

MARCELO FÁBIO GOUVEIA NOGUEIRA

**EXPRESSÃO GÊNICA DO RECEPTOR DO
HORMÔNIO LUTEINIZANTE (LHR), EM CÉLULAS
DA TECA E DA GRANULOSA DE FOLÍCULOS
ANTRAIS BOVINOS**

MARCELO FÁBIO GOUVEIA NOGUEIRA

**EXPRESSÃO GÊNICA DO RECEPTOR DO
HORMÔNIO LUTEINIZANTE (LHR), EM CÉLULAS
DA TECA E DA GRANULOSA DE FOLÍCULOS
ANTRAIS BOVINOS**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia,
Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", Campus de Botucatu,
para obtenção do Título de Doutor em
Medicina Veterinária, Área de
Reprodução Animal.

Orientador: **Prof. Dr. Ciro Moraes Barros**

**Botucatu-SP
2005**

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

Nogueira, Marcelo Fábio Gouveia.

Expressão gênica do Receptor do Hormônio Luteinizante (LHR), em células da teca e da granulosa de folículos antrais bovinos / Marcelo Fábio Gouveia Nogueira. – 2005.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2005.

Orientador: Ciro Moraes Barros

Assunto CAPES: 50403010

1. Bovino - Reprodução

CDD 636.20824

Palavras-chave: Bovino; Expressão gênica; Folículo antral; LHR; Receptor do hormônio luteinizante; RT-PCR

Aos meus pais Antonio Alexandre Gouveia Nogueira e Dalila Lima Nogueira, pelo carinho com a minha formação moral e intelectual, pela introdução à biologia e ao gosto pelos animais. Acima de tudo pelo ilimitado amor, com o qual me criaram.

À minha esposa Cecília Alves Salgado, ao meu filho Tomás Salgado Nogueira e à minha filha Lúcia Salgado Nogueira. Pelo suporte emocional nos piores momentos e pela fonte constante de alegria e prazer que eu obtenho de vocês. Para mim, vocês são a mais completa definição de “sentido da vida”.

Aos meus queridos irmãos Toninho (o homem que fazia luz) e Neto (o construtor de navios) e à minha irmã Cristina (felizes os irmãos que têm “Cristinas”), pelo amor, cumplicidade e união, apesar da distância.

À minha co-família; Arnaldo, Therezinha, Beth, Ângela, Orlando, Zé, Bruno, Guilherme, Marina, Ricardo e Fernando, por me aceitarem de forma plena e altruísta. Nunca poderei expressar o quanto sou grato por ter dois pais, duas mães, três irmãs, quatro irmãos, seis filhos e duas filhas.

Ao Andrey e à Veridiana, meus grandes amigos, parceiros, colegas e irmãos nessa jornada da pós-graduação. Sempre solícitos em ajudar-me – da impressão de documentos ao capuccino – foram um modelo de altruísmo para mim.

Ao meu compadre Rigon, minha comadre Rosinha e minha grande amiga Marlene, grandes companheiros e amigos de conversas e jantares, viagens e músicas, vinhos e fotografias.

Ao meus amigos Profs. Drs. José Antônio Visintin, Joaquim Mansano Garcia e Enoch Borges de Oliveira Filho, pelos primeiros incentivos e colaborações na pesquisa com embriões bovinos e – junto com meus pais - na essência do que é a ciência.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ciro Moraes Barros, pelo apoio incondicional e pela sincera amizade sedimentada nos sete anos de convívio. Não por acaso, escolhi continuar o doutorado sob a sua orientação.

Ao Prof. Dr. José Buratini Júnior, colaborador deste trabalho. Pela acolhida em seu laboratório e disposição em propiciar as condições para a realização do experimento. Pela calorosa recepção em seu lar. Pela liberdade que encontrei para trabalhar e – acima de tudo – pela grande amizade demonstrada.

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração direta ou indireta de muitas pessoas. Manifesto minha gratidão a todas elas e de forma particular:

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ - UNESP - Botucatu, pelo aprendizado constante que recebi durante o Curso de Pós-graduação, pelas conversas e pelo convívio;

Aos professores do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu, pela cordialidade e amizade;

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Rodrigues Ramos do Departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu, pelo apoio e confiança na utilização das instalações do seu laboratório, pela amizade e bom-humor contagiante;

Aos professores do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu, pela amizade e convívio. Em particular ao Prof. Dr. André Sampaio Pupo, pelas informações, discussões e ensinamentos sobre os receptores acoplados à proteína G, assim como pelo estímulo e apoio demonstrados;

Ao Dr. Christopher A. Price da Universidade de Montreal pelo auxílio no delineamento geral do experimento, assim como pelos ensinamentos transmitidos durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa;

Às Prof^{as}. Dr^{as}. Cláudia Aparecida Rainho, do Departamento de Genética, Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu e Maria Christina Werneck de Avellar, do Instituto Nacional de Farmacologia – UNIFESP – São Paulo, pelo apoio nos seqüenciamentos durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa. À Leda Isabel de C. V. Esteves (Depto. de Genética, IB, UNESP, Botucatu), pelo auxílio no tratamento das seqüências obtidas;

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu), Edilson de Souza Freira, Marco Antônio Fumes Pelicci, Maria Cristina P. L. Rosa, José Maria Pimentel e Valter Oswaldo Fabris, pela amizade;

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia (Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu), Luciana Ap. Spadotto Borgatto, Antônio Carlos de Barros Tardivo e Hildebrando Luiz da Silva, pelo apoio e amizade;

Aos funcionários do Departamento de Física e Biofísica (Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu), Sílvia Helena Ramos, Cilene do Carmo F. Padilha, Murilo Stelzer e Rogério de Moraes, pela amizade;

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia (Instituto de Biociências - UNESP – Botucatu), Ana Maria Seraphim, Ana Cristina Murcia de Souza, Paulo Cesar Mioni e Luiz Antônio de Oliveira, pela amizade, apoio, risos e café;

À funcionária da Empresa Lopes & Ribeiro, Janete Camargo Teixeira, pela amizade, carinho, simpatia e cordialidade durante a nossa convivência;

Aos meus amigos Isabela, Inês, Vanessa, Paula, Anthony (Fisiologia), Daniela, Nana, Bira, Rafael, Bruno, Vinícius, Alfredo, Marcelo Pegorer, Marcelo Machado, Ronaldo, Osni, Danilas, Fábio (Farmacologia), José Dell'Aqua, Fabiana, Ellen, Cláudia (Reprodução Animal), Fabíola, Eliane, Renata (Genética), César, Camila (do "campo"), e aos que aqui não foram mencionados, que sabem mais que ninguém o quão difícil é a Pós-Graduação sem o suporte emocional dos amigos;

Em especial, ao grande amigo Maicon Gaissler L. Pinto ("Gaúcho"), pelo meu doutrinamento nos ritos da biologia molecular, pelas conversas animadas – junto com o Andrey - na saída da Faculdade e pela troca de informações musicais;

Aos funcionários Selma Maria de Jesus, Luciana Pizzani, Braz Titon, Luzia de Brito B. Fernandes, Maria Luiza Deléu da Silva, Marluci Betini, Rosangela Aparecida Soares, Rosemary Cristina da Silva, Sulamita Selma Clemente Colnago e a toda equipe da biblioteca, pela amizade, assessoria e correção das referências bibliográficas e pelos serviços prestados;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro (processo 01/08743-5), sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

“...Knowledge is the supreme challenge for the human mind. Whoever has, and cultivates, a particular vocation, will try to gather all possible knowledge about his or her field of interest, above all. Knowledge also is the path to wisdom. So, when the question arises why a country like Brazil, with so many problems, dedicates money, effort and faces unsurmountable difficulties to organize a Symposium on sophisticated techniques of Reproduction, the answer partially lies on this quest for knowledge, inherent to the human gender, and partially on the urgent need for progress in the production of food, abundant and low priced, to an ever growing population. The Green Revolution is exhausted, after two glorious decades; now the Lab Revolution must reach the countries who need it.”

Enoch Borges de Oliveira Filho, Proceedings of the Third Symposium on Advanced Topics in Animal Reproduction (Preface), Jaboticabal, 1990.

“...É melhor ser cabeça de lambari do que rabo de tubarão.”

José Antonio Visintin, dezembro de 2004.

“...Por favor, façam comigo um pequeno jogo. Citem uma única idéia surgida por geração espontânea. A busca está destinada a ser frustrante, porque as idéias humanas são sempre filhas de outras idéias preexistentes. Assim, mesmo se você fosse persistente o bastante para escavar um exemplo excepcional, as chances seriam de que não apresentasse nada além do seguinte, exatamente: a interessante exceção que confirma a regra. A regra, claro, é a de que sempre que surge na mente de alguém um novo pensamento trata-se, necessariamente, de uma forma metamórfica: o resultado de um contínuo reagrupamento e reconfiguração que prosseguem, incessantemente, nas profundezas do nosso subsolo mental, através de sucessivas camadas de sedimento.”

Clara Pinto-Correia, O Ovário de Eva, p.30, Ed. Campus, 1999.

“...Uma contribuição fundamental para a credibilidade do ovo como fonte incontestável de vida veio em 1672, quando Reinier de Graaf (1641-1673) publicou **De mulierum organis generationi inservientibus** (Os órgãos reprodutivos das mulheres), contendo um detalhado estudo do desenvolvimento do coelho. Nessas páginas, o naturalista holandês foi vítima de um equívoco previsível, mas tirou dele o que agora consideramos uma conclusão correta. Supôs que os grandes folículos do ovário que contêm o ovo (agora chamados folículos graafianos), redondos como o ovo - porém muito maiores e, portanto, muito mais fáceis de detectar através das técnicas rudimentares da época - eram os verdadeiros ovos dos mamíferos. Essa descoberta estabeleceu firmemente que os animais vivíparos vêm de ovos. Ele foi o primeiro autor a descrever o **corpus luteum** ("corpo amarelo") do ovário, uma pequena cicatriz deixada no tecido do ovário quando o ovo maduro irrompe de sua superfície. Durante as investigações, enquanto tentava desenvolver melhores instrumentos de exame, acabou inventando também a seringa. Como Harvey, de Graaf não se alinhou com os pré-formacionistas; até declarou que não descobrira qualquer vestígio de um minúsculo embrião dentro dos seus "ovos" e que tais embriões se tornavam visíveis apenas no décimo dia de gestação, cerca de mais ou menos um terço do tempo total do desenvolvimento embrionário do coelho. Mas ele acreditava, de fato, que o ovo contém o germe do futuro organismo, e isto foi, sem dúvida, uma dádiva para a pré-formação.”

“...Assim, foram para a reação todos os ingredientes necessários para amplificar o DNA mitocondrial mais algumas gotas do precioso extrato de osso. Para dar partida à reação no tubo de ensaio é preciso fervê-lo, esfriá-lo, aquecê-lo por alguns minutos; depois fervê-lo de novo, esfriá-lo, aquecê-lo... e continuar repetindo este ciclo pelo menos vinte vezes. Os modernos laboratórios de genética são cheios de máquinas que fazem esta reação automaticamente. Mas não naquela época. Na década de 1980, a única máquina do mercado custava uma fortuna e em nosso orçamento não havia dinheiro para compra-la. A única maneira de fazer a reação era sentar-se com um “timer” em frente de três banhos-maria, um fervendo, um frio e um morno, e passar à mão o tubo de ensaio de um banho para outro a cada três minutos. E fazer de novo. E de novo. Durante três horas e meia. Só tentei uma vez. A reação não funcionou e fiquei louco de tédio. Tinha de haver um jeito melhor. E se usássemos uma chaleira elétrica? Passei as três semanas seguintes com fios, “timers”, termostatos, relés, tubos de cobre, a válvula da uma máquina de lavar e a chaleira da minha casa. No fim, tinha um aparelho que fazia todas as coisas certas. Fervia. Esfriava (bem depressa) quando a válvula da máquina de lavar se abria e deixava passar água da bica pelas espirais de tubo de cobre. E amornava. E funcionava.”

Bryan Sykes, As Sete Filhas de Eva, p.29-30, Ed. Record, 2003.

“...Se a Segunda Lei da Termodinâmica ensina sobre um aumento universal da desordem, por que a evolução da vida – com seu aumento geral da ordem, igualmente impressionante – parece violá-la? Esse paradoxo, enunciado pelo cientista austríaco Erwin Schrödinger em suas palestras de 1943 na Universidade de Cambridge, chamou atenção para a biologia como um problema da física. Deu-se grande importância à inferência de Schrödinger de que uma molécula informativa seria responsável pela hereditariedade. Ele deduziu que a vida funcionava como um cristal aperiódico. Seus escritos inspiraram os cientistas a buscarem a base material da hereditariedade. Dez anos depois do livro de Schrödinger, James D. Watson e Francis Crick anunciaram sua descoberta da dupla estrutura helicoidal do DNA. A identificação da molécula capaz de auto-replicação permitiu a outros mostrarem que o DNA, em combinação com o RNA e as proteínas, norteava a manutenção, o crescimento e a reprodução das células. No entanto, um problema igualmente sério, o da aproximação potencial entre a biologia e a física, continuou sem resposta: como conseguem os organismos resistir à deterioração termodinâmica?”

Lynn Margulis & Dorion Sagan, *O que é Sexo?*, p.27-28, Jorge Zahar Ed., 2002.

“...- É guia? Sabe dizer-me o nome desta região?

- *Não sabe? – indagou o homem.- É o País de Niggle. O Quadro de Niggle, ou a maior parte dele; uma pequena parte é agora a Horta de Parish.*
- *O Quadro de Niggle! – exclamou Parish, cheio de espanto.*
- *Foi **você** que pensou em tudo isto, Niggle? Nunca imaginei que fosse tão inteligente. Por que não me disse?*
- *Ele tentou dizer-lhe há muito tempo – respondeu o homem -, mas você não queria olhar. Nessa altura, ele tinha apenas tela e tinta, e você queria remendar o seu telhado com elas. Isto é aquilo a que você e a sua mulher costumavam chamar o Disparate do Niggle ou Aquela Borratada.*
- *Mas então não parecia isto, não parecia **real** – explicou Parish.*
- *Pois não. Então era apenas um vislumbre – concordou o homem. – Mas você poderia ter captado o vislumbre, se tivesse achado que valia a pena tentar.*
- *Eu não lhe dei muita oportunidade – disse Niggle. – Nunca tentei explicar. Costumava chamar-lhe o Velho Comedor de Terra. Mas que interessa isso? Agora vivemos e trabalhamos juntos. As coisas podiam ter sido diferentes, mas não podiam ter sido melhores. Apesar disso, acho que tenho de ir andando. Espero que voltaremos a encontrar-nos: deve haver muito mais coisas que possamos fazer juntos. Adeus!”*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

Resumo

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1. A estrutura do receptor do LH (LHR)	21
2.2. “Splicing” alternativo do LHR	26
2.3. Participação do LHR no desenvolvimento folicular	29
2.4. Modulação do LHR e suas isoformas	32
2.5. Atividade biológica das isoformas do LHR	37
2.6. LHR em tecidos extragonadais	39
3. MATERIAL E MÉTODO	43
3.1. Obtenção dos folículos antrais	43
3.2. Extração do RNA total	44
3.3. Radioimunoensaio	46
3.4. Classificação folicular	47
3.5. RT-PCR	47
3.5.1. Protocolo DNase I	47
3.5.2. Reação de transcrição reversa (RT)	48
3.5.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	48
3.5.3.1. Investigação da pureza das amostras de células da granulosa e da teca	51

3.5.3.2. Padronização do RT-PCR semiquantitativo para LHRBC	51
3.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida	54
3.7. Seqüenciamento dos fragmentos amplificados por RT-PCR	55
3.8. Caracterização do padrão de expressão das isoformas do LHRBC em células da granulosa cultivadas in vitro	55
3.9. Análise estatística	56
4. RESULTADO	59
4.1. LHRA	59
4.2. LHRBC	60
5. DISCUSSÃO	72
6. CONCLUSÃO	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
Anexos	93
<i>Abstract</i>	95

Esta Tese foi redigida de acordo com as normas para publicações da UNESP:

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. **Normas para publicações da UNESP**. São Paulo: Editora UNESP, 1994. v.3: Preparação e revisão de textos.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. **Normas para publicações da UNESP**. São Paulo: Editora UNESP, 1994. v.4: Dissertações e teses – Do trabalho científico ao livro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Estrutura da proteína do receptor do LH (LHR).	23
Figura 2-	Resposta celular dos receptores de LH “wild-type” e com mutações de inativação e de ativação.	25
Figura 3-	Estrutura do gene codificador do LHR. Transcritos alternativos do LHR, com deleções do exon 10 (total) e do exon 11 (parcial).	28
Figura 4-	Representação esquemática de possíveis mecanismos de controle do LHR em uma célula folicular ovariana.	41
Figura 5-	Estrutura e disposição dos exons no gene codificador do LHR. Os números (1 a 11) indicam os exons.	49
Figura 6-	Validação da técnica semiquantitativa de RT-PCR para o gene do LHR. Controle do número de ciclos de PCR, em amostras de células da teca e da granulosa.	52
Figura 7-	Validação da técnica semiquantitativa de RT-PCR para o gene do LHR. Controle do número de ciclos de PCR, em amostra de células da teca.	52
Figura 8-	Validação da técnica semiquantitativa de RT-PCR para o gene do LHR. Controle da quantidade do RNA total utilizado na reação de RT.	53
Figura 9-	Isoforma alternativa (N2) do fragmento LHRA do cDNA do gene do LHR bovino.	59
Figura 10-	Isoformas alternativas (M2, M3 e M4) do fragmento LHRBC do cDNA do gene do LHR bovino.	60
Figura 11-	Imagem ilustrativa dos géis de poliacrilamida coradas com brometo de etídeo, contendo o produto das amplificações para os genes LHR e GAPDH (amostras de células da teca e da granulosa).	61

Figura 12-	Porcentagem de amostras de células da granulosa, de acordo com o diâmetro folicular, em que foi detectada a expressão do fragmento LHRBC.	62
Figura 13-	Expressão do LHRBC, em células da teca e da granulosa, de acordo com as classes de estradiol (<5, 5-20, >20-100 e >100 ng/mL de FF) e diâmetro folicular (5-7, 8-10 e 11-14mm).	63
Figura 14-	Expressão do LHRBC, em células da teca e da granulosa, em função do diâmetro folicular (análise de co-variância).	66
Figura 15-	Expressão do LHRBC após 38 ciclos de PCR, nas amostras de células (teca e granulosa) negativas para a detecção do LHRBC com as condições validadas (29 ciclos).	67
Figura 16-	Gráficos representando as análises de Regressão Linear, para a expressão das isoformas do LHRBC nas células da granulosa.	68
Figura 17-	Gráfico da expressão das isoformas do LHRBC, em células da granulosa cultivadas com FSH.	70

ABREVIATURAS

µg	- micrograma
µL	- microlitro
µm	- micrômetro
A	- “antisense”
b	- espécie bovina (p.ex., bLH)
cAMP	- monofosfato de adenosina cíclico
cDNA	- ácido desoxirribonucleico complementar
CG	- célula da granulosa
COC	- complexo cumulus-oócito
CT	- célula da teca
CYP17	- 17 α -Hidroxilase
CYP19	- citocromo P450 aromatase
DEPC	- dietilpirocarbonato
DNA	- ácido desoxirribonucleico
DNase	- enzima que degrada o ácido desoxirribonucleico
e	- espécie eqüina (p.ex., eCG ou eLH)
E2	- estradiol
EDTA	- ácido etilenodiaminotetracético
FF	- fluido folicular
FSH	- hormônio folículo estimulante
FSHR	- receptor do hormônio folículo estimulante
g	- força G
GAPDH	- gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GnRH	- hormônio liberador das gonadotrofinas
h	- espécie humana (p.ex., hCG, hLH ou hLHR)
IGF	- fator de crescimento semelhante à insulina
IGFBP	- proteína específica de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina
Km	- quilômetro
LH	- hormônio luteinizante
LHR	- receptor do hormônio luteinizante
LRBP	- proteína específica de ligação ao receptor do LH
M	- molar

mg	- miligrama
MgCl₂	- cloreto de magnésio
mL	- mililitro
mM	- milimolar
mm	- milímetro
ng	- nanograma
nm	- nanômetro
Neg	- negativo
OGP	- glicoproteína do oviduto
°C	- grau Celsius
pb	- pares de base
P4	- progesterona
PBS	- tampão de fosfato e salina
PCR	- reação em cadeia da polimerase
pg	- picograma
pH	- potencial hidrogeniônico
Pos	- positivo
r	- espécie <i>Rattus norvegicus</i> (p.ex., rLH ou rLHR)
RNA	- ácido ribonucléico
mRNA	- ácido ribonucléico mensageiro
RNAse	- enzima que degrada o ácido ribonucléico
RT	- reação de transcrição reversa
RT-PCR	- reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
S	- “sense”
TBE	- Tris, Ácido bórico e EDTA
TZP	- projeções transzonais
U	- unidades
UAD	- unidade arbitrária de densitometria
UV	- ultravioleta
V	- volts
ZP	- zona pelúcida

NOGUEIRA, M.F.G. **Expressão gênica do receptor do hormônio luteinizante (LHR), em células da teca e da granulosa de folículos antrais bovinos**. Botucatu, 2005. 96p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

