocytes in vitro. *Biol Reprod* 1986;35: 725-732.

- [40] Ireland JL, Good TE, Knight PG, Ireland JJ. Alterations in amounts of different forms of inhibin during follicular atresia. *Biol Reprod* 1994;50: 1265-1276.
- [41] Buratini J, Jr., Teixeira AB, Costa IB, Glapinski VF, Pinto MG, Giometti IC, Barros CM, Cao M, Nicola ES, Price CA. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. *Reproduction* 2005;130: 343-350.
- [42] SAS. Statistical Analysis System., 6.12 edition. Cary, NC, USA: SAS Inst., Inc., 1999.
- [43] SigmaStat. SigmaStat for windows., 3.10.0 edition. Point Richmond, CA, USA: Systat Software Inc., 2004.
- [44] Martinez MF, Adams GP, Bergfelt DR, Kastelic JP, Mapletoft RJ. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. *Anim Reprod Sci* 1999;57: 23-33.
- [45] Evans AC, Fortune JE. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinology* 1997;138: 2963-2971.
- [46] Mihm M, Baker PJ, Ireland JL, Smith GW, Coussens PM, Evans AC, Ireland JJ. Molecular evidence that growth of dominant follicles involves a reduction in follicle-stimulating hormone dependence and an increase in luteinizing hormone dependence in cattle. *Biol Reprod* 2006;74: 1051-1059.

- [47] Bodensteiner KJ, Wiltbank MC, Bergfelt DR, Ginther OJ. Alterations in follicular estradiol and gonadotropin receptors during development of bovine antral follicles. *Theriogenology* 1996;45: 499-512.
- [48] Evans AC, Ireland JL, Winn ME, Lonergan P, Smith GW, Coussens PM, Ireland JJ. Identification of genes involved in apoptosis and dominant follicle development during follicular waves in cattle. *Biol Reprod* 2004;70: 1475-1484.
- [49] Kawate N. Studies on the regulation of expression of luteinizing hormone receptor in the ovary and the mechanism of follicular cyst formation in ruminants. *J Reprod Dev* 2004;50: 1-8.
- [50] Robert C, Gagne D, Lussier JG, Bousquet D, Barnes FL, Sirard MA. Presence of LH receptor mRNA in granulosa cells as a potential marker of oocyte developmental competence and characterization of the bovine splicing isoforms. *Reproduction* 2003;125: 437-446.
- [51] Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3: 639-650.
- [52] Roess DA, Brady CJ, Barisas BG. Biological function of the LH receptor is associated with slow receptor rotational diffusion. *Biochim Biophys Acta* 2000;1464: 242-250.
- [53] Nakamura K, Yamashita S, Omori Y, Minegishi T. A splice variant of the human luteinizing hormone (LH) receptor modulates the expression of wild-type human LH receptor. *Mol Endocrinol* 2004;18: 1461-1470.

ANEXO 1

Número da amostra, grupo experimental, diâmetro folicular (mm), razão E_2/P_4 e expressão gênica das isoformas do LHR (isoformas de mRNA LHR/mRNA GAPDH) nas células da teca (Experimento 3).

Amostra	Grupo	Diâmetro (mm)	E_2/P_4	mRNA LHR/mRNA GAPDH			
				M1	M2	M3	M4
168	1	8,2	19,80	726,65	278,81	557,22	171,19
90	1	8,7	1,69	64,31	29,42	47,26	17,93
214	1	9	11,02	60,00	39,70	99,58	67,86
220	1	8	3,65	24,39	15,18	29,47	12,35
227	1	8	1,61	51,65	68,70	90,70	85,46
228	1	8,5	5,90	65,11	29,85	62,42	32,99
238	1	8,5	2,77	362,01	146,21	520,93	149,82
199	2	9,5	3,51	64,07	39,14	51,04	23,02
203	2	9,5	1,04	339,39	321,76	429,75	299,17
82	2	10	1,23	18,74	15,48	10,99	14,90
160	2	9,5	5,20	55,25	40,49	48,32	23,56
179	2	9,8	6,91	712,36	323,91	508,25	320,86
208	2	10	1,26	99,14	64,74	122,31	32,49
211	2	9,5	1,69	391,72	75,81	336,16	59,93
222	2	10	1,02	55,10	52,39	121,01	34,30
198	3	10,2	2,67	211,01	74,33	270,09	89,09
86	3	11	3,52	32,86	8,45	28,83	21,35
159	3	11	23,81	308,24	230,69	394,50	407,79
205	3	11	1,02	27,99	17,00	35,94	26,48
63	3	10,5	3,76	94,35	40,74	221,12	154,56
143	3	10,5	1,72	324,59	61,10	330,23	212,67
213	3	10,2	1,17	217,08	71,35	175,99	31,28
225	3	11	3,19	30,98	20,50	59,66	41,44

ANEXO 2

Número da amostra, grupo experimental, diâmetro folicular (mm), razão E_2/P_4 e expressão gênica das isoformas do LHR (isoformas de mRNA LHR/mRNA GAPDH) nas células da granulosa (Experimento 3).

Amostra	Grupo	Diâmetro (mm)	E_2/P_4	mRNA LHR/mRNA GAPDH			
				M1	M2	M3	M4
168	1	8,2	19,8	15,34	9,47	7,09	5,79
90	1	8,7	1,69	90,16	37,82	81,00	17,67
214	1	9	11,02	29,85	20,03	27,25	22,88
228	1	8,5	5,9	59,06	15,28	31,13	12,30
238	1	8,5	2,77	5,21	3,19	2,91	0,72
203	2	9,5	1,04	47,93	7,97	41,16	6,66
82	2	10	1,23	22,06	17,48	17,21	10,73
160	2	9,5	5,2	26,08	0,65	57,07	35,66
179	2	9,8	6,91	19,86	12,80	42,39	23,49
86	3	11	3,52	143,34	34,70	122,35	27,08
143	3	10,5	1,72	81,90	56,47	68,04	40,59
213	3	10,2	1,17	62,17	23,71	67,95	19,40
225	3	11	3,19	10,74	10,09	31,38	28,56