Em células da teca e da granulosa, de folículos bovinos, foram detectados quatro transcritos alternativos do receptor do hormônio luteinizante (LHR). Apenas dois deles são traduzidos em proteínas funcionais com afinidades distintas em relação aos ligantes. Em humanos e símios, a isoforma completa (“full-length”) tem afinidade pelo LH e hCG, enquanto que a isoforma que apresenta deleção do exon 10 tem afinidade somente pelo hCG. Além disso, isoformas com deleção do exon 3 foram observadas em ratos, embora nenhum outro estudo tenha investigado essa região do gene bovino. Objetivou-se com este trabalho caracterizar o padrão da expressão do gene do LHR nas células da teca e da granulosa de folículos antrais bovinos. Ovários foram coletados em matadouro, os folículos (5-14 mm) foram dissecados e as células da teca e da granulosa separadas para extração de RNA total com Trizol. As concentrações de esteróides no fluido folicular foram determinadas por radioimunoensaio (RIE). A expressão gênica do LHR foi mensurada por RT-PCR semiquantitativo com oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) específicos para amplificar o fragmento entre o final da região extracelular e o final da intracelular (LHRBC; “primers” posicionados nos exons 9 e 11). A ocorrência de transcritos alternativos oriundos do início da região extracelular (LHRA; “primers” posicionados nos exons 2 e 9) foi investigada mediante amplificação por RT-PCR. Como controle interno no PCR, utilizou-se a expressão da GAPDH. Paralelamente, células da granulosa cultivadas *in vitro* foram tratadas com 1 ou 10 ng de FSH no meio de cultura. Mediante RT-PCR, foi investigada a expressão das isoformas do LHRBC nas células da granulosa cultivadas e tratadas com FSH. Como controle *in vitro*, foi investigada a expressão do LHRBC em células da granulosa em cultura sem o tratamento com o FSH e, como controle positivo, em células da teca oriundas de ovário de matadouro

(controle in vivo). Após o seqüenciamento dos fragmentos amplificados, foi detectado um transcrito alternativo com a deleção do exon 3 nos amplicons resultantes da amplificação do segmento LHRA. Nos amplicons do fragmento LHRBC, foram detectadas quatro isoformas; M1 (completa), M2 (deleção do exon 10), M3 (deleção de parte do exon 11) e M4 (deleção conjunta do exon 10 e parte do exon 11). Não foi observada correlação entre a expressão das quatro isoformas do LHRBC nas células da teca e a concentração de estradiol e progesterona ou diâmetro folicular. Porém, nas células da granulosa houve correlação positiva entre a expressão das isoformas do LHR e a concentração de progesterona, assim como o diâmetro folicular ($P < 0,05$). A expressão das isoformas do fragmento LHRBC foi observada em células da granulosa de folículos com diâmetros a partir de 7 mm. Apenas um folículo de 7 mm dentre 6 analisados (16,7%), apresentou expressão do LHR em células da granulosa, enquanto que a maioria das amostras de células da granulosa de folículos ≥ 8 mm apresentaram expressão do LHR (87,5%; 21/24). Não foram observadas quaisquer isoformas do LHR para as amostras de células da granulosa oriundas de folículos com 5 e 6 mm de diâmetro ($n=7$). O tratamento com FSH (1 ou 10 ng) induziu a expressão do LHRBC em células da granulosa não luteinizadas (cultura in vitro). Nestas células, a expressão do LHRBC - modulada pelo FSH – foi diferente do padrão de expressão observado in vivo em células da granulosa (razão entre isoforma M1 e M2; $P < 0,05$). Concluiu-se que, em células da granulosa de folículos com diâmetro ≥ 7 mm, a expressão gênica do LHR aumentou com o diâmetro folicular e a concentração de progesterona no fluido folicular. Foram detectados sítios de “splicing” alternativo nos exons 3, 10 e 11 do gene do LHR bovino. O tratamento com FSH, em células da granulosa de cultura, induziu uma expressão do LHRBC diferente daquela observada in vivo. Especula-se que o início da expressão do LHRBC em células da granulosa a partir de 7 mm de diâmetro, possa coincidir de forma temporal com a aquisição da dominância pelo folículo.

Palavras-chave: Bovinos; Expressão gênica; Receptor do hormônio luteinizante; LHR; Folículo antral; RT-PCR.

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Durante o ciclo estral bovino e subsequente ao início de uma onda folicular, o crescimento do folículo dominante (na ausência de FSH circulante), e os eventos subsequentes ao pico pré-ovulatório de LH (que culminam na ovulação), dependem da interação entre o LH e seu receptor (LHR). Desse modo, o conhecimento da expressão gênica do LHR é essencial no estudo da foliculogênese entre as fases de aquisição da dominância folicular e capacidade ovulatória (Beg et al., 2001; Ginther et al., 2001; Sartori et al., 2001).

O LHR é da família dos receptores acoplados à proteína G, assim como os receptores do FSH e do TSH. O receptor do LH possui uma grande região extracelular (366 amino ácidos codificados pelos primeiros 10 exons do gene), uma região transmembrânica típica dessa família de receptores (composta por sete segmentos transmembrânicos) e uma curta região intracelular constituída por 72 amino ácidos (onde a proteína G se acopla no domínio carboxil-terminal). As duas últimas regiões são ambas codificadas pelo longo exon 11 (Huhtaniemi, 2000; Pierce et al., 2002).

Na montagem do RNA mensageiro (mRNA) do LHR, ocorrem diversos “splicing” alternativos, ou seja, diferentes seqüências de mRNA oriundas da transcrição de um mesmo gene. Esse mecanismo ocorre pela deleção de alguns exons da forma completa do RNA transcrito primariamente (pré-RNA; Lewin, 2004).

Quatro transcritos alternativos do LHR foram observados em células da teca e da granulosa de folículos bovinos (Robert et al., 2003; Kawate, 2004). Transcritos alternativos do LHR também foram relatados em tecidos ovarianos eqüinos e ovinos, assim como em humanos e símios (Saint-Dizier et al., 2004a; Bacich et al., 1999; Reinholz et al., 2000; Gromoll et al., 2003; respectivamente).

Foi sugerida – em ovinos – a modulação do “splicing” alternativo do LHR de acordo com a condição fisiológica e a estação do ano (Abdennebi et al., 2002). No entanto, durante o ciclo estral ovino, não foi observada a modulação dos transcritos alternativos do LHR (Bacich et al., 1999).

Alguns desses transcritos alternativos poderiam ser traduzidos em proteínas funcionais com afinidades distintas em relação aos ligantes. Em humanos e símios, a isoforma completa (“full-length”) tem afinidade pelo LH e hCG, enquanto que a isoforma que apresenta deleção do exon 10 tem afinidade somente pelo hCG (Gromoll et al., 2000; 2003). Além disso, isoformas com deleção do exon 3 foram observadas em ratos, embora nenhum outro estudo tenha investigado essa região do gene bovino (Aatsinki et al., 1992).

Embora vários trabalhos tenham estudado a expressão do LHR em células foliculares bovinas, não há consenso da região do mRNA do LHR que foi investigada. De fato, na maioria dos trabalhos optou-se por uma região do mRNA em que não ocorre o “splicing” alternativo do LHR e, portanto, a informação obtida pode não representar fielmente o que ocorre de forma geral com o mRNA do LHR bovino.

Cada transcrito alternativo do LHR pode possuir propriedades distintas de tráfico e localização celular, assim como de ligação e ativação frente à molécula alvo (LH ou hCG). Assim, um estudo que investigasse a maior extensão possível do mRNA do LHR bovino, isto é, do início da região extracelular até o término da intracelular, poderia caracterizar detalhadamente os diversos transcritos alternativos frente a variáveis fisiológicas como o diâmetro folicular e a concentração intrafolicular de hormônios esteróides.

Tendo em vista a grande variedade de isoformas expressas pelo gene do LHR, em mamíferos, a importância dessas isoformas quanto à capacidade de ligação com a molécula do LH/hCG no desencadeamento da resposta biológica na célula-alvo, e a importância do LHR no crescimento final do folículo ovariano bovino objetivou-se, com este trabalho, a caracterização da expressão gênica do LHR, em células da teca e da granulosa provenientes de folículos antrais bovinos. Além disso, foi investigada a possível correlação entre a expressão de isoformas do LHR e o diâmetro folicular e concentrações de estradiol e progesterona.

Secundariamente, foi investigado o efeito do tratamento com FSH na expressão do LHR, em células da granulosa bovina cultivadas *in vitro*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Nesta revisão sobre o LHR serão abordados os aspectos estruturais (protéico e do mRNA; sub-item 2.1.); os mecanismos de ativação do receptor e as subseqüentes cascatas de sinalização desencadeadas (sub-item 2.1.); a relação entre os ligantes e a composição da região extracelular do LHR (sub-item 2.1.); a ocorrência do “splicing” alternativo desse gene em diversas espécies de mamíferos (sub-item 2.2.); a participação do LHR no desenvolvimento folicular e na ovulação (sub-item 2.3.); a modulação dos transcritos alternativos do LHR em decorrência de condições fisiológicas específicas (sub-item 2.4.); a atividade biológica das isoformas do LHR em diferentes espécies de mamíferos (sub-item 2.5.); e a presença e função do LHR em tecidos extragonadaís (sub-item 2.6.).

2.1. A estrutura do receptor do LH (LHR)

O desenvolvimento dos folículos ovarianos na espécie bovina, do aparecimento do antro folicular até a completa aquisição da capacidade ovulatória, é essencialmente modulado pela ação das gonadotrofinas (Mihm & Bleach, 2003). Na célula alvo, a resposta aos estímulos das gonadotrofinas é mediada pela ligação do hormônio (FSH e LH) ao receptor (FSHR e LHR).

O receptor do LH (LHR) é membro de um subgrupo, juntamente com os receptores do FSH e do TSH, da superfamília dos receptores acoplados à proteína ligada ao nucleotídeo guanina (G). Este subgrupo consiste em um longo domínio extracelular (codificado pelos primeiros nove ou dez exons do

gene), sete hélices transmembrânicas (a estrutura padrão nesta superfamília de receptores) e um curto domínio intracelular carboxil-terminal (Pierce et al., 2002; vide Figura 1).

Na região extracelular, uma sequência de aminoácidos próxima à primeira das hélices transmembrânicas (codificada pelo exon 10 do gene), parece ser essencial à ativação do LHR pelo LH, mas não à ligação (Alvarez et al., 1999). Por outro lado, transcritos alternativos de LHR que não contém o exon 10 são traduzidos em receptores com a capacidade de serem ativados pelo hCG, mas não pelo LH (Gromoll et al., 2003; Müller et al., 2003).

Quando os transcritos alternativos perdem parte do exon 11 (que codifica as regiões transmembrânicas e intracelular), ocorre a síntese de um receptor truncado pela introdução de um códon de parada precoce (Robert et al., 2003; Kawate, 2004). Esse LHR truncado não seria transportado até a superfície celular, ficando aprisionado no citosol (Kawate et al., 2002; Kawate, 2004). Dessa forma, apesar de conservar a capacidade de ligação, essa isoforma truncada não estaria corretamente posicionada na membrana citoplasmática, além de não ser capaz da ativação da proteína G (Kawate et al., 2002; Kawate, 2004).

A região extracelular do LHR possui diferentes afinidades com os ligantes (hCG e LH), dependendo da sua origem. Assim, foram observadas distintas afinidades de ligação entre o hCG e o LH - de origem bovina (bLH) ou humana (hLH) - com os receptores de LH humano e de rato (Bernard et al., 1998; Galet & Ascoli, 2005). Nesses estudos, as diferenças de ligação

observadas foram relacionadas aos resíduos de aminoácidos, no domínio extracelular do LHR, que diferem entre as espécies estudadas.

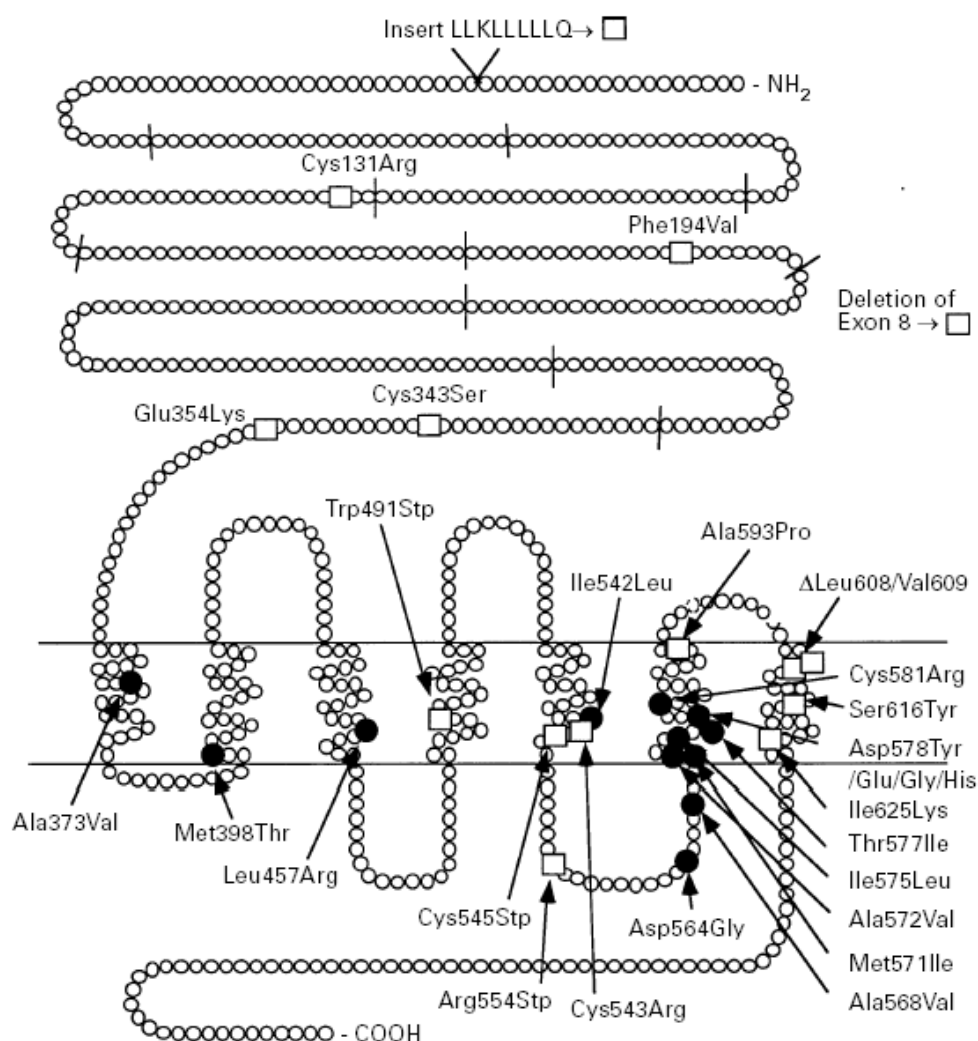


Fig. 1. Estrutura esquemática da proteína do LHR e a localização de mutações de inativação (□) e de ativação (●) atualmente conhecidas no LHR humano. As linhas curtas através da cadeia de aminoácidos, separam os 11 exons (Huhtaniemi, 2000).

A proteína G trimérica está acoplada à região intracelular do LHR (região C terminal), sendo ativada quando ocorre uma alteração

conformacional do receptor após a ligação (Lewin, 2004). A ativação do LHR desencadeia diferentes vias de resposta celular (adenil ciclase e fosfolipase C). Desse modo, foi proposta a participação de diferentes proteínas G na ativação do LHR, sendo a G_i ou G_q , ou ambas, na via da ativação da fosfolipase C, e a G_s na ativação da adenil ciclase (Herrlich et al., 1996; Shemesh, 2001).

Além de diferentes proteínas G, a via de ativação da adenil ciclase pode acrescentar uma complexidade maior à este sistema. Em cultivo de células da granulosa humana, foram detectadas 5 isoenzimas (I, III, VI, VII e IX) das 9 formas conhecidas (Asbóth et al., 2001). Os resultados desse trabalho indicaram que a isoenzima funcional dominante, nesse tipo celular, é a adenil ciclase VII.

De forma adicional, a complexidade das vias de ativação da proteína G acoplada ao LHR pode se estender à proteína kinase C. Embora seja sugerido que o LHR ative ambas proteínas kinases (PKA e PKC), foi demonstrado que, em cultivo de células da granulosa oriundas de folículos pré-ovulatórios, a ativação do LHR - mediante hCG – induziu a resposta celular (fosforilação/ativação da p42/44 MAPK) predominantemente mediada pela proteína kinase A e independente da PKC (Salvador et al., 2002).

O LHR também pode apresentar mutações ativas ou inativas (Huhtaniemi, 2000). Nas mutações ativas, mesmo na ausência de LH circulante ocorre a ativação crônica do receptor. Na inativa, mesmo quando o ligante está disponível (LH ou hCG), não ocorre ativação do LHR (Figura 2).

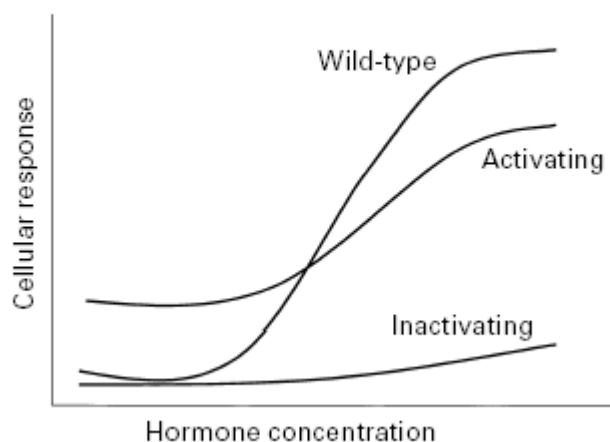


Fig. 2. Apresentação esquemática da resposta estimulada pelo hormônio (p.ex.: produção de cAMP) em células transfectadas com cDNA codificando o receptor tipo-selvagem (wild-type) e receptores carregando mutações de ativação (activating) e inativação (inactivating). A resposta aumentada na ausência de estimulação hormonal é típica de uma mutação de ativação. Na mutação de inativação, a resposta é totalmente, ou quase totalmente, perdida (Huhtaniemi, 2000).

A mutação ativa do LHR é a causa de uma síndrome em seres humanos, denominada puberdade precoce familiar limitada ao sexo masculino (ou testotoxicose). Essa mutação é causada, principalmente, por alterações localizadas na terceira alça intracelular, ou no sexto segmento transmembrânico do LHR, resultando na ativação constitutiva do receptor (Laue et al., 1995; Zhang et al., 1998). Na mutação inativa em humanos, uma das causas seria a ausência do exon 10 no gene do LHR, causando hipogonadismo masculino (Gromoll et al., 2000). Neste tipo de mutação do LHR, apesar da concentração normal do LH circulante, o receptor não é ativado pelo ligante. Por outro lado, o tratamento com o hCG é eficaz em restaurar os caracteres sexuais secundários do paciente com a síndrome, demonstrando o papel do exon 10 na discriminação entre as ações do LH e hCG (Gromoll et al., 2000).

2.2. “Splicing” alternativo do LHR

A montagem (“splicing”) do transcrito primário de um gene interrompido (pré-mRNA), com a remoção do material genético que não codifica aminoácidos presentes na proteína madura (introns) e o alinhamento – de forma contígua – das regiões codificadoras (exons), é necessária para a formação do mRNA. Quando, a partir de um mesmo gene transcrito, mais de uma seqüência de mRNA é produzida, diz-se que houve um “splicing” alternativo desse gene, isto é, a transcrição gênica produziu o mRNA contendo todos os exons do gene (forma completa ou “full-length”) e algumas formas de mRNA com deleções totais ou parciais de um ou mais exons (Lewin, 2004).

Ainda não é completamente conhecida a razão para que alguns genes sejam mais intensamente transcritos sob o evento do “splicing” alternativo que outros genes (Lareau et al., 2004). Porém, por ser esse evento típico de organismos mais complexos (p.ex.; mamíferos), supõem-se que seja, em parte, uma forma de manter o tamanho do genoma em níveis adequados, isto é, um único gene poderia codificar mais de uma proteína. Por outro lado, formas alternativas poderiam estar modulando – no que concerne à “down-regulation”, ao transporte intracelular, à funcionalidade ou à mobilidade da proteína na superfície celular (Licht et al., 2003; Pierce et al., 2002; Nakamura et al., 2004; Roess et al., 2000a) - a forma completa do mRNA (“full-length”).

Além disso, a próprio “splicing” alternativo poderia ser um mecanismo de autocontrole da expressão gênica (Lareau et al., 2004) ou de regulação direta

no DNA, em outros RNAs ou mesmo em proteínas, mediante a formação de microRNAs a partir do RNA intrônico não-codificante (Mattick, 2004).

Os genes dos receptores do FSH e do LH são transcritos sob um complexo sistema de “splicing” alternativo, ainda não totalmente compreendido (Aatsinki et al., 1992; O’Shaughnessy et al., 1997; Bacich et al., 1999; Abdennebi et al., 2002; Patsoula et al., 2003; Robert et al., 2003; Saint-Dizier et al., 2004a).

Em ovários de camundongos neonatos, foi postulado que transcritos alternativos do LHR seriam expressados de forma a anteceder a expressão da forma “full-length” (O’Shaughnessy et al., 1997). Dessa forma, em alguns trabalhos contraditórios sobre a expressão do LHR em oócitos e embriões em estágios pré-implantação, a diferença nos resultados obtidos poderia ser pela região do gene escolhida para a detecção. Assim, embora o mRNA do LHR tenha sido detectado em oócitos e embriões humanos (Patsoula et al., 2003), bovinos (Mishra et al., 2003) e murinos (Patsoula et al., 2001), não foi observada a expressão do LHR em oócitos bovinos (Nuttinck et al., 2004).

Da mesma forma, diferenças na região estudada do LHR poderiam contribuir para os resultados contraditórios descritos em alguns trabalhos (Fortune et al., 2001; Ginther et al., 2003; Robert et al., 2003).

Robert et al. (2003), demonstraram a presença de 8 diferentes transcritos do LHR em células da granulosa bovina. Além de 4 isoformas descritas previamente (Bacich et al., 1999; Abdennebi et al., 2002; Kawate, 2004; vide Figura 3) - ou seja, a forma “full-length”, e isoformas com deleções

do exon 10 e/ou parte do exon 11 - quatro novas isoformas foram descritas com a inserção de seqüências não pertinentes ao gene do LHR bovino.

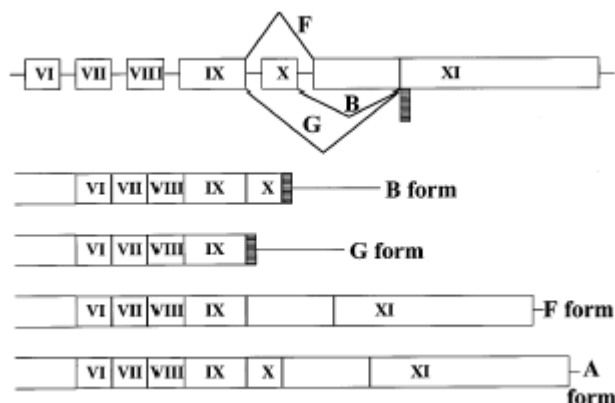


Fig. 3. A estrutura intrônica e exônica e os eventos de “splicing” do gene do LHR (Bacich et al., 1999). A forma completa (A form), assim como a forma com a deleção do exon X (F form) podem sintetizar um receptor completo (regiões extra e intracelular, e transmembrânica). As formas com deleção parcial do exon XI (B e G form), produzem uma mudança na leitura do mRNA, levando à síntese de receptores truncados.

A montagem alternativa dos transcritos de LHR também foi descrita detalhadamente em ovários ovinos durante o ciclo estral (Bacich et al., 1999), no corpo lúteo e gônadas fetais eqüinas (Saint-Dizier et al., 2004a), no corpo lúteo bovino (Mamluk et al., 1998) e no ovário de ratas (Aatsinki et al., 1992).

Neste último trabalho, foi demonstrada a ocorrência de um complexo “splicing” alternativo a partir do transcrito primário do LHR. Foram detectados 4 transcritos alternativos à forma “full-length”; a) com a deleção parcial do exon 9; b) deleções dos exons 3 e 4; c) deleção parcial do exon 11; d) deleção parcial do exon 11 e total do exon 5 (Aatsinki et al., 1992). Alguns desses transcritos alternativos nunca foram previamente descritos em bovinos

ou ovinos, como aqueles contendo deleções dos exons 3, 4, 5 ou 9 (Bacich et al., 1999; Abdennebi et al., 2002; Robert et al., 2003; Kawate, 2004).

2.3. Participação do LHR no desenvolvimento folicular

As células do folículo ovariano possuem mRNA para 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 (Bao & Garverick, 1998; Braw-Tal & Roth, 2005), ou apenas a partir da divergência ou seleção folicular até a fase pré-ovulatória nas células da granulosa (Xu et al., 1995; Bao & Garverick, 1998). Essa distinção entre os dois tipos celulares tem implicações, provavelmente, na hipótese para o mecanismo da única ovulação que ocorre predominantemente em bovinos (Xu et al., 1995; Bodensteiner et al., 1996; Beg et al., 2001; Fortune et al., 2001; Ginther et al., 2003).

Entretanto, enquanto alguns autores sugerem ser o início da expressão do LHR, nas células da granulosa, a causa para a aquisição da dominância folicular (Ginther et al., 2003), outros sugerem ser um evento decorrente da dominância já instalada (Austin et al., 2001; Fortune et al., 2001).

Fortune et al. (2001) não detectaram a expressão do LHR, no futuro folículo dominante, imediatamente antes da seleção folicular. Porém, a primeira diferença observada, entre os futuros folículos dominante e subordinado, foi a indução – mediada pelo FSH - da protease da IGFBP-4 (Fortune et al., 2001). Nessa seleção funcional do folículo, ocorreria a diminuição da concentração da IGFBP-4 e, posteriormente, das IGFBP-2 e –

5. Subseqüentemente, haveria um aumento do IGF livre (biodisponível) que, em sinergismo com o FSH, induziria ao aumento da síntese de estradiol e da taxa de crescimento folicular (seleção morfológica).

De forma semelhante, foi proposto que as primeiras mudanças intrafoliculares que distinguem o folículo, destinado a tornar-se dominante, dos outros folículos da população em crescimento, seria a capacidade aumentada em produzir estradiol e a manutenção de baixos níveis de IGFBPs (Austin et al., 2001).

O início da expressão do LHR pode preceder a funcionalidade do receptor na célula-alvo (Beg et al., 2001; Ginther et al., 2003). Nestes estudos, os autores demonstraram a expressão do LHR em células da granulosa, de folículos bovinos, antecedendo em 8 horas (ou 0,5 mm de diâmetro folicular), em média, a divergência morfológica folicular.

Entretanto, o início da expressão do LHR nas células da granulosa de folículos bovinos com 8 a 8,4 mm de diâmetro (pré-divergência; Ginther et al., 2003), não impede o folículo de crescer até o diâmetro de 9 mm (pós-divergência), na ausência do LH pulsátil (Ginther et al., 2001). Com isso, parece ocorrer uma dissociação entre a expressão do LHR e a sua plena funcionalidade. Fato semelhante foi demonstrado por O'Shaughnessy et al. (1997), no ovário de camundongos neonatos. Neste estudo, a expressão de transcritos alternativos do LHR precedeu a expressão da forma completa e funcional do receptor ("full-length").

Por outro lado, a quantidade e a afinidade dos receptores de LH presentes em cada fase do desenvolvimento final do folículo, está diretamente

relacionada à magnitude da resposta celular frente ao estímulo hormonal do pico pré-ovulatório do LH (Sartori et al., 2001). Neste estudo em bovinos, a capacidade ovulatória só foi plenamente instaurada em folículos a partir de 10 mm de diâmetro. Apesar da administração de doses farmacológicas de LH, não foram observadas ovulações em folículos menores de 10mm, apesar destes possuírem LHR em ambos os tipos celulares (teca e granulosa).

Neste sentido Herrlich et al. (1996), propuseram a ativação, pelo LHR, de duas cascatas de sinalização (proteínas G_s e G_i) onde a adenilciclase e a fosfolipase C seriam, respectivamente, ativadas. Os autores aventam que, no momento da ovulação, a concentração de LH e os níveis de LHR poderiam estar suficientemente altos para efetivamente estimular a adenilciclase e a fosfolipase C. Em células da granulosa de rato, em cultura, o pico de LH parece ativar ambas as cascatas de sinalização das proteínas kinases A e C (Richards, 1994 apud Herrlich et al., 1996). As duas cascatas parecem ser um pré-requisito na indução de genes específicos intimamente envolvidos no processo de ovulação (p.ex., COX-2).

Bao & Garverick (1998) sugeriram que a expressão do LHR aumenta com o progressivo desenvolvimento folicular, atingindo o máximo quando o folículo dominante está próximo do seu maior diâmetro.

A expressão do LHR, em folículos bovinos, também pode ser modulada pelo tipo de gonadotrofina utilizada na superovulação dos animais. Foi observado que a utilização do eCG, na superestimulação ovariana de novilhas, resultou em níveis foliculares menores de mRNA do LHR, quando

comparado à utilização do FSH, porém não afetou os níveis de mRNA do LHR luteal (Soumano et al., 1998).

A modulação da expressão do LHR – em células da granulosa e da teca - por citocina (interleucina-6), fator de crescimento (IGF-I) e hormônio gonadotrófico (FSH) também foi demonstrado em ratas (Tamura et al., 2001; Magoffin & Weitsman, 1994; Shi & Segaloff, 1995; respectivamente).

2.4. Modulação do LHR e suas isoformas

Existem evidências de um controle diferenciado da expressão das isoformas do receptor do LH (LHR), em células-alvo presentes no ovário de mamíferos (Menon et al., 2004).

Em ovinos, essa modulação da expressão do LHR envolve uma ligação direta com a condição fisiológica da atividade ovariana durante a época do ano, indicando que o estudo dos transcritos alternativos do LHR poderia ser relacionado – ao menos parcialmente - à fisiologia reprodutiva das fêmeas estudadas (Abdennebi et al., 2002). Em células da teca de folículos antrais ovinos, Abdennebi et al. (2002) relataram a predominância na expressão do transcrito completo (“full-length”) do LHR, durante a estação reprodutiva ou ovulatória. Entretanto, durante a estação de anestro – ou anovulatória – o transcrito do LHR predominantemente expresso foi aquele com a deleção total do exon 10 e parcial do exon 11. Os autores sugerem ser essa modulação da expressão do LHR, nas células da teca, uma das causas do anestro em ovinos durante o inverno.

Porém, ao contrário das diferenças observadas em diferentes estações do ano, durante o ciclo estral ovino não foi observada a modulação dos transcritos do LHR (Bacich et al., 1999). Nesse estudo, os autores detectaram - na expressão do LHR em folículos e corpos lúteos – uma predominância do transcrito com a deleção parcial do exon 11. Além disso, foi demonstrada a tradução *in vivo* desse transcrito, mediante a detecção da proteína correspondente ao mRNA (Bacich et al., 1999). Os autores sugerem que tal abundância do transcrito alternativo do LHR, concomitante à tradução pelas células, deveria representar uma parte no mecanismo pelo qual o LH regula a função ovariana.

Em bovinos (Manikkam et al., 2001), não houve diferença na expressão do LHR, nas células da teca e da granulosa, entre a primeira e a segunda onda de crescimento folicular. Nos folículos da segunda onda de crescimento, o tratamento com LH pulsátil não modificou a expressão do LHR, quando comparada com a infusão de salina.

Evans et al. (2004) identificaram na expressão do gene do LHR, em células da granulosa de folículos bovinos, um marcador altamente correlacionado com a dominância folicular. Nesse estudo comparativo, os genes da aromatase e do LHR foram positivamente expressos em folículos dominantes, quando comparados aos seus subordinados. O fato dos autores não detectarem diferenças na expressão do FSHR, nas células da granulosa, e do LHR, nas células da teca, entre os folículos dominante e subordinado, suporta a hipótese do crescimento do folículo dominante mediante a utilização do LH circulante (Ginther et al., 2001).

Berisha et al. (2000) encontraram diferenças na expressão do LHR, em células da granulosa bovina, entre folículos com a concentração menor ou maior que 20 ng/mL de estradiol intrafolicular. Novamente, houve uma relação positiva entre o estradiol e o LHR nas células da granulosa, semelhante ao observado na abundância de transcritos dos genes da aromatase e do LHR (Evans et al., 2004).

De forma similar à relação descrita entre a expressão do LHR e a vitalidade da célula da granulosa no folículo dominante (Evans et al., 2004), a diminuição da expressão do LHR - no corpo lúteo bovino - foi relacionada à luteólise funcional em apenas 4 horas após a administração da PGF2 α (Tsai et al., 2001).

Por outro lado, somente a expressão das isoformas de LHR, nas células da granulosa bovina, não foi suficiente para predizer a competência do oócito em atingir a fase de blastocisto (Robert et al., 2003). Porém, naqueles folículos em que a expressão do LHR foi detectada nas células da granulosa, houve uma maior proporção de oócitos que atingiu a fase de blastocisto.

Trabalhos semelhantes, em bovinos, demonstraram a relação entre a qualidade do complexo cumulus-oócito (COC) - e da competência do oócito incluso – e a expressão do LHR nas células do *cumulus oophorus* (Calder et al., 2003; Calder et al., 2005). Os autores postularam que, os transcritos do LHR poderiam ser parte de genes marcadores para a maturação oocitária in vitro.

A expressão do LHR também pode ser modulada diferencialmente em alguns tecidos. No útero bovino, a expressão máxima do LHR ocorre durante

a fase de pró-estro/estro, na veia uterina, ou durante a fase luteal no miométrio, endométrio e cérvix (Shemesh, 2001). O tipo de tecido pode modular, inclusive, o produto final da ativação do LHR. Embora, no útero bovino, a ativação do LHR induza a síntese de COX-2 no endométrio e miométrio, o principal produto dessa enzima é PGF, no endométrio, e PGE no miométrio (Shemesh, 2001).

Foi sugerida a associação entre a migração aberrante e a perda de isoformas, do mRNA do LHR, e a ocorrência de tumores da célula da granulosa em humanos (Reinholz et al., 2000). Os autores ressaltam a importância de uma melhor compreensão do papel do “splicing” alternativo, na regulação da expressão do LHR em diferentes estados patológicos.

A modulação torna-se ainda mais complexa quando é proposta a existência de dois genes do LHR em humanos (Tsai-Morris et al., 1998), sendo um dos genes preferentemente expresso no ovário. Os autores propõem uma expressão seletiva para cada uma das cópias do LHR em tecidos-alvos distintos.

A expressão seletiva do LHR também pode ser resultado da variabilidade na região promotora do gene. Hämäläinen et al. (2002) utilizaram um gene repórter (β -galactosidase), fusionado à três diferentes comprimentos da região promotora do LHR, para estudar a modulação da expressão gênica na glândula adrenal, no testículo e no ovário de camundongos transgênicos. Os autores observaram que houve a expressão do gene repórter no testículo, mediante uma região promotora do LHR distinta

daquelas utilizadas, pelo gene repórter, na glândula adrenal e no ovário (Hämäläinen et al., 2002).

A variedade observada no LHR – tanto na forma de transcritos como de proteínas – embora pareça redundante e atualmente não tenha uma explicação, encontra uma correspondência na multiplicidade detectada no próprio LH. Essa variação pode ocorrer em diferentes fases do ciclo estral bovino, com distintas proporções de isoformas ácidas, neutras e básicas do LH (Perera-Marin et al., 2005).

A modulação também pode ocorrer na mobilidade do complexo receptor-ligante na membrana citoplasmática. Aparentemente, o tipo de ligante (LH, hCG ou hCG deglicosilado) ou de receptor (LHR funcional ou não –funcional), induzem diferenças estruturais entre os complexos receptor-ligante formados (Roess et al., 2000a). Em ratos, os complexos funcionais seriam aqueles com uma difusão rotacional lenta, ou mesmo imóveis, refletindo interações essenciais entre esses complexos e outras proteínas de membrana (Roess et al., 2000a).

Horvat et al. (1999) demonstraram, mediante um LHR intrinsecamente fluorescente com GFP, que o LHR não ocupado está distribuído na membrana plasmática de maneira dispersa e com rápida difusão lateral, enquanto que o LHR ligado - ao LH ou ao hCG - forma agrupamentos com restrita difusão lateral.

Finalmente, interações entre os próprios receptores foram demonstradas para o LHR. Parece que o mecanismo de dessensibilização ao agonista, observado com o LHR em células da granulosa em cultivo e nas células

foliculares após o pico pré-ovulatório de LH, é mediado por auto-associações entre dois ou mais LHR, a proteína β -arrestina e regiões da membrana citoplasmática denominadas “raft” (Roess et al., 2000b; Hunzicker-Dunn et al., 2003; Roess & Smith, 2003). Nessa série de estudos, foi demonstrado que o padrão dos agrupamentos de LHR na membrana citoplasmática (tamanho e mobilidade lateral) difere quanto ao ligante (LH ou hCG) e o estado funcional (dessensibilizados ou funcionais).

2.5. Atividade biológica das isoformas do LHR

Os receptores de LH, resultantes da transcrição das isoformas de mRNA do LHR, podem exercer algumas atividades celulares, entre as quais o transporte do LHR até a membrana citoplasmática.

O exon 10 foi considerado essencial para o transporte do LHR humano até a membrana citoplasmática (Zhang et al., 1998), embora este estudo esteja em contradição com outros realizados em bovinos (Kawate et al., 2002; Kawate, 2004). Kawate et al. (2002) demonstraram o transporte e o posicionamento na superfície celular da isoforma do LHR com a deleção do exon 10. Neste estudo, isoformas truncadas decorrentes da deleção parcial do exon 11 não foram transportadas até a membrana citoplasmática, ficando aprisionadas no citoplasma. Porém, todas as isoformas (deleções dos exons 10 e 11) mantiveram a capacidade de ligação ao hormônio.

Porém, hipóteses de cooperação de dímeros, trímeros ou oligômeros de receptores, na obtenção de funcionalidade de receptores acoplados à proteína G (mediando o transporte da isoforma completa, a apresentação do

ligante ao receptor ou mesmo o controle da biodisponibilidade do ligante), poderiam incluir uma função para as isoformas truncadas (Roess et al., 2000a; Pierce et al., 2002; Robert et al., 2003; Nakamura et al., 2004).

A variação biológica, na expressão do LHR, inclui até uma linhagem de primatas (*Platyrrhini*) em que o exon 10 é naturalmente perdido durante a transcrição (Gromoll et al., 2003). Não havendo a forma completa (com o exon 10) e sendo as espécies dessa subclasse sexualmente normais, a evolução desses animais produziu um sistema único, em mamíferos, em que um hormônio – estruturalmente semelhante ao hCG – é produzido na hipófise em detrimento do LH. Esse hormônio, denominado gonadotrofina semelhante à coriônica, é o responsável pela manutenção da ativação do receptor de LH dessa subclasse de animais (LHR tipo II).

Uma tentativa prática para a ativação de qualquer isoforma de LHR, presente na superfície celular, seria a administração de hCG ou de ambos os ligantes (LH e hCG). Em bovinos, foi relatada uma tentativa neste sentido (Nogueira et al., 2005a), com vacas superestimuladas. Quando doadoras superestimuladas foram induzidas a ovular com LH (controle) ou LH e hCG (tratado), não houve diferença significativa na produção total de estruturas ou de embriões viáveis, assim como nas taxas de viabilidade embrionária e de concepção após inovulação (Nogueira et al., 2005b).

Em eqüinos, a diferença na afinidade de ligação do LH e do eCG, com o LHR, demonstra que, mesmo os ligantes e o receptor sendo de uma única espécie, ocorrem cinéticas distintas de ligação e estimulação (Saint-Dizier et al., 2004b). Nesse estudo com células COS-7 transfectadas com cDNA do

receptor de LH/CG oriundo do CL eqüino, a ligação do eCG com o LHR eqüino (eLHR), foi de apenas 12,4% da atividade de ligação do LH eqüino (eLH), enquanto que a produção de cAMP mediada pelo eCG, foi de 13,9% daquela estimulada pelo eLH.

O LHR poderia possuir um sistema de degradação semelhante ao observado no sistema IGF, onde proteínas ligadoras (IGFBP) e proteases das IGFBP, seriam responsáveis pela biodisponibilidade do IGF (IGF livre). No caso do LHR, haveria uma proteína ligadora do LHR (LRBP) que seria ativada, ou sintetizada, em resposta ao pico pré-ovulatório de LH ou de doses farmacológicas de hCG. Após a ligação da LRBP com o mRNA do LHR, esse complexo seria marcado para a degradação, promovendo a “down-regulation” da expressão do LHR (Menon et al., 2004).

Entretanto, a “down-regulation” da isoforma completa do mRNA do LHR poderia ser regulada pelo próprio “splicing” alternativo, onde os transcritos alternativos do LHR seriam os responsáveis pela diminuição da expressão da forma completa (Licht et al., 2003; Abdennebi et al., 2002).

2.6. LHR em tecidos extragonadaís

Importantes ações extragonadaís do LHR são relatadas em ruminantes, tais como a participação na secreção da glicoproteína do oviduto (OGP) e a possível participação no mecanismo luteolítico (Fields & Shemesh, 2004).

O pico pré-ovulatório de LH seria o mecanismo responsável pela síntese da OGP, em bovinos. A presença de LHR no oviduto bovino foi utilizada como base para o tratamento, com hCG, em coculturas de células epiteliaís do

oviduto (Mishra et al., 2003). Os oócitos oriundos de coculturas tratadas com hCG, atingiram a fase de blastocisto em maior proporção que aqueles de coculturas sem tratamento. Os autores sugerem que, o benefício do tratamento com hCG foi mediado pela ativação do LHR – nas células epiteliais do oviduto – e da síntese de OGP na cocultura.

Outra função extragonadal, mediada pelo LHR, seria a participação na luteólise em bovinos e ovinos (Fields & Shemesh, 2004). Na fase luteal, do ciclo estral bovino, a incubação de segmentos de endométrio com LH foi mais efetiva, em produzir fosfato de inositol, do que a ocitocina. Além disso, o tratamento intravenoso com 3.000 UI de hCG, em vacas no 15º dia do ciclo estral, produziu uma concentração maior de PGFM do que o tratamento com 100 UI de ocitocina (Fields & Shemesh, 2004). Os autores sugerem que, em adição ao bem estabelecido papel como agente luteotrópico, o LH possuiria um efeito semelhante à ocitocina no processo luteolítico.

O fato do LHR estar distribuído – e funcional – em outros tecidos que não as gônadas, indica que o LHR evoluiu inicialmente em tecidos extragonadais durante o processo evolucionário, sugerem Fields & Shemesh (2004).

O LHR também foi utilizado como mediador de uma nova terapia de combate às células do carcinoma mamário (Bodek et al., 2003). Devido ao fato de que, em humanos e animais, as células do carcinoma da glândula mamária expressarem o LHR, foi testada uma terapia na qual um peptídeo lítico (Hecate) foi fundido, in vitro, a um fragmento de 15 aminoácidos da cadeia β da gonadotrofina coriônica (CG β). O tratamento de linhagens

celulares de câncer de mama humano e de tumor de Leydig murino, com esse conjugado (Hecate-CG β), mostrou uma relativa eficiência na destruição das células-alvo (inibição de 50% da ligação entre a CG e o LHR) e uma moderada citotoxicidade (Bodek et al., 2003).

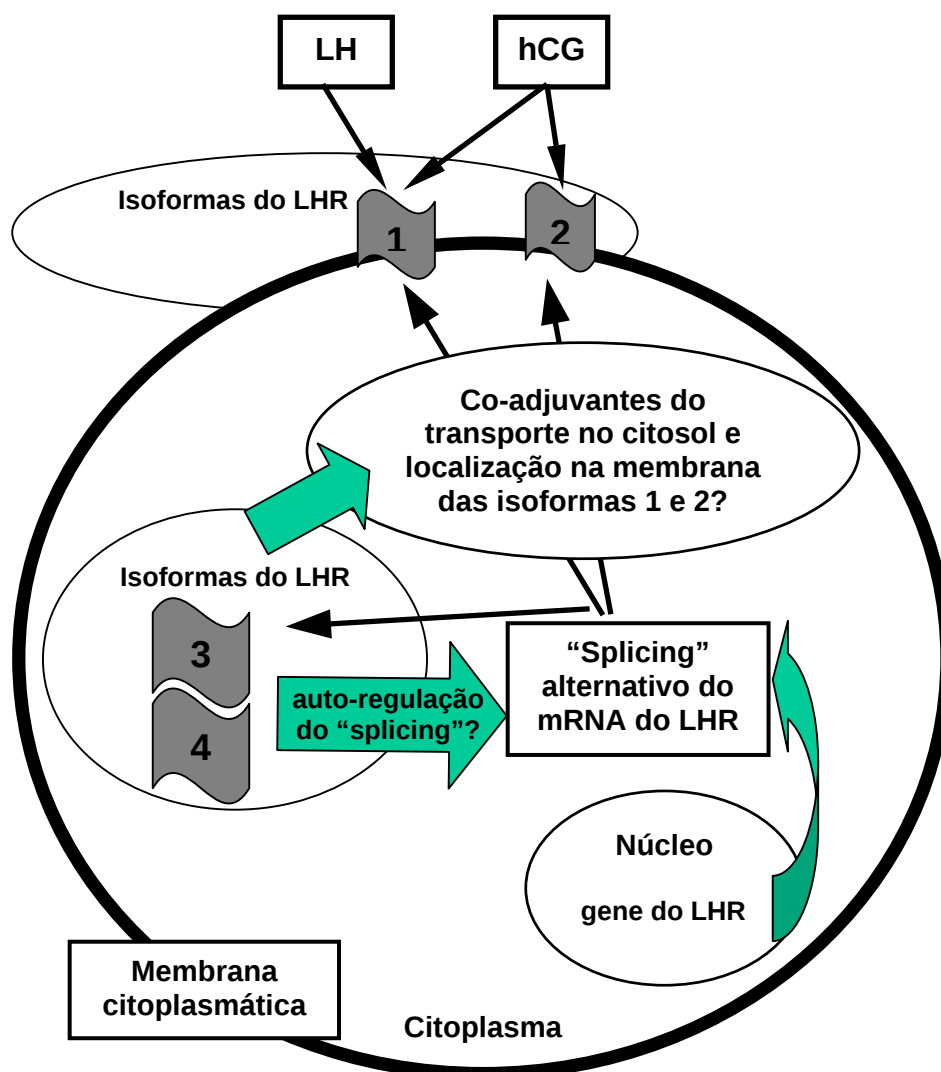


Fig. 4. Representação esquemática de possíveis mecanismos de controle do LHR em uma célula do folículo ovariano. Após a transcrição do gene do LHR em um pré-RNA, ocorre o "splicing" alternativo em, pelo menos, quatro isoformas de mRNA. Duas dessas isoformas de mRNA (1 e 2) poderiam ser traduzidas em proteínas com capacidade de ligação à molécula de LH (isoforma 1) ou de hCG (isoformas 1 e 2), além de reterem a capacidade de ativação da proteína G e da resposta celular. Por outro lado, as isoformas 3 e 4 de mRNA do LHR seriam traduzidas em receptores truncados (sem a região intracelular), incapazes de localizarem-se na superfície celular. Especula-se que estas duas isoformas (3 e 4) estariam implicadas no transporte até a superfície celular das isoformas 1 e 2 do LHR, assim como na auto-regulação do mecanismo de "splicing" que estaria gerando as quatro isoformas de mRNA do LHR.

3. MATERIAL E MÉTODO

Nesta seção serão descritos os procedimentos para; a obtenção das amostras de células da teca e da granulosa dos folículos antrais bovinos (sub-item 3.1.); a extração do RNA total das amostras (3.2.); o radioimunoensaio da dosagem das concentrações de estradiol e de progesterona no fluido folicular (3.3.); os critérios de classificação folicular (3.4.); as técnicas da reação de transcrição reversa (RT) e da reação em cadeia da polimerase (PCR; sub-item 3.5.); a eletroforese em gel de poliacrilamida (3.6.); o seqüenciamento dos fragmentos amplificados por RT-PCR (3.7.); a caracterização da expressão das isoformas do LHR em células da granulosa cultivadas in vitro (3.8.); e a análise estatística (3.9.).

3.1. Obtenção dos folículos antrais

Folículos antrais de 5 a 14mm de diâmetro foram dissecados a partir de ovários bovinos para posterior extração do RNA total. Os ovários foram coletados de animais cruzados (*Bos t. taurus* X *Bos t. indicus*) ou “anelorados” (fenótipo semelhante ao padrão racial), em matadouro situado a 50Km de Botucatu (Frigorífico Frigol, Lençóis Pta.-SP). Os ovários foram transportados em solução fisiológica a 4°C até o laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu-SP, onde foram cuidadosamente dissecados para a separação dos folículos.

Após dissecação e retirada do estroma ovariano, nos folículos iguais ou maiores que 5mm de diâmetro, foi realizada a aspiração do fluido folicular com

agulha 26G (seringa de 1mL) e congelação do aspirado em freezer (Forma Scientific®) a -80°C para posterior análise das concentrações de esteróides por radioimunoensaio. Sem que a agulha fosse retirada do folículo, solução fisiológica estéril a 4°C foi injetada e retirada da cavidade folicular repetidamente (cerca de 8 vezes) para recuperação das células da granulosa. Em seguida, a solução contendo as células foi centrifugada (1200g por 1 minuto, em centrífuga Eppendorf®) a fim de concentrar as células e possibilitar a remoção da solução fisiológica. Ao pellet de células resultante foi adicionado 1mL de solução Trizol® (Invitrogen®), homogeneizadas (homogeneizador de tecidos Polytron – UltraTurrax/T-25) por 1 minuto em gelo e congelados a -80°C para posterior extração de RNA total.

Logo após a recuperação das células da granulosa, o folículo foi dividido ao meio em uma placa de Petri estéril com auxílio de uma lâmina de bisturi e a camada de células da teca foi destacada da face interna da parede folicular com a utilização de pinças oftálmicas. Cuidadosamente, essa camada foi raspada em sua face interna com uma cureta de vidro feita com uma pipeta Pasteur e lavada em solução fisiológica estéril mediante aspirações e ejeções sucessivas com seringa de 1mL, a fim de eliminar células da granulosa remanescentes. Em seguida, a camada da teca foi imersa em 1mL de solução Trizol®, homogeneizada e congelada à -80°C.

3.2. Extração do RNA total

Depois de trituradas e homogeneizadas, as amostras de folículos antrais foram submetidas ao protocolo Trizol® para extração de RNA total. Este

protocolo foi realizado em quatro etapas sequenciais descritas a seguir: separação, precipitação, lavagem e dissolução do RNA total.

Na etapa de separação do RNA total, as amostras armazenadas em freezer a -80°C foram primeiramente mantidas por 5 minutos à temperatura ambiente (15 a 30°C). Após este período, as amostras foram acrescidas de 200µL de clorofórmio para cada 1mL de Trizol[®] utilizado na homogeneização e agitadas manual e vigorosamente durante 15 segundos. A agitação foi seguida de uma nova “incubação” à temperatura ambiente por 2 a 3 minutos e centrifugação a 12.700g por 15 minutos à temperatura de 2 a 8°C. O clorofórmio foi responsável pela separação da amostra em duas fases, sendo uma orgânica e a outra inorgânica ou aquosa. O RNA total permaneceu solubilizado exclusivamente na fase aquosa, representada pelo sobrenadante transparente resultante da centrifugação.

Na etapa de precipitação do RNA total, a fase aquosa obtida anteriormente foi transferida para um novo tubo (polipropileno de 1,5mL – Eppendorf[®]) e acrescida de álcool isopropílico na proporção de 0,5mL de isopropanol para cada 1mL de Trizol[®] utilizado na homogeneização. Esta mistura foi incubada à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugada a 12.700g durante 10 minutos à temperatura de 2 a 8°C. O álcool isopropílico foi o responsável pela precipitação do RNA total. Desta forma, dependendo da quantidade de RNA total contido na amostra, pôde-se observar um pellet no fundo do tubo após a centrifugação.

Na etapa de lavagem do RNA total, o sobrenadante foi removido e pelo menos 1mL de etanol a 75% foi acrescido ao tubo para cada 1mL de Trizol[®]

utilizado na homogeneização. A amostra foi lavada com auxílio de agitador (Vórtex®) e centrifugada a 5.900g durante 5 minutos à temperatura de 2 a 8°C.

Na etapa de dissolução do RNA total, o sobrenadante foi removido cuidadosamente e, após a retirada do excesso de líquido do fundo do tubo com auxílio de uma ponteira de pipeta, o pellet foi seco à temperatura ambiente durante cerca de 5 minutos. O RNA total foi dissolvido em água destilada e autoclavada (tratada com Dietilpirocarbonato-Sigma® - DEPC, a 0,1%) por meio de repetidas aspirações e ejeções com auxílio de uma pipeta (Gilson®), incubado por 10 minutos à temperatura de 60°C (Bloco aquecedor – Thermolyne Type 17600®) e, finalmente, armazenado a - 80°C.

As amostras de RNA total provenientes das células da granulosa e células da teca foram dissolvidas em 10 e 20µL de água destilada, respectivamente. O teste de pureza (relação entre a absorbância de 280 e 260nm) e a concentração (absorbância de 260nm) de RNA total destas amostras foram determinadas no espectrofotômetro (BioPhotomether-Eppendorf®).

3.3. Radioimunoensaio

A dosagem das concentrações de estradiol e de progesterona, presentes no fluido folicular, foi realizada mediante radioimunoensaio (RIA). Para maiores detalhes da validação do RIA para o fluido folicular, vide Teixeira (2004).

3.4. Classificação folicular

Os folículos foram classificados de acordo com a concentração de estradiol (E2) e diâmetro. Os folículos com progesterona (P4) >100ng/mL foram considerados atresícos e excluídos da análise. Com relação à concentração de E2, os folículos foram agrupados em 4 classes (<5, 5-20, >20-100 e >100ng/mL) baseado na classificação de Berisha et al. (2000). Além disso, os folículos foram agrupados em classes baseadas no diâmetro: folículos de 5 a 7, 8 a 10 e >10mm de diâmetro.

3.5. RT-PCR

Após a extração do RNA total dos folículos antrais, a expressão gênica do LHR foi investigada por reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). A fim de evitar que uma eventual contaminação por DNA genômico nas amostras de RNA total interferisse nos resultados, todas as amostras de RNA total foram tratadas com DNase antes de serem submetidas ao RT-PCR.

3.5.1. Protocolo DNase I

Conforme as instruções do protocolo DNase I - Amplification Grade (Invitrogen®), o RNA total destinado a reação de transcrição reversa foi transferido para microtubo estéril, onde acrescentou-se 1μL de tampão DNase, 1μL de DNase I (1U/μL) e água destilada tratada com DEPC e autoclavada na quantidade suficiente para completar 10μL de solução. Essa solução permaneceu à temperatura ambiente durante 15 minutos e, em seguida, foi

acrescida de 1 μ L de EDTA (25mM) e incubada a 65°C por 10 minutos. Após a incubação, as amostras foram transferidas para gelo e imediatamente submetidas à reação de transcrição reversa.

3.5.2. Reação de transcrição reversa (RT)

Para a reação de transcrição reversa, utilizou-se o kit SuperScript III (Invitrogen®), cujo protocolo iniciou-se pela adição em microtubo estéril de 8 μ L da solução de RNA total tratada com DNase I (contendo 1 μ g de RNA total proveniente das células da teca e das células da granulosa), 1 μ L de oligonucleotídeo iniciador Oligo (dt) (500 μ g/mL) e 1 μ L de dNTP Mix (10mM). Esta solução foi incubada a 65°C por 5 minutos e, em seguida, incubada em gelo por 1 minuto e meio. Após a última incubação, adicionou-se à solução 4 μ L de tampão “First Strand” 5X, 1 μ L de DTT (0,1M), 1 μ L de “RNaseOUT Inhibitor” (40U/ μ L) e 1 μ L (200U) de SuperScript III RT (transcriptase reversa). Na sequência, a solução foi incubada a 50°C por 50 minutos, seguida de 70°C por 15 minutos e, finalmente, em gelo por 2 minutos. Em seguida, as amostras foram mantidas em gelo para utilização imediata no PCR ou armazenadas a -20°C.

3.5.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do LHR foram delineados com base na sequência para o gene bovino depositada no GenBank (acesso U20504). Em um dos pares, o oligonucleotídeo iniciador “sense” foi posicionado no exon 2, enquanto o oligonucleotídeo iniciador “anti-

sense” foi posicionado no exon 9 (Figura 5). Desse modo, os iniciadores flanqueiam somente a região extracelular do receptor (amplicon nomeado LHRA). Para o outro par de oligonucleotídeos, o iniciador “sense” foi posicionado no exon 9 e o “anti-sense” no exon 11 (Figura 5). Este fragmento amplifica o final da região extracelular, a região transmembrânica e a maior parte da região intracelular do receptor (amplicon nomeado LHRBC). As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação do GAPDH (gene constitutivo, utilizado como controle interno das reações semiquantitativas), bem como para o LHRA e LHRBC, são descritas na Tabela 1. A quantidade de amplicons (isoformas do mRNA) estimada para ser detectada na amplificação do fragmento LHRA (2 isoformas identificadas como N1 e N2) e do fragmento LHRBC (4 isoformas identificadas como M1, M2, M3 e M4), assim como o tamanho previsto destas isoformas, encontra-se na Tabela 1.

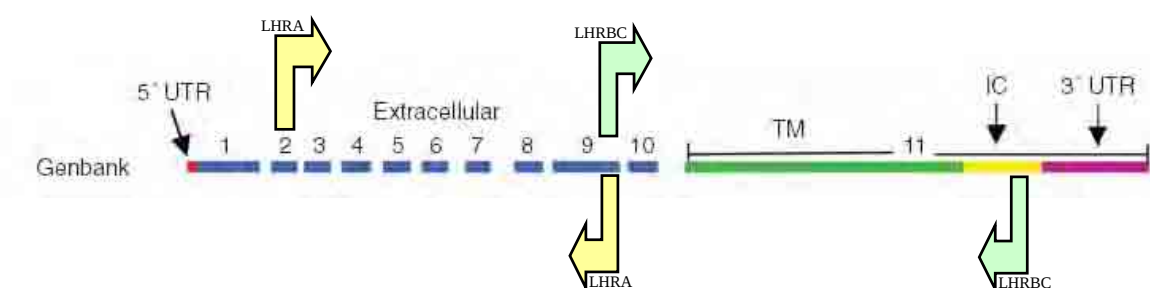


Fig. 5. Estrutura e disposição dos exons no gene codificador do LHR. Os números (1 a 11) indicam os exons; TM = domínio transmembrânico; IC = região intracelular; UTR = região não traduzida.

Para a amplificação desses genes utilizou-se o protocolo Invitrogen[®] de reação em cadeia da polimerase (PCR) que iniciou-se pela adição dos

reagentes em microtubos estéreis (polipropileno de 200 μ L - Axygen[®]) descritos a seguir:

Ao produto (cDNA) foi acrescido: 2,5 μ L de tampão PCR 10X (fornecido no Kit - Invitrogen[®]); 0,75 μ L de MgCl₂ (50mM); 0,5 μ L de dNTP Mix (0,2mM); oligonucleotídeos iniciadores “sense” e “antisense” (concentrações específicas para cada gene são descritas adiante); 1,25U de Platinum *Taq* DNA polimerase; água destilada autoclavada para completar 25 μ L. Na seqüência, as amostras foram incubadas a 94°C por 3 minutos (desnaturação inicial) no termociclador (MJ Research PTC 200[®]), seguidas por incubações termocíclicas correspondentes às fases de desnaturação, anelamento e extensão, específicas para cada gene e descritas a seguir.

Tabela 1- Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação dos genes-alvo GAPDH, LHRA e LHRBC. Identificação e tamanho das isoformas previstas para a amplificação dos fragmentos LHRA (2 isoformas) e LHRBC (4 isoformas).

Gene-alvo	Seqüência do oligonucleotídeo	Identificação e tamanho da isoforma do LHR
GAPDH	S 5' TGT TCC AGT ATG ATT CCA CC 3' A 5' TCC ACC ACC CTG TTG CTG 3'	GAPDH – 850pb
LHRA	S 5' TCA AAG TAA TCC CAT CTC AAG C 3' A 5' CTC GTT TGT TGG CAA GTT TCT 3'	N1 - 686pb N2 - 611pb
LHRBC	S 5' AAA CTT GCC AAC AAA CGA 3' A 5' ATA GCA AGT CTT GTC CAG GA 3'	M1 - 1.240pb M2 - 1.159pb M3 - 975pb M4 - 894pb

S = “sense”; A = “antisense”; pb = pares de bases.

3.5.3.1. Investigação da pureza das amostras de células da granulosa e da teca

A fim de detectar a contaminação das amostras de cDNA de células da teca com células da granulosa e vice e versa, investigou-se a expressão da CYP17, característica de células da teca, nas amostras de células da granulosa e da CYP19, característica de células da granulosa, nas amostras de células da teca. Para maiores detalhes vide Teixeira (2004). As amostras que apresentaram contaminação foram descartadas dos experimentos de quantificação da expressão gênica do LHR.

3.5.3.2. Padronização do RT-PCR semiquantitativo para LHRBC

A análise semiquantitativa da expressão do LHR somente foi validada e realizada para o fragmento LHRBC do gene. Para o fragmento LHRA somente foi investigada, mediante o seqüenciamento (vide sub-item 3.7.), a ocorrência de transcritos alternativos à isoforma completa do mRNA do LHR.

Amostras de RNA total provenientes de células da teca e da granulosa positivas para o gene LHR foram utilizadas, a fim de que o RT-PCR semiquantitativo fosse validado para um grau de expressão semelhante ao das amostras a serem posteriormente quantificadas.

Para validação do RT-PCR semiquantitativo, elegeu-se um número de ciclos de PCR dentro da fase de aumento linear dos sinais de expressão gênica com o número de ciclos. Além disso, diferentes quantidades (μ g) de RNA total foram testadas a fim de selecionar-se quantidade dentro da fase de aumento linear dos sinais de expressão gênica (Figuras 6, 7 e 8).

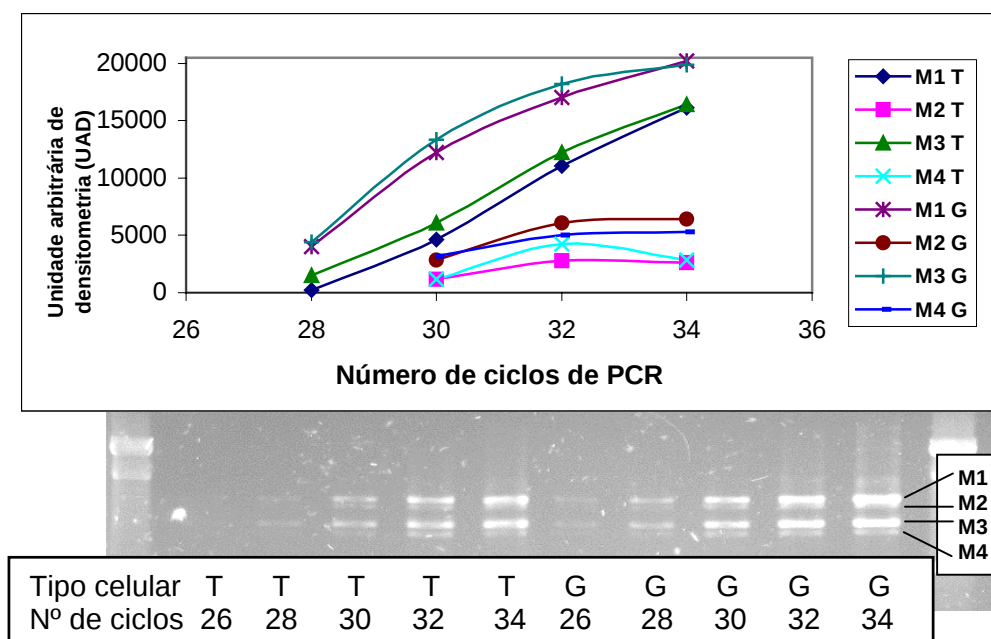


Fig. 6. Validação da técnica de RT-PCR semiquantitativa. Controle do número de ciclos utilizados na amplificação do cDNA do gene LHR (fragmento LHRBC), de células da teca (T) e da granulosa (G) provenientes de um mesmo folículo com 13mm de diâmetro. As quatro isoformas detectadas, na expressão do fragmento LHRBC, são denominadas M1, M2, M3 e M4.

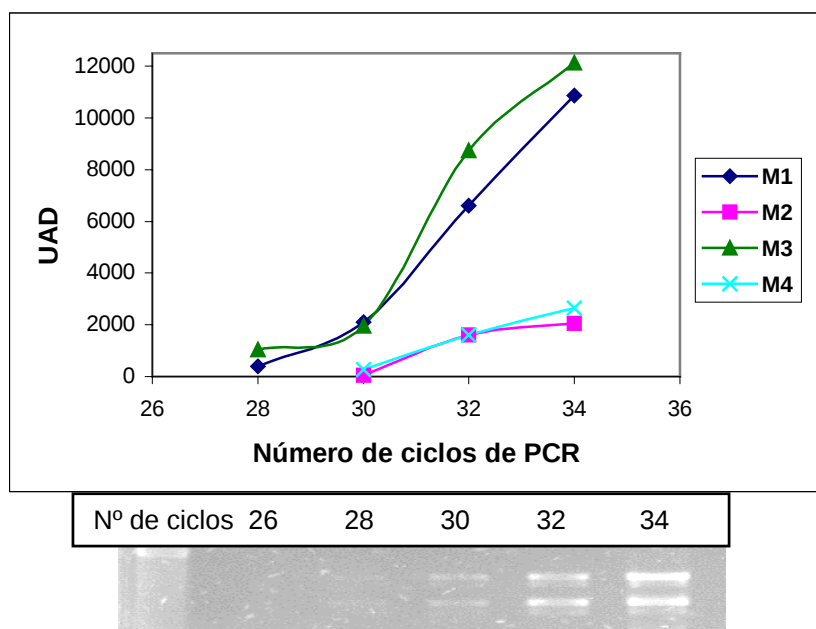


Fig. 7. Validação da técnica de RT-PCR semiquantitativa. Controle do número de ciclos utilizados na amplificação do cDNA do gene LHR (fragmento LHRBC), de células da teca provenientes de um folículo com 5mm de diâmetro.

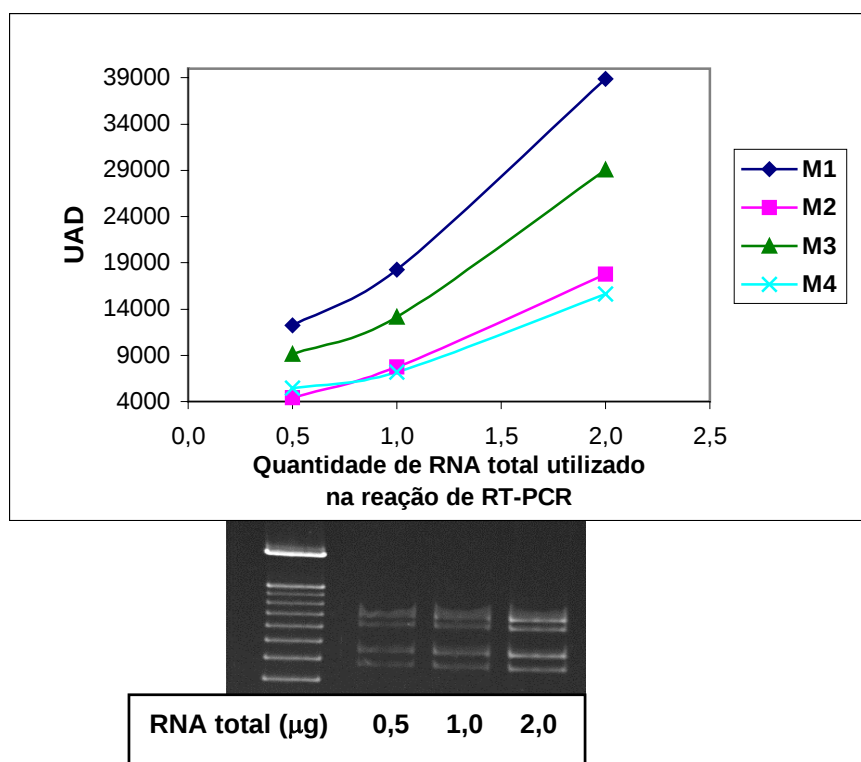


Fig. 8. Validação da técnica de RT-PCR semiquantitativa. Controle da quantidade de RNA total (μg) utilizado na reação de RT-PCR. Amplificação do cDNA do gene do LHR em células da granulosa (fragmento LHRBC e suas isoformas M1, M2, M3 e M4), utilizando 29 ciclos de PCR (imagem do gel).

O RT-PCR semiquantitativo para o LHR (LHRBC) foi validado amplificando-se o gene alvo e o gene constitutivo GAPDH separadamente, uma vez que a combinação dos respectivos pares de oligonucleotídeos iniciadores mostrou-se incompatível com a amplificação simultânea, a despeito das várias tentativas de padronização variando a concentração dos oligonucleotídeos e a temperatura de anelamento. Para a amplificação de fragmentos destes genes utilizou-se o protocolo Invitrogen® de reação em cadeia da polimerase (PCR), descrito anteriormente. Condições padronizadas:

a) GAPDH:

- Quantidade de RNA na transcriptase reversa: 1µg;
- Quantidade de cDNA no PCR: 0,5µL^{*};
- Concentração de oligonucleotídeos iniciadores: 0,16µM;
- Número de ciclos: 22;
- Ciclos do PCR: 94°C por 45s (desnaturação), 60°C por 45s (anelamento) e 70°C por 1min (extensão).

b) LHRBC:

- Quantidade de RNA na transcriptase reversa: 1µg;
- Quantidade de cDNA no PCR: 0,5µL^{*};
- Concentração de oligonucleotídeos iniciadores: 0,4µM;
- Número de ciclos: 29;
- Ciclos do PCR: 95°C por 1min (desnaturação), 60°C por 1min (anelamento) e 70°C por 1min (extensão).

3.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os produtos do PCR foram submetidos à eletroforese (108V / 2 ou 2,5 h, respectivamente para GAPDH e LHRBC) em gel de poliacrilamida 5% em tampão constituído de Tris, ácido bórico e EDTA (TBE) (Sambrook & Russel, 2001). Após o término da eletroforese, o gel foi corado com uma solução de brometo de etídio (1µg/mL TBE) durante 15min. O “DNA Ladder 100bp” (Invitrogen[®]) foi utilizado como referência para avaliar o tamanho dos fragmentos amplificados. As imagens dos géis foram visualizadas mediante exposição do gel à luz UV em transiluminador (EAW-20 UltraLum[®]). Após a visualização, os géis foram fotografados com câmera Polaroid[®] (modelo DS-34) e digitalizados no Departamento de Biofísica do Instituto de Biociências da UNESP (Campus de Botucatu), utilizando-se o sistema de captura e análise de imagem, Image Master VDS[®] (Pharmacia Biotech[®], by D&R Israel) para posterior realização da densitometria das bandas.

^{*} Equivalente a 50ng de RNA da reação de transcrição reversa.

3.7. Seqüenciamento dos fragmentos amplificados por RT-PCR

Fragmentos do gene LHR amplificados por RT-PCR a partir de células da granulosa (LHRA) e da teca (LHRBC) foram seqüenciados, comprovando tratar-se dos genes-alvos e descartando uma eventual amplificação inespecífica de produtos com tamanhos coincidentemente iguais aos dos fragmentos esperados. Para a isoforma N2 do LHRA, uma parte da seqüência teve 90% de similaridade em relação à referência obtida no GenBank (U20504). Da mesma forma, as seqüências das isoformas do LHRBC (M1, M2, M3 e M4) foram 99, 97, 98 e 99% idênticas à seqüência referência.

Os seqüenciamentos foram realizados no Departamento de Endocrinologia Experimental do Instituto Nacional de Farmacologia (INFAR) - UNIFESP em São Paulo (LHRA) e Departamento de Genética, Instituto de Biociências (IB), da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu (LHRBC).

3.8. Caracterização do padrão de expressão das isoformas do LHRBC em células da granulosa cultivadas in vitro

Células da granulosa, não luteinizadas, cultivadas por 6 dias em meio livre de soro foram utilizadas para esta caracterização, baseado na técnica de cultura de Gutiérrez et al. (1997) modificada por Silva & Price (2000). As amostras - provenientes do laboratório do Prof. Christopher Price (CRRA, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montreal, St-Hyacinthe, Québec, Canadá) - foram tratadas com 0 (controle da expressão in vitro), 1 ou 10 ng de FSH no meio de cultura. Para cada tratamento foram realizadas 3 replicatas. O

procedimento para a obtenção e a amplificação do cDNA das amostras foi essencialmente o descrito anteriormente. A exceção foi a utilização do kit OmniScript (Qiagen) para a reação de RT. Como controle positivo foi utilizada uma amostra de células da teca, previamente amplificada para LHRBC (controle da expressão in vivo).

3.9. Análise estatística

Os valores relativos da expressão do fragmento LHRBC em cada amostra de células (isto é, a UAD de cada isoforma do mRNA do LHRBC - M1, M2, M3 e M4 – em relação ao valor da UAD do gene constitutivo GAPDH) foram transformados em logaritmos.

Três folículos - células da teca e da granulosa - foram removidos das análises, devido à não detecção do LHRBC em células da teca (células estas consideradas de intensa e constante expressão do LHR; amostras 7 e 28, vide Anexo 1), e à ausência da concentração da progesterona intrafolicular (amostra 23, vide Anexo 1).

Análise de variância (ANOVA) foi utilizada para verificar o efeito da classe do tamanho do folículo e da classe de concentração de estradiol (vide classificação folicular, sub-item 3.4.) sobre a expressão gênica. A comparação das médias foi realizada por meio de contrastes ortogonais.

A análise de co-variância da expressão de cada uma das isoformas do LHRBC (M1, M2, M3 e M4) foi realizada simultaneamente em função das co-variáveis (diâmetro folicular, concentração intrafolicular de estradiol e de

progesterona) e do tipo celular (células da teca e da granulosa oriundas do mesmo folículo).

Nas células da teca e da granulosa, foi realizada a análise de regressão linear entre as próprias isoformas do mRNA do LHRBC (M1 versus M2, M3 e M4; M2 versus M3 e M4; M3 versus M4).

Para a comparação da expressão do LHRBC em células da granulosa de cultura, foi utilizado o teste “t” (não pareado) para a média da razão entre as isoformas M1 e M2 das replicatas tratadas com 1 e 10 ng de FSH e, como controle, a média da razão M1:M2 de todas as amostras de células da granulosa obtidas de ovários em matadouro (controle *in vivo* da expressão do LHRBC).

Os dados são apresentados na forma de médias e a variabilidade na forma de erro padrão médio (EPM). Foram consideradas significativas as diferenças com valor de $P < 0,05$. A análise foi realizada utilizando-se o programa GraphPad InStat[®], versão 3.02 (San Diego, Califórnia - USA, 1998) e o programa Mixed Procedure (SAS Institute, Cary, NC, 1988).

4. RESULTADO

4.1. LHRA

Após seqüenciamento, a isoforma N2 (vide Figura 9) foi compatível com a seqüência de referência de cDNA do LHR bovino (GenBank U20504), havendo 96% de similaridade em um pequeno fragmento de 26pb (final do exon 2) e 90% de similaridade em um grande fragmento de 296pb (início do exon 4 até início do exon 9). Devido aos dois fragmentos estarem dispostos de forma contínua na seqüência obtida, foi detectada a completa deleção do exon 3. Foram excluídos 75pb na isoforma N2, em comparação à isoforma completa N1 ("full-length").

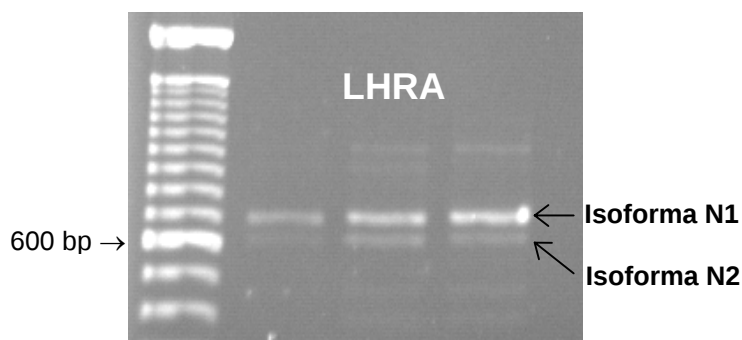


Fig. 9. Isoforma alternativa (N2) do fragmento LHRA do cDNA do gene do LHR bovino. Os iniciadores específicos foram posicionados nos exons 2 (sense) e 9 (antisense) da região extracelular do receptor. Foram detectadas duas bandas que, após seqüenciamento, possuíam seqüências homólogas à da referência, com exceção da ausência completa do exon 3 (75 pb) na isoforma N2. Para o tamanho das isoformas vide Tabela 1.

4.2. LHRBC

Nas quatro isoformas de mRNA do fragmento LHRBC seqüenciadas, foram detectadas as ocorrências de deleções nos exons 10 (81pb; M2 e M4) e parte do exon 11 (265pb; M3 e M4). A isoforma M1 possuía, essencialmente, a seqüência completa (“full-length”) da referência utilizada (1.240pb; vide Figura 10).

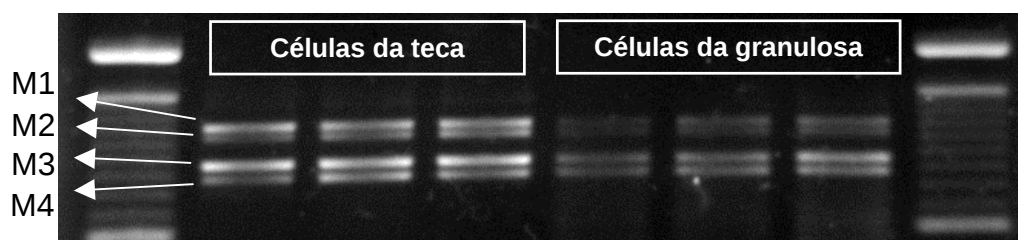


Fig. 10. Isoformas alternativas (M2, M3 e M4) do fragmento LHRBC do cDNA do gene do LHR bovino. Os iniciadores específicos foram posicionados nos exons 9 (sense) e 11 (antisense) das regiões extracelular, transmembrânica e intracelular do receptor. Após seqüenciamento, foram detectadas deleções dos exons 10 (M2 e M4) e parte do 11 (M3 e M4). Para o tamanho das isoformas vide Tabela 1.

Na Figura 11, pode ser visualizado o resultado do RT-PCR para cada uma das amostras de células da teca (vide detalhes das amostras no Anexo 1) e da granulosa (vide detalhes no Anexo 2).

Nas condições validadas, não houve expressão do LHRBC em nenhuma amostra de células da granulosa de folículos com 5 (n=3) e 6 mm de diâmetro (n=4). Foi observada a expressão do LHRBC em uma única amostra (16,7%, 1/6) de células da granulosa de folículos com 7 mm de diâmetro. Nas amostras de células da granulosa de folículos com diâmetro igual ou maior que 8 mm, a expressão do LHRBC foi observada de forma majoritária (87,5%, 21/24; vide Figura 12).

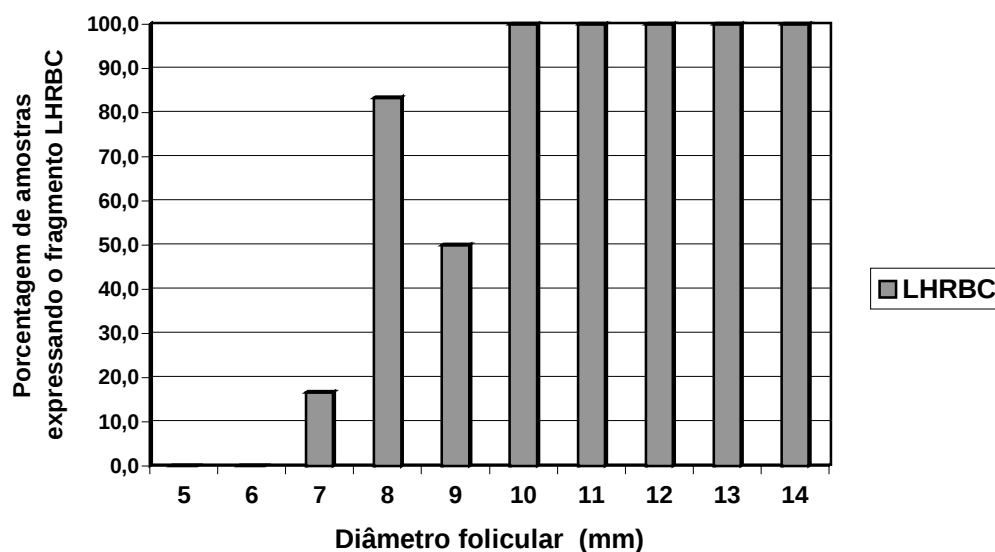


Fig. 12. Porcentagem de amostras de células da granulosa, de acordo com o diâmetro folicular, em que foi detectada a expressão do fragmento LHRBC (condições validadas). Não foi detectada a expressão do LHRBC em quaisquer amostras oriundas de folículos com 5 e 6 mm de diâmetro. A quantidade de amostras celulares em cada diâmetro folicular encontra-se no Anexo 2.

Somente duas amostras de células da teca (folículos de 7 e 9 mm de diâmetro; vide Anexo 1), não expressaram o LHRBC.

Na análise do efeito das classes, de diâmetro folicular e concentração intrafolicular de estradiol, sobre a comparação das médias da expressão do LHRBC, houve efeito significativo nas células da granulosa ($P < 0,01$; vide Figura 13). Porém, para as células da teca não houve efeito de classe sobre a expressão do LHRBC (Figura 13). Nas células da granulosa, a expressão das 4 isoformas do fragmento LHRBC seguiu o mesmo padrão nas classes de diâmetro folicular e concentração intrafolicular de estradiol, bem como

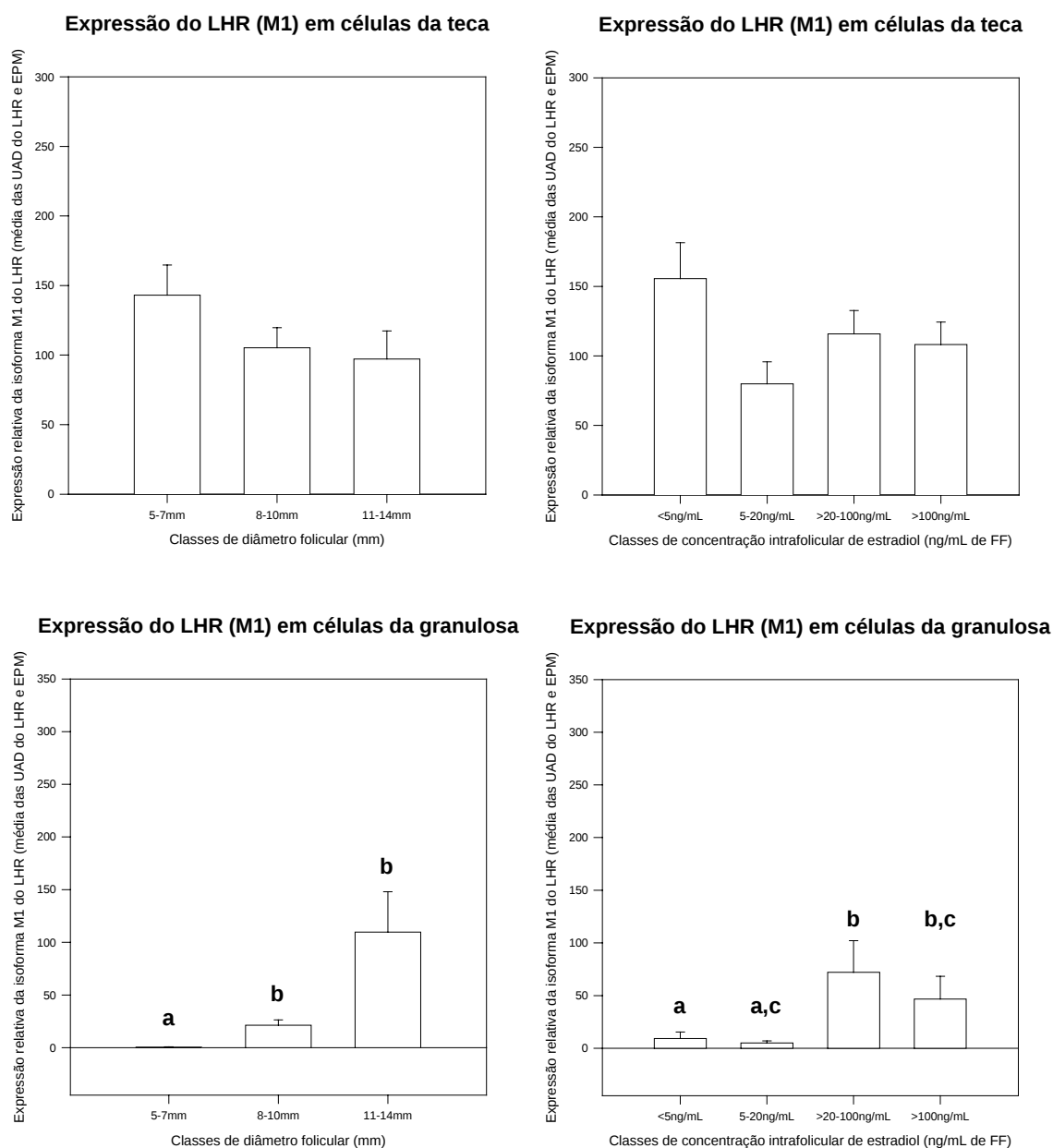


Fig. 13. Expressão do LHRBC (como exemplo, somente isoforma M1) em células da teca (painéis superiores) e da granulosa (painéis inferiores). A abundância relativa do LHRBC está distribuída por classes de diâmetro folicular (5-7, 8-10, e 11-14 mm) e de estradiol (<5, 5-20, >20-100 e >100 ng/mL de FF). Somente houve diferença significativa ($P<0,001$; efeito das classes na comparação das médias de expressão relativa do LHRBC) nas células da granulosa. Letras diferentes, acima das barras, indicam diferença significativa entre classes ($P<0,05$).

atingiram a significância estatística de forma semelhante. Desse modo, a Figura 13 exemplifica – na expressão da isoforma M1 – o padrão que representa a expressão de todas as isoformas do fragmento LHRBC.

Nas amostras de células da granulosa, houve uma correlação positiva entre a expressão das isoformas do LHRBC (M1, M2, M3 e M4) e o diâmetro folicular e a concentração de progesterona intrafolicular ($P < 0,01$; vide Figura 14 e Tabela 2). Nas células da granulosa, não houve efeito da concentração de estradiol na expressão das isoformas do LHRBC. Para as amostras de células da teca, a expressão das isoformas não foi correlacionada com quaisquer co-variáveis analisadas (vide Figura 14 e Tabela 2). Para os valores de P das análises individuais (expressão de cada isoforma do LHRBC), vide Tabela 2.

As amostras negativas para a expressão do LHRBC – de células da teca e da granulosa, nas condições validadas – foram novamente submetidas a uma reação de PCR (aumento do número de ciclos de 29 para 38). Nessa nova condição, a maioria das amostras apresentou algum grau de expressão do LHRBC, porém, sem o padrão anteriormente observado com 29 ciclos de amplificação. A principal diferença observada foi a perda de relação da expressão das quatro isoformas entre si, isto é, a constância na expressão das isoformas (M1 e M3 sendo mais expressas que M2 e M4) em praticamente todas as amostras analisadas. Com 38 ciclos de PCR, as amostras anteriormente negativas apresentaram padrões inconstantes como a expressão de somente uma, duas ou três das isoformas (amostras 2, 3, 7 e 12); expressões semelhantes das quatro isoformas (amostras 6, 10, 25 e 33); ou a isoforma M4 sendo mais expressa que as demais (amostra 11; vide Figura 15).

Tabela 2- Valores de P para a análise de co-variância da expressão das isoformas (M1, M2, M3 e M4) do fragmento LHRBC, em função de 3 co-variáveis (diâmetro folicular, concentração intrafolicular de estradiol e de progesterona) e tipo celular (células da teca e da granulosa). Para maiores detalhes vide sub-item 3.9. (Análise Estatística).

Co-variável e tipo celular	isoforma M1	isoforma M2	isoforma M3	isoforma M4
DF – T	0,2336	0,2194	0,1277	0,2715
Estradiol - T	0,4361	0,8193	0,1298	0,2408
Progesterona – T	0,6979	0,9694	0,5694	0,7533
DF – G	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Estradiol – G	0,8494	0,2820	0,9514	0,6924
Progesterona - G	0,0012	0,0001	0,0026	0,0001

DF = diâmetro folicular; T = células da teca; G = células da granulosa.

Para as células da granulosa, houve correlação positiva entre a expressão de cada isoforma comparada às demais (isto é, M1 versus M2; M1 versus M3; M1 versus M4, etc). As análises de regressão linear entre os pares de isoformas de mRNA do LHRBC, geraram $r > 0,975$ e $P < 0,0001$; vide Figura 16).

Na análise de regressão linear para as células da teca, houve uma forte correlação entre M1 e M3 ($r = 0,94$; $P < 0,001$), M2 e M4 ($r = 0,84$; $P < 0,001$), M1 e M2 ($r = 0,52$; $P = 0,002$), e M2 e M3 ($r = 0,51$; $P = 0,002$). Uma correlação positiva também foi obtida na comparação entre M3 e M4 ($r = 0,35$; $P = 0,038$), porém não houve correlação entre as isoformas M1 e M4 ($r = 0,21$; $P = 0,228$).

Expressão da isoforma M1 do LHR em células da teca e da granulosa

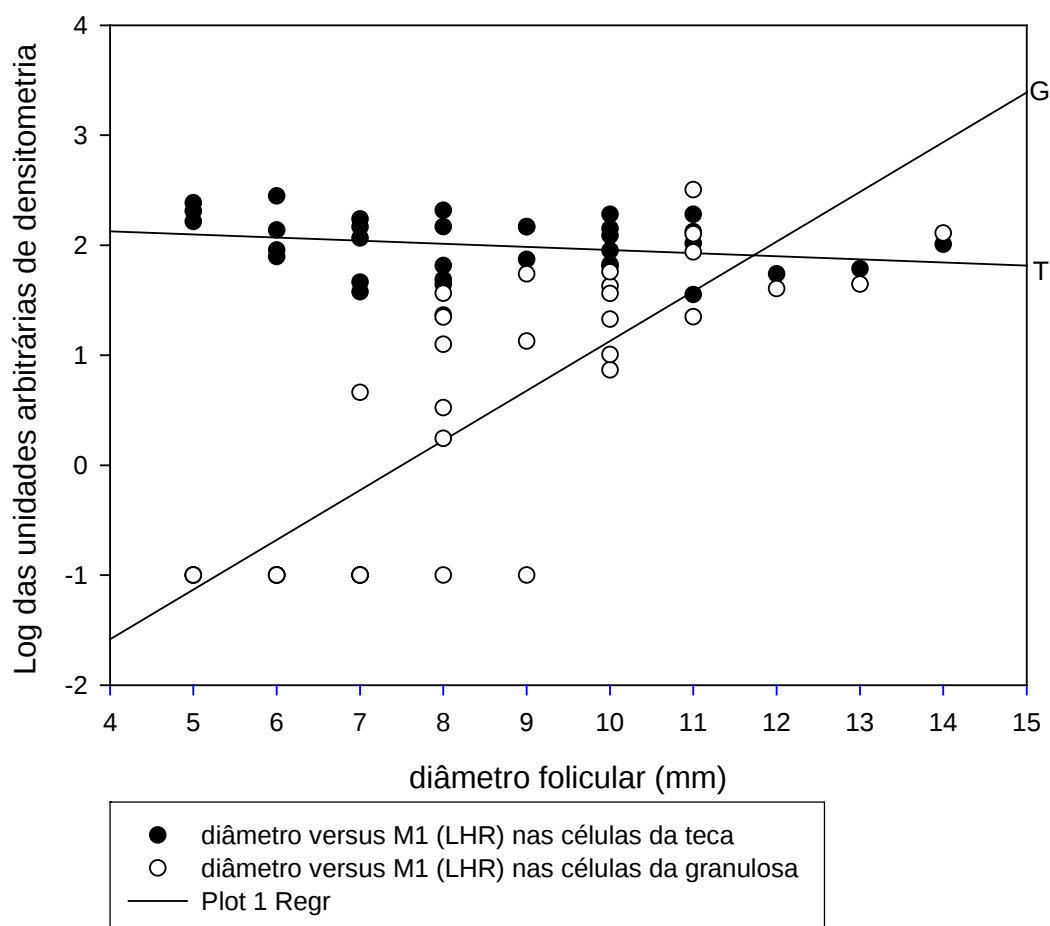


Fig. 14. Expressão do LHRBC em células da teca (T) e da granulosa (G) e diâmetro folicular (análise de co-variância). Como exemplo, somente a isoforma M1 é mostrada no gráfico. Nas células da granulosa, houve correlação positiva entre a expressão de todas as isoformas do LHRBC e o diâmetro folicular e a concentração intrafolicular de progesterona. A regressão da concentração de progesterona não está demonstrada neste gráfico. Não houve correlação entre quaisquer co-variáveis e a expressão das isoformas de LHRBC nas células da teca.

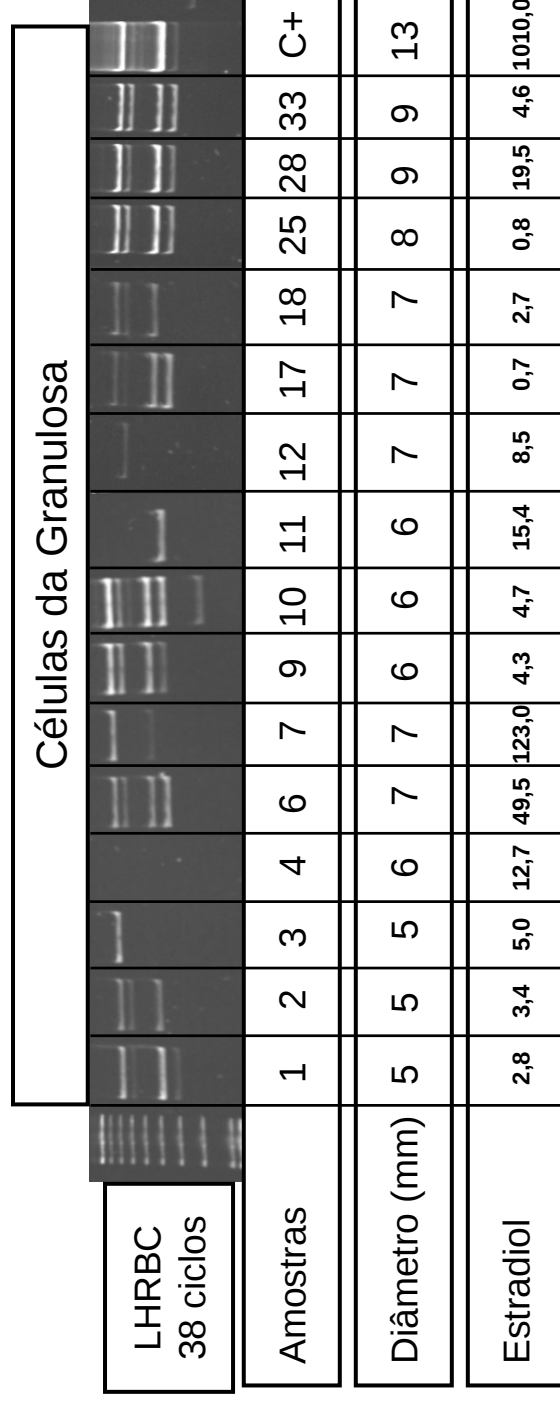
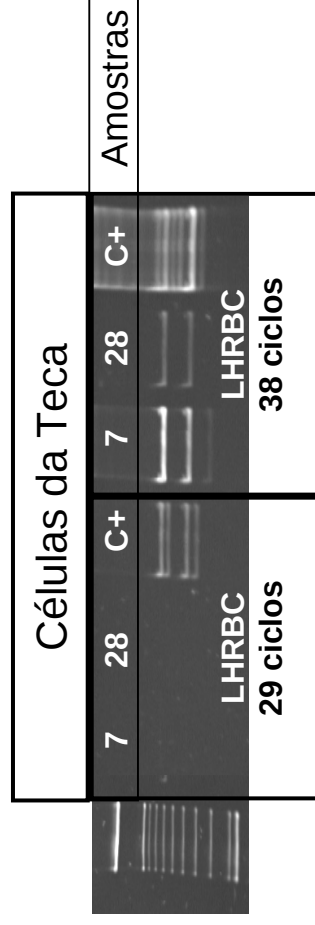


Fig. 15. Expressão do LHRBC em células da teca (painel superior) e da granulosa (painel inferior) com 38 ciclos de PCR. Todas as amostras (teca e granulosa) utilizadas nesta condição de 38 ciclos, foram negativas para a expressão do LHRBC nas condições validadas do RT-PCR semiquantitativo (29 ciclos). Como controles positivos (C+), foram utilizadas amostras de células da teca e da granulosa em que houve detecção da expressão do LHRBC com 29 ciclos de PCR (vide comparação, no painel superior, de 29 versus 38 ciclos em células da teca). Maiores detalhes das amostras encontram-se no Anexo 1 (células da teca) e no Anexo 2 (células da granulosa).

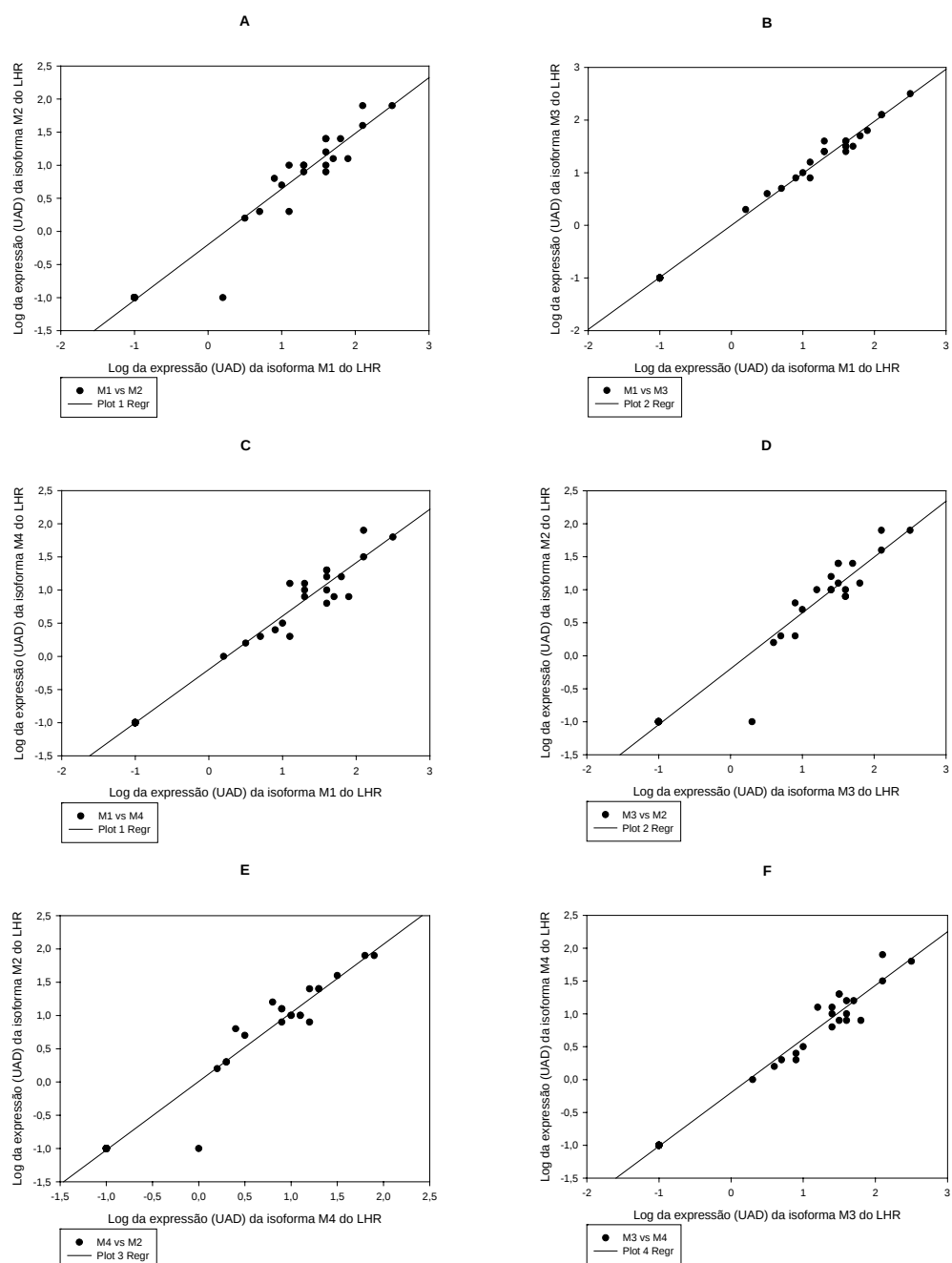


Fig. 16. Gráficos representando as análises de regressão linear, para a expressão das isoformas de mRNA do fragmento LHRBC nas células da granulosa. Os gráficos representam as comparações entre a isoforma M1 versus M2 (gráfico A), M3 (gráfico B) e M4 (gráfico C); isoforma M2 versus M3 (gráfico D) e M4 (gráfico E); e isoforma M3 versus M4 (gráfico F). Em todas as análises, o coeficiente r foi maior que 0,975 e P menor que 0,0001.

Na análise da expressão do LHRBC em células da granulosa de cultura, foi observado que o tratamento com 1 ou 10 ng de FSH (presente no meio de cultura das células), induziu a expressão do LHR em comparação ao controle (cultura sem FSH; vide Figura 17). Não houve diferença entre a concentração de 1 ou 10 ng de FSH no meio de cultura e a expressão do fragmento LHRBC (Figura 17). O padrão de expressão das isoformas (razão entre M1 e M2) observado no controle *in vivo* – todas as amostras de células da granulosa obtidas dos ovários oriundos de matadouro - foi diferente daquele observado *in vitro* (1 e 10 ng de FSH). Nas células em cultura, esta diferença foi devida à menor expressão da isoforma M1 associada à maior expressão da isoforma M2 ($0,8 \pm 0,14$; média $\pm$ EPM da razão M1:M2), quando comparada à expressão do controle *in vivo* ($3,5 \pm 0,66$; $P < 0,0001$).

Fig. 17. (Vide gráfico na próxima página) Gráfico da expressão das isoformas do fragmento LHRBC, em células da granulosa cultivadas com (1 ou 10 ng) ou sem FSH (0 ng; controle *in vitro*). O gráfico representa a média ($\pm$ EPM) dos valores relativos de expressão de LHRBC, para as 3 replicatas de cada tratamento (0, 1 e 10 ng de FSH; vide imagem do gel). Como controle positivo (Cont. +; vide imagem do gel) e de expressão *in vivo*, foi utilizada uma amostra conhecida para a expressão do LHRBC (células da teca de ovário oriundo de matadouro). Como controle negativo (Cont. -; vide imagem do gel), foi utilizada água ao invés de cDNA na reação de PCR. A expressão do LHRBC nas células cultivadas - induzida pelo tratamento com FSH – diferiu daquele observado nas amostras de células da granulosa de ovários oriundos de matadouro ($P < 0,0001$; vide detalhes no texto).

Efeito do FSH na expressão do LHR em células da granulosa cultivadas

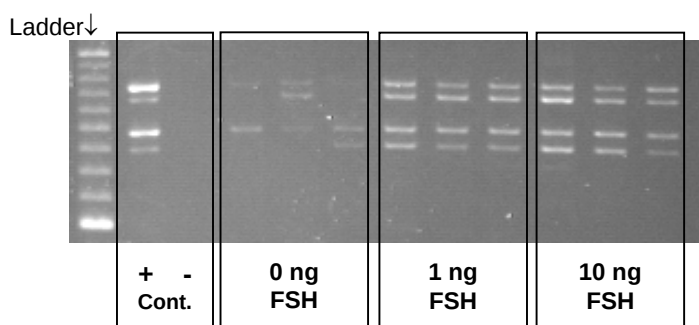
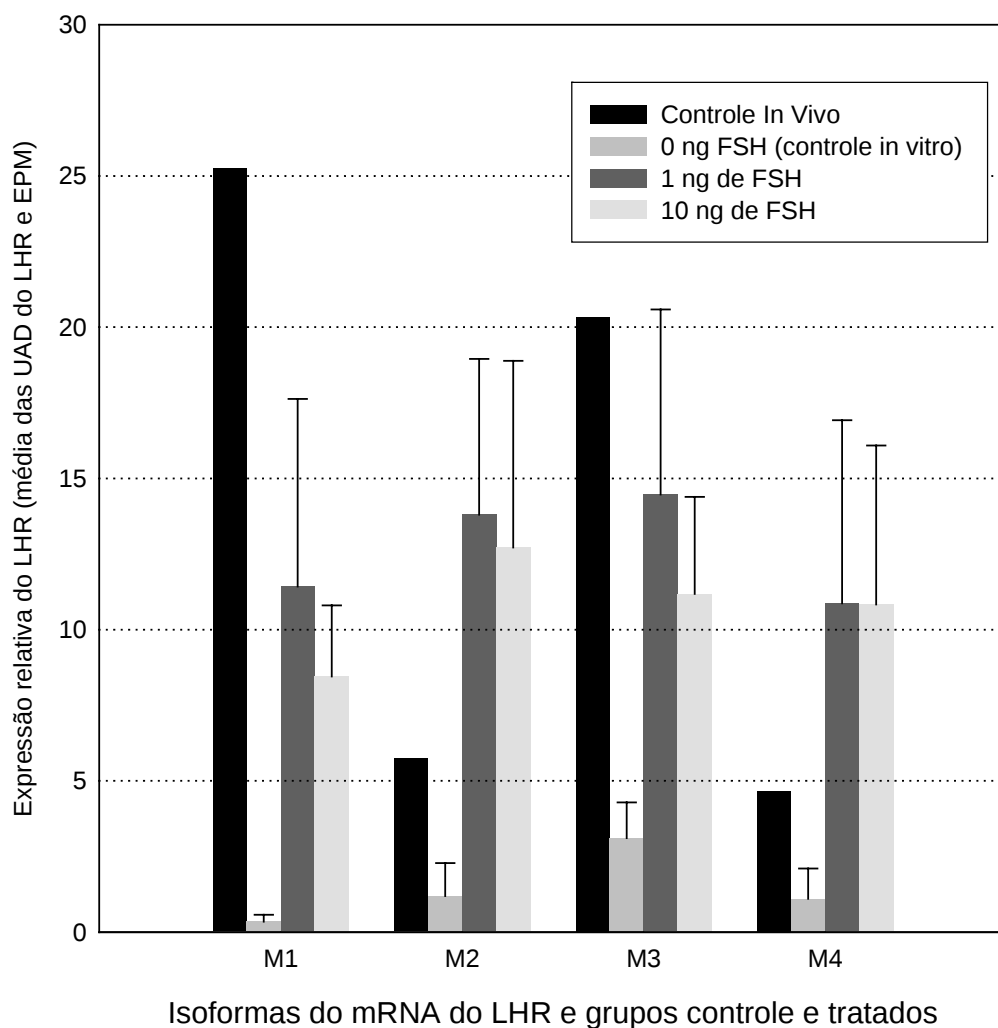


Figura 17. Vide legenda da figura na página anterior.

5. DISCUSSÃO

Neste estudo com o LHR bovino, foram detectados transcritos - alternativos à forma “full-length” – previamente descritos em ratos (ausência do exon 3; Aatsinki et al., 1992) e bovinos (ausência completa do exon 10 e/ou parcial do 11; Robert et al., 2003; Kawate, 2004), respectivamente para as regiões LHRA e LHRBC do gene. Apesar de ser uma possibilidade aventada, não foi possível estudar o gene do LHR de uma forma ininterrupta, isto é, desde o exon 2 até o final do exon 11 (LHRA + LHRBC). Com esta tática, seria possível detectar se as duas isoformas do LHRA interagem com as 4 isoformas, do LHRBC, de forma fatorial (2 x 4) ou excludente (cada uma das isoformas do LHRBC possuindo somente um tipo de isoforma do LHRA).

Em bovinos, não foram realizados estudos de ligação e ativação do LHR com a deleção do exon 3, assim, a capacidade funcional *in vivo* dessa isoforma é desconhecida. Entretanto, para as isoformas M3 e M4 do LHRBC (com a deleção parcial do exon 11), foi demonstrado ocorrer um transporte anômalo desses receptores truncados, de maneira a não atingirem a superfície celular e ficarem aprisionados no citoplasma (Kawate et al., 2002). Porém, é desconhecida a função da isoforma M3 aprisionada no citosol, uma vez que ela teria a capacidade de ligação preservada sem, no entanto, poder desencadear uma resposta celular (Robert et al., 2003; Kawate, 2004). Curiosamente, a isoforma M3 é uma das mais expressas pelas células foliculares (juntamente com a M1 “full-length”), possuindo uma abundância de transcritos muito acima da M2 e M4. Uma função de coadjuvante, na oligomerização dos complexos de LHR (“clusters”) observados na membrana citoplasmática após a ligação com o

hormônio (Roess et al., 2000a, b; Roess & Smith, 2003; Hunzicker-Dunn et al., 2003), poderia contribuir – ao menos parcialmente – para a explicação da abundância observada de mRNA da isoforma M3.

A expressão do LHR em células da granulosa foi, primeiramente, detectada em uma única amostra proveniente de folículos com 7 mm de diâmetro (16,7%, 1/6). Porém, na classe seguinte de diâmetro folicular (8 mm), houve expressão de LHR em 83,3% das amostras (5/6), sendo que o percentual de expressão do LHR permaneceu elevado (88,9%; 16/18) no restante das amostras (9 a 14 mm). Como não foi observada a expressão de LHR em nenhuma amostra de células da granulosa das classes de 5 e 6 mm de diâmetro folicular (0/7), poderia ser postulado que a aquisição de LHR, pelas células da granulosa, estaria ocorrendo entre 7 e 8 mm de diâmetro folicular. Esse momento corresponderia à divergência ou dominância folicular (Ginther et al., 2003) e ocorreria ao redor de 8,5 mm em novilhas da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*). Como a expressão do LHR estaria precedendo a divergência do diâmetro folicular em 0,5 mm (Beg et al., 2001), poderia ser considerado que, em novilhas de raça européia, o início da expressão do LHR estaria ocorrendo ao redor de 8 mm de diâmetro. Quando confrontado com os dados obtidos neste estudo (7 a 8 mm), duas discrepâncias podem ser salientadas, 1) apesar de raças distintas estarem sendo utilizadas na comparação (*Bos t. taurus* nos estudos de Ginther et al., 2003 e Beg et al., 2001, *versus* animais cruzados ou “anelorados” com alta percentagem de fenótipo/genótipo de *Bos t. indicus*, no presente estudo), foi obtido – de forma bastante semelhante - o mesmo diâmetro folicular para o início da expressão do LHR. Uma vez que o diâmetro

da divergência morfológica folicular, em novilhas puras da raça Nelore (*Bos t. indicus*), foi determinado como sendo ao redor de 6 mm (Sartorelli et al., 2005), seria esperada a expressão do LHR estar ocorrendo, neste estudo, também nas amostras das classes entre 5 e 6 mm; 2) Contudo, as técnicas utilizadas na obtenção do menor diâmetro folicular em que as células da granulosa iniciam a expressão do LHR foram distintas. Enquanto que o presente trabalho utilizou a abordagem semiquantitativa, o estudo de Beg et al. (2001) utilizou a quantitativa (PCR real-time). Diferenças na sensibilidade das técnicas poderiam explicar, ao menos em parte, a não detecção do LHR em classes de folículos menores que 7 mm de diâmetro.

Além disso, a análise de diferentes regiões do mRNA do LHR – entre este estudo e os demais citados acima – poderiam contribuir para as discrepâncias observadas (O'Shaughnessy et al., 1997). Entretanto, a expressão do LHR, nas células da granulosa antes da divergência folicular, não foi considerada como sendo um diferencial entre os futuros folículos dominante e subordinado (Fortune et al., 2001). Assim, a expressão do LHR em células da granulosa ≥ 7 mm de diâmetro – no presente estudo – poderia ser posterior à instalação da divergência folicular.

Não foi possível observar nas amostras (células da teca e da granulosa) quaisquer modulações entre as isoformas do LHRBC. Como regra geral, houve uma alta correlação positiva entre quaisquer duas isoformas comparadas (células da teca e da granulosa). A exceção parece ser a expressão da isoforma M4, nas células da teca, quando comparada às isoformas M1 ($r=0,21$ e $P=0,228$) e M3 ($r=0,35$ e $P=0,038$). Apesar de Abdennebi et al. (2002) ter

relatado, em ovinos, modulações de isoformas do LHR em acordo com as estações de verão (período de estro) e inverno (período de anestro), neste estudo não foram comparadas tais variáveis. Devido à obtenção dos folículos em fases aleatórias do ciclo estral bovino, a observação de que as isoformas do LHRBC não foram moduladas entre si, está de acordo com Bacich et al. (1999), que observou o mesmo durante o ciclo estral ovino.

Não houve diferença significativa na expressão do LHRBC nas células da teca, quando as classes de diâmetro folicular e de concentração intrafolicular de estradiol foram comparadas. De forma semelhante, Berisha et al. (2000), não observaram quaisquer alterações na expressão do LHR em células da teca de folículos bovinos. Nesse estudo, a expressão do LHR foi semelhante entre todas as classes de estradiol intrafolicular compreendidas entre $< 0,5$ e > 180 ng/mL no FF. Para as células da granulosa, houve diferenças significativas entre as classes de diâmetro folicular e de concentração intrafolicular de estradiol, e a expressão do LHRBC. Estas diferenças refletem – provavelmente – a virtual ausência de expressão do LHRBC nas amostras com diâmetro folicular < 7 mm, as quais também possuem baixas concentrações de estradiol no FF. Berisha et al. (2000) também observaram, em células da granulosa, diferenças semelhantes entre a expressão do LHR nas classes com as menores e maiores concentrações intrafoliculares de estradiol.

Não houve correlação entre a expressão de qualquer isoforma do LHRBC, nas células da teca, e as concentrações intrafoliculares de estradiol e de progesterona, além do diâmetro folicular. Contudo, nas células da

granulosa, houve uma alta correlação entre a expressão das isoformas do LHRBC e o diâmetro folicular ($P=0,0001$) e a concentração intrafolicular de progesterona ($P<0,003$). Conforme o folículo adquire a dominância e aumenta tanto a concentração de estradiol intrafolicular quanto o diâmetro, é esperado um aumento da expressão do LHR nas células da granulosa (Fortune et al., 2001; Ginther et al., 2003). Nesse sentido, o aumento da concentração de progesterona no fluido folicular - concomitante ao crescimento do folículo - foi aventado como sendo uma fonte de substrato para a síntese do estradiol. Esse progressivo aumento de transcritos do LHR, culminando nos folículos com diâmetros pré-ovulatórios, poderia ser um mecanismo para a instalação plena da capacidade ovulatória do folículo (Herrlich et al., 1996; Sartori et al., 2001).

Apesar do modelo clássico do estradiol ser um potente indutor da expressão do LHR nas células da granulosa bovina (Ginther et al., 2003), paradoxalmente, não houve correlação entre a expressão das isoformas do LHRBC – nas células da granulosa - e a concentração de estradiol no FF. Deve-se ter em mente que o término da expressão gênica da enzima (p.ex.; aromatase), pode preceder a diminuição na concentração do esteróide intrafolicular. Assim, genes particularmente sensíveis à morte celular - por apoptose - da granulosa, como o da aromatase e do LHR (Evans et al., 2004), poderiam ter a sua transcrição terminada antes que mudanças relevantes do estradiol, no fluido folicular, fossem detectáveis. Quando a atresia é iniciada, ou em fases ainda muito iniciais, o folículo poderia estar com uma diminuição da concentração intrafolicular do estradiol, em uma taxa muito mais lenta do que a diminuição da transcrição dos genes sensíveis à atresia (LHR e aromatase).

Nesta situação, poderia haver ainda concentrações moderadas do estradiol intrafolicular – porém diminuídas, quando comparadas com as concentrações anteriores muito mais elevadas – ainda que a transcrição gênica do LHR esteja ausente ou basal. Ao menos em uma amostra (nº 28), a atresia folicular poderia estar instalada, pois apesar do diâmetro (9 mm), a concentração do estradiol é baixa (19,5 ng/mL de FF) e a expressão do LHRBC não foi detectada tanto nas células da teca como nas da granulosa (apesar da detecção da GAPDH em ambos os tipos celulares).

A expressão do LHR foi detectada nas amostras negativas para o LHRBC, nas condições validadas, quando o número de ciclos de PCR foi aumentado e, conseqüentemente, a sensibilidade da reação. Com isso, mesmo em amostras negativas de células da granulosa de folículos de 5, 6 e 7 mm de diâmetro, foi possível detectar transcritos do LHRBC. Contudo, o significado fisiológico desse achado permanece desconhecido. Poderia ser que o início incipiente da transcrição do LHR (detectado mediante PCR real time por Beg et al., 2001), somente seria detectado pela técnica semiquantitativa quando o número de ciclos da condição validada fosse aumentado. Porém, caso essa possibilidade seja considerada, ainda permaneceria desconhecido o motivo da expressão do LHR, observada nessas condições, possuir um padrão tão distinto daquele observado nas condições validadas. Esse padrão discrepante pode ser genericamente descrito como, a perda da relação mantida entre as duas isoformas mais (M1 e M3) e menos expressadas (M2 e M4). Curiosamente, nas amostras de células da granulosa negativas para o LHRBC, de folículos com diâmetro e estradiol compatíveis com algum grau de atresia,

também foram detectados transcritos do LHR com o aumento do número de ciclos de PCR. Da mesma forma que o aventado para o início incipiente da transcrição, ao término da transcrição do gene do LHR (p.ex., devido à apoptose), poderia ocorrer um padrão atípico de expressão entre as isoformas.

Em células da granulosa de cultura, foi observado um padrão distinto de expressão do LHRBC, daquele detectado em células da teca e da granulosa obtidos diretamente de folículos bovinos. A origem dessas células em cultura (diâmetro do folículo que originou as células) poderia estar relacionada com esse padrão de expressão sendo que, células oriundas de folículos que estejam entre a divergência e a fase pré-ovulatória poderiam, teoricamente, produzir um padrão de expressão mais próximo do observado *in vivo*. Além disso, o próprio ambiente *in vitro* da cultura celular, poderia estar induzindo alterações (p.ex., epigenéticas) na expressão gênica do LHR como observado na produção *in vitro* de embriões bovinos (Young & Fairburn, 2000). O tratamento com FSH (1 ou 10 ng) induziu a expressão do LHRBC, nas células em cultura, com 2 a 3 vezes a magnitude observada no controle (sem FSH). Isto está de acordo com o modelo proposto por Ginther et al. (2003), em que o estímulo do FSH levaria ao aumento do estradiol que, por sua vez, induziria a expressão do LHR.

De forma adicional, em cultura de células da granulosa de ratas, o FSH foi eficaz em induzir o LHR, mediante o aumento na taxa de transcrição gênica deste (Shi & Segaloff, 1995). Porém, nesse mesmo estudo, o estradiol exógeno isoladamente não teve qualquer efeito na transcrição do LHR, embora tenha sido capaz de incrementar – de forma sinérgica – a expressão do LHR induzida

pelo FSH (Shi & Segaloff, 1995). Corroborando o papel primário do FSH, mas não do estradiol, na expressão do LHR em células da granulosa, Hampton et al. (2004) não observaram diferenças na abundância de mRNA para o LHR - em células da granulosa de folículos bovinos > 10mm – entre animais tratados somente com FSH ou com FSH e LH (após prévio tratamento com um agonista de GnRH). Embora tenha havido uma diferença significativa na concentração intrafolicular de estradiol, entre os grupos FSH+LH (790,7 ng/mL de FF) e FSH (259,0 ng/mL), a expressão do gene do LHR nas células da granulosa não diferiu – mediante hibridação *in situ* – entre os dois grupos (Hampton et al., 2004).

Outro mecanismo de indução da expressão do LHR em células foliculares seria o IGF-I. Em ratas, nas células da teca em estágios iniciais de diferenciação, o IGF-I sozinho pode estimular a expressão do mRNA do LHR e aumentar o número de sítios de ligação com o LH/hCG acoplados à produção de cAMP (Magoffin & Weitsman, 1994). Deste trabalho pode-se aventar que, caso o mesmo mecanismo ocorresse em células da granulosa, o IGF-I seria um dos responsáveis pelo início da expressão do gene do LHR, modelo este proposto por Fortune et al. (2001).

Nas células em cultura tratadas com 1 e 10 ng de FSH, houve um aumento significativo do estradiol produzido ($1,34 \pm 0,3$ e $0,98 \pm 0,28$, respectivamente) quando comparado ao controle ($0,08 \pm 0,03$). Estes dados suportam o sinergismo que deve ocorrer na indução primária da transcrição do LHR – pelo FSH – e aumento da estabilidade e/ou diminuição na degradação do mRNA do LHR, pelo estradiol e FSH.

No entanto, mesmo com o tratamento com FSH, o padrão de expressão *in vivo* das isoformas do LHRBC não foi obtido. Usualmente, a isoforma M2 é das menos expressadas *in vivo*, porém, com o tratamento de FSH nas culturas, esta isoforma foi transcrita tão ou mais que as demais isoformas (vide a razão M1:M2 na seção “Resultado”). Sistemas de cultura alternativos, das células da granulosa bovina, poderiam ser testados com um pré-tratamento de estradiol, FSH e IGF-I (sozinhos, em combinação fatorial ou todos juntos), antes do desafio com o LH exógeno. A concentração de cAMP no meio de cultura e o número de sítios de ligação com LH/hCG, poderiam fornecer evidências da funcionalidade do LHR expressado nas células. Além disso, a origem do folículo (diâmetro e fase do ciclo estral) deveria ser considerada para o delineamento de experimentos com células da granulosa bovina em cultura.

6. CONCLUSÃO

- 1) Os transcritos do LHR bovino, presentes nas células da teca e da granulosa, possuem sítios de “splicing” alternativo nos exons 3, 10 e 11;
- 2) Em células da granulosa, a expressão gênica do LHR somente foi detectada a partir de folículos com 7 mm de diâmetro;
- 3) Nas células da granulosa, houve uma correlação positiva entre o diâmetro folicular e a concentração de progesterona, no fluido folicular, e a expressão das isoformas de LHR. Não houve correlação entre a concentração intrafolicular de estradiol e a expressão das isoformas de LHR;
- 4) Nas células da teca, não houve correlação entre a expressão do LHR e a concentração intrafolicular de estradiol ou progesterona, bem como o diâmetro folicular;
- 5) Em cultura de células da granulosa, o tratamento com FSH foi eficaz em induzir a expressão do LHR, porém sem o padrão de expressão das isoformas observado em células obtidas *in vivo*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- 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. **Reproduction**, v.123, p.819-26, 2002.
- ALVAREZ, C.A., NARAYAN, P., HUANG, J., PUETT, D. Characterization of a region of the lutropin receptor extracellular domain near transmembrane helix 1 that is important in ligand-mediated signaling. **Endocrinology**, v.140, p.1775-82, 1999.
- ASBÓTH, G., PRICE, S.A., BELLINGER, J., LEDGER, W., BARLOW, D.H., BERNAL, A.L. Characterization of adenylyl cyclases in cultured human granulosa cells. **Reproduction**, v.121, p.217-28, 2001.
- 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.
- 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

* UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. **Normas para publicações da UNESP**. São Paulo: Editora UNESP, 1994. v.2: Referências Bibliográficas. BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS preview database**. Philadelphia, 1996. 468p.

- hormone receptor in the ovine ovary throughout the oestrous cycle. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.147, p.113-24, 1999.
- 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.
- 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.432-41, 2001.
- BERISHA, B., SCHAMS, D., KOSMANN, M., AMSELGRUBER, W., EINSPANIER, R. Expression and localisation 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.
- BERNARD, M.P., MYERS, R.V., MOYLE, W.R. Lutropins appear to contact two independent sites in the extracellular domain of their receptors. **Biochem. J.**, v.335, p.611-7, 1998.
- BODEK, G., RAHMAN, N.A., ZALESKA, M., SOLIYMANI, R., LANKINEN, H., HANSEL, W., HUHTANIEMI, I., ZIECIK, A.J. A novel approach of targeted ablation of mammary carcinoma cells through luteinizing hormone receptors using Hecate-CG β conjugate. **Breast Cancer Res. Treat.**, v.79, p.1-10, 2003.
- 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.499-12, 1996.
- 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. **Reproduction**, v.129, p.453-61, 2005.

- CALDER, M.D., CAVENEY, A.N., SMITH, L.C., WATSON, A.J. Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation in vitro. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v.1, p.1-12, 2003.
- CALDER, M.D., CAVENEY, A.N., SIRARD, M-A., WATSON, A.J. Effect of serum and cumulus cell expansion on marker gene transcripts in bovine cumulus-oocyte complexes during maturation in vitro. **Fertil. Steril.**, v.83, p.1077-85, 2005.
- 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.
- FIELDS, M.J., SHEMESH, M. Extragonadal luteinizing hormone receptors in the reproductive tract of domestic animals. **Biol. Reprod.**, v.71, p.1412-8, 2004.
- 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.
- GALET, C., ASCOLI, M. The differential binding affinities of the luteinizing hormone (LH)/choriogonadotropin receptor for LH and choriogonadotropin are dictated by different extracellular domain residues. **Mol. Endocrinol.**, v.19, p.1263-76, 2005.
- GINTHER, O.J., BERGFELT, D.R., BEG, M.A., KOT, K. Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. **Biol. Reprod.**, v.64, p.197-205, 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.239-57, 2003.

- GROMOLL, J., EIHOLZER, U., NIESCHLAG, E., SIMONI, M. Male hypogonadism caused by homozygous deletion of exon 10 of the luteinizing hormone (LH) receptor: differential action of human chorionic gonadotropin and LH. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.85, p.2281-6, 2000.
- GROMOLL, J., WISTUBA, J., TERWORT, N., GODMANN, M., MÜLLER, T., SIMONI, M. A new subclass of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor lacking exon 10 messenger RNA in the New World monkey (*platyrrhini*) lineage. **Biol. Reprod.**, v.69, p.75-80, 2003.
- GUTIÉRREZ, C.G., CAMPBELL, B.K., WEBB, R. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. **Biol. Reprod.**, v.56, p.608-16, 1997.
- HÄMÄLÄINEN, T., KERO, J., POUTANEN, M., HUHTANIEMI, I. Transgenic mice harboring murine luteinizing hormone receptor promoter/ β -galactosidase fusion genes: different structural and hormonal requirements of expression in the testis, ovary, and adrenal gland. **Endocrinology**, v.143, p.4096-103, 2002.
- HAMPTON, J.H., BADER, J.F., LAMBERSON, W.R., SMITH, M.F., YOUNGQUIST, R.S., GARVERICK, H.A. Gonadotropin requirements for dominant follicle selection in GnRH agonist-treated cows. **Reproduction**, v.127, p.695-703, 2004.
- HERRLICH, A., KÜHN, B., GROSSE, R., SCHMID, A., SCHULTZ, G., GUDERMANN, T. Involvement of G_s and G_i proteins in dual coupling of the luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phospholipase C. **J. Biol. Chem.**, v.271, p.16764-72, 1996.

- HORVAT, R.D., NELSON, S., CLAY, C.M., BARISAS, B.G., ROESS, D.A. Intrinsically fluorescent luteinizing hormone receptor demonstrates hormone-driven aggregation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.255, p.382-5, 1999.
- 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.
- HUNZICKER-DUNN, M., BARISAS, G., SONG, J., ROESS, D.A. Membrane organization of luteinizing hormone receptors differs between actively signaling and desensitized receptors. **J. Biol. Chem.**, v.278, p.42744-9, 2003.
- KAWATE, N., TAMADA, H., INABA, T., SAWADA, T. Expression of a cloned full-length cDNA encoding bovine luteinizing hormone receptor in COS-7 cells. **J. Reprod. Dev.**, v.48, p.531-8, 2002.
- 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.
- LAREAU, L.F., GREEN, R.E., BHATNAGAR, R.S., BRENNER, S.E. The evolving roles of alternative splicing. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v.14, p.273-82, 2004.
- LAUE, L., CHAN, W-Y., HSUEH, A.J.W., KUDO, M., HSU, S.Y., WU, S-M., BLOMBERG, L., CUTLER JR., G.B. Genetic heterogeneity of constitutively activating mutations of the human luteinizing hormone receptor in familial male-limited precocious puberty. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.92, p.1906-10, 1995.
- LEWIN, B. **Genes VIII**. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall, Pearson Education, Inc., 2004. chap.2; chap.28.
- LICHT, P., VON WOLFF, M., BERKHOLZ, A., WILDT, L. Evidence for cycle-dependent expression of full-length human chorionic gonadotropin/luteinizing

- hormone receptor mRNA in human endometrium and deciduas. **Fertil. Steril.**, v.79, p.718-23, 2003.
- MAGOFFIN, D.A., WEITSMAN, S.R. Insulin-like growth factor-I regulation of luteinizing hormone (LH) receptor messenger ribonucleic acid expression and LH-stimulated signal transduction in rat ovarian theca-interstitial cells. **Biol. Reprod.**, v.51, p.766-75, 1994.
- MAMLUK, R., WOLFENSON, D., MEIDAN, R. LH receptor mRNA and cytochrome P450 side-chain cleavage expression in bovine theca and granulosa cells luteinized by LH or forskolin. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.15, p.103-14, 1998.
- MANIKKAM, M., CALDER, M.D., SALFEN, B.E., YOUNGQUIST, R.S., KEISLER, D.H., GARVERICK, H.A. Concentrations of steroids and expression of messenger RNA for steroidogenic enzymes and gonadotropin receptors in bovine ovarian follicles of first and second waves and changes in second wave follicles after pulsatile LH infusion. **Anim. Reprod. Sci.**, v.67, p.189-203, 2001.
- MATTICK, J.S. Páginas ocultas no livro da vida. **Sci. Am. Bras.**, v.30, p.55-61, 2004.
- MENON, K.M.J., MUNSHI, U.M., CLOUSER, C.L., NAIR, A.K. Regulation of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor expression: a perspective. **Biol. Reprod.**, v.70, p.861-6, 2004.
- MIHM, M., BLEACH, E.C.L. Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v.78, p.217-37, 2003.
- MISHRA, S., LEI, Z.M., RAO, C.V. A novel role of luteinizing hormone in the embryo development in cocultures. **Biol. Reprod.**, v.68, p.1455-62, 2003.
- MÜLLER, T., GROMOLL, J., SIMONI, M. Absence of exon 10 of the human luteinizing hormone (LH) receptor impairs LH, but not human chorionic gonadotropin action. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.88, p.2242-9, 2003.

- 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.**, v.18, p.1461-70, 2004.
- NOGUEIRA, M.F.G., BURATINI Jr, J., BARROS, C.M. Does LH plus hCG, used to induce ovulation in superstimulated cows, improve pregnancy rates after transfer of embryos that are not excellent? **Reprod. Fertil. Dev.**, v.17, p.232-3, 2005a.
- NOGUEIRA, M.F.G., BURATINI Jr, J., BARROS, C.M. Tratamento com hCG e LH, como indutores da ovulação em doadoras superestimuladas da raça Nelore, não altera a produção embrionária ou a taxa de prenhez. **Acta Scientiae Veterinariae**, 2005b (abstract, accepted).
- NUTTINCK, F., CHARPIGNY, G., MERMILLOD, P., LOOSFELT, H., MEDURI, G., FRERET, S., GRIMARD, B., HEYMAN, Y. Expression of components of the insulin-like growth factor system and gonadotropin receptors in bovine cumulus-oocyte complexes during oocyte maturation. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.27, p.179-95, 2004.
- O'SHAUGHNESSY, P.J., McLELLAND, D., McBRIDE, M.W. Regulation of luteinizing hormone-receptor and follicle-stimulating hormone-receptor messenger ribonucleic acid levels during development in the neonatal mouse ovary. **Biol. Reprod.**, v.57, p.602-8, 1997.
- PATSOULA, E., LOUTRADIS, D., DRAKAKIS, P., KALLIANIDIS, K., BLETSA, R., MICHALAS, S. Expression of mRNA for the LH and FSH receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos. **Reproduction**, v.121, p.455-61, 2001.
- PATSOULA, E., LOUTRADIS, D., DRAKAKIS, P., MICHALAS, L., BLETSA, R., MICHALAS, S. Messenger RNA expression for the follicle-stimulating hormone

- receptor and luteinizing hormone receptor in human oocytes and preimplantation-stage embryos. **Fertil. Steril.**, v.79, p.1187-93, 2003.
- PERERA-MARIN, G., MURCIA, C., ROJAS, S., HERNÁNDEZ-CERÓN, J., GONZÁLEZ-PADILLA, E. Pattern of circulating luteinizing hormone isoforms during the estrous and luteal phases in Holstein heifers. **Anim. Reprod. Sci.**, v.86, p.53-69, 2005.
- PIERCE, K.L., PREMONT, R.T., LEFKOWITZ, R.J. Seven-transmembrane receptors. **Mol. Cell Biol.**, v.3, p.639-50, 2002.
- REINHOLZ, M.M., ZSCHUNKE, M.A., ROCHE, P.C. Loss of alternatively spliced messenger RNA of the luteinizing hormone receptor and stability of the follicle-stimulating hormone receptor messenger RNA in granulosa cell tumors of the human ovary. **Gynecol. Oncol.**, v.79, p.264-71, 2000.
- 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. **Reproduction**, v.125, p.437-46, 2003.
- ROESS, D.A., BRADY, C.J., BARISAS, B.G. Biological function of the LH receptor is associated with slow receptor rotational diffusion. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1464, p.242-50, 2000a.
- ROESS, D.A., HORVAT, R.D., MUNNELLY, H., BARISAS, B.G. Luteinizing hormone receptors are self-associated in the plasma membrane. **Endocrinology**, v.141, p.4518-23, 2000b.
- ROESS, D.A., SMITH, S.M.L. Self-association and raft localization of functional luteinizing hormone receptors. **Biol. Reprod.**, v.69, p.1765-70, 2003.

- SALVADOR, L.M., MAIZELS, E., HALES, D.B., MIYAMOTO, E., YAMAMOTO, H., HUNZICKER-DUNN, M. Acute signaling by the LH receptor is independent of protein kinase C activation. **Endocrinology**, v.143, p.2986-94, 2002.
- SAMBROOK, J., RUSSEL, D.W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3.ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. 3v.
- SAINT-DIZIER, M., CHOPINEAU, M., DUPONT, J., COMBARNOUS, Y. Expression of the full-length and alternatively spliced equine luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor mRNAs in the primary corpus luteum and fetal gonads during pregnancy. **Reproduction**, v.128, p.219-28, 2004a.
- SAINT-DIZIER, M., FOULON-GAUZE, F., LECOMPTE, F., COMBARNOUS, Y., CHOPINEAU, M. Cloning and functional expression of the equine luteinizing hormone/chorionic gonadotrophin receptor. **J. Endocrinol.**, v.183, p.551-9, 2004b.
- 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.2382-94, 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.1403-9, 2001.
- SHEMESH, M. Actions of gonadotrophins on the uterus. **Reproduction**, v.121, p.835-42, 2001.
- SHI, H., SEGALOFF, D.L. A role for increased lutropin/choriogonadotropin receptor (LHR) gene transcription in the follitropin-stimulated induction of the LHR in granulosa cells. **Mol. Endocrinol.**, v.9, p.734-44, 1995.
- SILVA, J.M., PRICE, C.A. Effect of follicle-stimulating hormone on steroid secretion and messenger ribonucleic acids encoding cytochromes P450 aromatase and

- cholesterol side-chain cleavage in bovine granulosa cells in vitro. **Biol. Reprod.**, v.62, p.186-91, 2000.
- SOUMANO, K., LUSSIER, J.G., PRICE, C.A. Levels of messenger RNA encoding ovarian receptors for FSH and LH in cattle during superovulation with equine chorionic gonadotrophin versus FSH. **J. Endocrinol.**, v.156, p.373-8, 1998.
- TAMURA, K., KAWAGUCHI, T., KOGO, H. Interleukin-6 inhibits the expression of luteinizing hormone receptor mRNA during the maturation of cultured rat granulosa cells. **J. Endocrinol.**, v.170, p.121-7, 2001.
- TEIXEIRA, A.B. **Regulação da expressão dos receptores de fatores de crescimento fibroblásticos 3c e 4 (FGFR-3c e FGFR-4) em folículos antrais bovinos**. Botucatu, 2004. 85f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- TSAI, S.J., KOT, K., GINTHER, O.J., WILTBANK, M.C. Temporal gene expression in bovine corpora lutea after treatment with PGF_{2α} based on serial biopsies *in vivo*. **Reproduction**, v.121, p.905-13, 2001.
- TSAI-MORRIS, C.H., GENG, Y., BUCZKO, E., DUFAU, M.L. A novel human luteinizing hormone receptor gene. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.83, p.288-91, 1998.
- 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.951-7, 1995.
- YOUNG, L.E., FAIRBURN, H.R. Improving the safety of embryo technologies: possible role of genomic imprinting. **Theriogenology**, v.53, p.627-48, 2000.

ZHANG, F.P., KERO, J., HUHTANIEMI, I. The unique exon 10 of the human luteinizing hormone receptor is necessary for expression of the receptor protein at the plasma membrane in the human luteinizing hormone receptor, but deleterious when inserted into the human follicle-stimulating hormone receptor. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.142, p.165-74, 1998.

ANEXOS

Amostra	RT	Ø mm	E ₂	P ₄	Folículo	M1/ GAPDH	M2/ GAPDH	M3/ GAPDH	M4/ GAPDH
1	656	5	2,79	12,12	185	242,55	63,09	212,76	45,70
2	658	5	3,38	16,23	171	204,83	55,61	146,05	33,64
3	660	5	5,00	16,00	167	163,51	43,33	150,82	33,99
4	662	6	12,68	26,43	201	90,04	60,08	87,51	54,60
5	664	7	40,41	18,62	170	116,12	31,82	73,55	14,36
6	666	7	49,50	10,35	192	146,62	44,11	134,26	31,72
7	668	7	123,00	20,12	174	2,77	0,00	0,63	0,00
8	670	8	106,00	16,45	122	147,45	38,41	118,52	26,99
9	672	6	4,26	20,65	196	280,30	75,10	257,94	42,36
10	674	6	4,70	10,87	169	137,32	91,39	109,34	52,61
11	676	6	15,39	29,06	200	78,55	33,58	88,19	30,40
12	678	7	8,52	19,31	183	37,64	39,17	41,16	35,68
13	680	8	44,60	25,86	145	65,27	36,44	61,58	22,19
14	682	10	22,10	62,47	101	190,77	78,37	132,66	34,98
15	684	10	396,48	35,29	139	89,47	44,39	93,73	50,45
16	686	10	4084,00	33,90	150	141,10	42,33	151,20	37,77
17	688	7	0,66	22,58	173	46,13	28,18	49,13	29,24
18	690	7	2,74	40,84	162	172,95	44,57	92,03	11,88
19	692	8	16,90	32,95	106	48,69	32,41	51,89	28,50
20	694	8	17,90	17,19	142	23,09	19,61	22,96	18,92
21	696	10	38,50	16,20	129	122,05	46,86	119,48	32,91
22	698	11	21,20	77,11	105	35,56	7,77	30,17	4,83
23	700	13	145,00	---	13	46,78	47,00	45,17	42,39
24	702	13	1010,00	30,51	138	60,99	12,64	71,99	14,81
25	704	8	0,81	31,02	143	44,04	27,39	53,20	22,75
26	706	8	1,72	21,25	126	206,72	63,63	162,06	36,75
27	708	9	17,20	28,25	132	146,92	60,94	119,04	62,94
28	710	9	19,50	38,96	155	0,00	0,00	0,00	0,00
29	712	11	25,50	34,00	161	190,68	14,64	138,02	6,31
30	714	11	36,00	73,80	110	103,87	106,78	93,52	90,50
31	716	14	1050,00	28,35	141	101,59	26,03	103,08	24,48
32	718	9	298,00	---	97	111,22	34,78	115,10	27,48
33	719	11	365,50	---	16	112,14	52,50	94,59	53,55
34	720	9	3,25	33,10	144	147,31	33,63	84,79	15,43
35	722	9	4,60	18,62	136	74,21	23,57	45,07	8,08
36	724	10	8,65	28,43	133	64,49	55,00	40,44	33,17
37	726	10	13,00	23,90	152	66,71	42,87	48,75	34,67
38	728	11	60,50	27,93	124	132,90	58,41	108,43	49,84
39	730	12	23,30	31,53	134	54,73	44,31	55,63	38,03
40	732	11	156,00	---	81	144,54	41,01	101,84	19,76
41	-	Controle Negativo							

Anexo 1. Amostras de cDNA utilizadas para a amplificação do LHRBC (M1, M2, M3 e M4) e da GAPDH, provenientes de células da teca. A última amostra (Nº 41) não contém cDNA, sendo o controle negativo da reação de PCR.

Amostra	RT	Ø mm	E ₂	P ₄	Folículo	M1/ GAPDH	M2/ GAPDH	M3/ GAPDH	M4/ GAPDH
1	657	5	2,79	12,12	185	0,00	0,00	0,00	0,00
2	659	5	3,38	16,23	171	0,00	0,00	0,00	0,00
3	661	5	5,00	16,00	167	0,00	0,00	0,00	0,00
4	663	6	12,68	26,43	201	0,00	0,00	0,00	0,00
5	665	7	40,41	18,62	170	4,59	1,96	5,51	2,01
6	667	7	49,50	10,35	192	0,00	0,00	0,00	0,00
7	669	7	123,00	20,12	174	0,00	0,00	0,00	0,00
8	671	8	106,00	16,45	122	3,33	1,49	4,05	1,52
9	673	6	4,26	20,65	196	0,00	0,00	0,00	0,00
10	675	6	4,70	10,87	169	0,00	0,00	0,00	0,00
11	677	6	15,39	29,06	200	0,00	0,00	0,00	0,00
12	679	7	8,52	19,31	183	0,00	0,00	0,00	0,00
13	681	8	44,60	25,86	145	22,13	9,07	24,20	10,53
14	683	10	22,10	62,47	101	42,56	8,40	36,99	14,93
15	685	10	396,48	35,29	139	36,40	24,05	30,03	22,18
16	687	10	4084,00	33,90	150	21,23	10,70	26,39	12,58
17	689	7	0,66	22,58	173	0,00	0,00	0,00	0,00
18	691	7	2,74	40,84	162	0,00	0,00	0,00	0,00
19	693	8	16,90	32,95	106	12,54	9,02	16,69	12,54
20	695	8	17,90	17,19	142	1,75	0,11	1,92	0,91
21	697	10	38,50	16,20	129	57,18	24,58	49,18	15,98
22	699	11	21,20	77,11	105	318,77	78,48	313,36	59,95
23	701	13	145,00	---	13	86,36	61,58	76,64	56,90
24	703	13	1010,00	30,51	138	44,14	9,74	43,88	10,85
25	705	8	0,81	31,02	143	0,00	0,00	0,00	0,00
26	707	8	1,72	21,25	126	36,52	14,23	24,72	6,93
27	709	9	17,20	28,25	132	13,41	2,01	8,59	2,00
28	711	9	19,50	38,96	155	0,00	0,00	0,00	0,00
29	713	11	25,50	34,00	161	86,59	13,69	66,74	8,09
30	715	11	36,00	73,80	110	126,86	78,49	114,69	82,06
31	717	14	1050,00	28,35	141	128,58	39,76	122,16	30,46
32	721	9	3,25	33,10	144	54,75	11,88	31,10	8,54
33	723	9	4,60	18,62	136	0,00	0,00	0,00	0,00
34	725	10	8,65	28,43	133	7,34	5,84	7,10	2,47
35	727	10	13,00	23,90	152	10,12	5,23	9,95	3,43
36	729	11	60,50	27,93	124	22,30	8,78	38,34	7,70
37	731	12	23,30	31,53	134	40,24	25,95	35,19	19,10
38	-	Controle Negativo							

Anexo 2. Amostras de cDNA utilizadas para a amplificação do fragmento LHRBC (M1, M2, M3 e M4) e da GAPDH, provenientes de células da granulosa. A última amostra (Nº 38) não contém cDNA, sendo o controle negativo da reação de PCR.

NOGUEIRA, M.F.G. **Gene expression of the luteinizing hormone receptor (LHR), in theca and granulosa cells of bovine antral follicles.** Botucatu, 2005. 96p. Thesis (PhD in Medicine Veterinary) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

Growth of dominant follicle in the absence of circulating FSH and the events following the LH surge that culminate in ovulation, are dependent on the interaction between LH and its receptor (LHR). Four LHR alternative transcripts were described in theca and granulosa cells from bovine follicles. Only two of them can be translated to functional proteins (receptors coupled with G protein) with different affinities to their ligands. In humans and marmosets, the full-length isoform has affinity to both LH and hCG molecules, whereas the isoform with deletion of only exon 10 has affinity to hCG exclusively. Additionally, isoforms with deletion of exon 3 were observed in rats, although no previous report have investigated this region of the bovine gene. The objective of this study was to characterize the pattern of gene expression of the LHR in theca and granulosa cells from bovine antral follicles. Additionally, LHR expression was determined in cultured granulosa cells under FSH treatment. From ovaries collected in abattoir, antral follicles were dissected (5 to 14mm of diameter), and samples of theca and granulosa cells were obtained to total RNA extraction (Trizol protocol). Steroids concentrations in the follicular fluid were determined by RIA. Gene expression of LHR was measured by semiquantitative RT-PCR with specific primers to amplify part of extracellular region (LHRA; primers annealing on exons 2 and 9) and the fragment from the end of extracellular region, including the transmembrane domain and finishing near the end of intracellular region (LHRBC; primers annealing on exons 9 and 11). As internal control of the PCR, it was used GAPDH expression. Cultured granulosa cells were treated with 0, 1 or 10 ng of FSH (3 replicates each dose). As *in vivo* and positive control, theca cell sample was utilized to comparison. Four isoforms were detected from LHRBC fragment: M1 (full-length), M2 (with a deletion of exon 10), M3 (with deletion of part of exon 11), and M4 (with deletions in exon 10 and

part of 11). There was not correlation ($P>0.05$) between expression of LHR isoforms in theca cells and estradiol or progesterone concentration, or follicular diameter. However, progesterone concentration and follicular diameter were positively correlated with LHR expression in granulosa cells, although there is not correlation between estradiol concentration and LHR expression. The correlation was observed in the four isoforms amplified from LHRBC fragment (Mixed Procedure, SAS Institute, Cary, NC; $P<0.05$). Thirty seven granulosa cell samples were analyzed, from follicles with diameter of 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 and 14mm ($n=3$; 4; 6; 6; 4; 6; 4; 1; 2 and 1, respectively). Expression of isoforms from fragment LHRBC was observed in granulosa cells from follicles with 7mm. In 6 follicles with 7mm only one (16.7%) expressed LHR in granulosa cells, whereas most of follicles ≥ 8 mm expressed LHR (87.5%, 21/24). No LHR isoforms were detected in granulosa cells from follicles ($n=7$) with 5 or 6 mm. In the amplicons resulting from LHRA fragment amplification, it was detected the expression of an alternative transcript with deletion of the entire exon 3 (i.e., 75 nt), as previously described in rats. In cultured granulosa cells (without FSH treatment), it was observed only a weak LHR expression (*in vitro* control) when compared with *in vivo* control (theca cells sample). The treatment with FSH (1 or 10ng) was effective to induce LHR expression in cultured granulosa cells, however with a different pattern of expression (lower M1/M2 ratio) when compared to *in vivo* control. It is concluded that, in granulosa cells from follicles with diameter ≥ 7 mm, the gene expression of the LHR was positively correlated to follicular diameter and progesterone concentration in the follicular fluid. Treatment with FSH was effective to induce LHR expression in cultured granulosa cells, however with a different pattern than *in vivo* control. Additionally, sites of alternative splicing were detected in exons 3, 10 and 11 from bovine LHR gene.

Keywords: Bovine; Gene expression; Luteinizing hormone receptor; LHR; Antral follicles; RT-PCR.