

**EFEITO DA PROGESTERONA NA EXPRESSÃO DO RNA_m DO
RECEPTOR DE LH E ENZIMAS ESTEROIDOGÊNICAS
REGULADORAS DO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR EM
CÉLULAS DA GRANULOSA DE NOVILHAS NELORE**

HENRIQUE PEDRO DIAS

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do título
de Mestre.

BOTUCATU – SP

DEZEMBRO - 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

EFEITO DA PROGESTERONA NA EXPRESSÃO DO RNA_m DO
RECEPTOR DE LH E ENZIMAS ESTEROIDOGÊNICAS
REGULADORAS DO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR EM
CÉLULAS DA GRANULOSA DE NOVILHAS NELORE

HENRIQUE PEDRO DIAS

Médico Veterinário

Orientador: Prof. Ass. Dr. José Luiz Moraes Vasconcelos

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do título
de Mestre.

BOTUCATU – SP

DEZEMBRO – 2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP -
FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

D541e Dias, Henrique Pedro, 1990-
 Efeito da progesterona na expressão do RNAm do receptor
 de LH e enzimas esteroidogênicas reguladoras do desenvolvi-
 mento folicular em células da granulosa de novilhas Nelore
 / Henrique Pedro Dias. - Botucatu: [s.n.], 2015
 vi, 69 f. : grafs. color., ils. color., tabs.

 Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu,
 2015

 Orientador: José Luiz Moraes Vasconcelos
 Inclui bibliografia

 1. Nelore (Zebu) - Reprodução. 2. Ciclo estral. 3. Pro-
 gesterona. I. Vasconcelos, José Luiz Moraes. II. Universi-
 dade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de
 Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
 III. Título.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre comigo, me ajudando em todas etapas de minha vida.

À minha família por todo amor, dedicação e por sempre terem me dado excelentes oportunidades de estudo.

Ao Prof. Zequinha pelos ensinamentos e companheirismo.

Aos meus amigos e à minha namorada pelo incentivo e apoio.

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio ao projeto por meio de bolsa ao aluno Henrique Pedro Dias do período de 01/08/2013 a 28/02/2014.

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio ao projeto por meio de bolsa ao aluno Henrique Pedro Dias do período de 01/03/2014 a 31/10/2014. Processo n° 2013/17171-8

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
SUMÁRIO DE TABELAS.....	v
SUMÁRIO DE FIGURAS.....	vi
CAPÍTULO 1.....	1
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	2
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Progesterona em Protocolos de IATF.....	3
2.2. Progesterona e o LH.....	5
2.3. Antagonista de GnRH e hipótese LH – LHR	7
2.4. Desenvolvimento folicular e Expressão gênica.....	8
2.5. Modelo “Duas células, dois hormônios”	9
2.6. Expressão de 3 β -HSD e LHR	11
3. REFERÊNCIAS.....	13
CAPÍTULO 2.....	19
RESUMO.....	20
ABSTRACT	21
1. INTRODUÇÃO.....	22
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3. RESULTADOS.....	32
4. DISCUSSÃO.....	47
5. CONCLUSÃO.....	62
6. REFERÊNCIAS	63
CAPÍTULO 3	68
CONSIDERAÇÕES GERAIS E IMPLICAÇÕES.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

- 3 β -HSD - 3 β hidroxí-esteroide-desidrogenase
- BE – Benzoato de Estradiol
- CL – Corpo Lúteo
- CIDR1 – Implante intravaginal de progesterona novo
- CIDR3 – Implante intravaginal de progesterona previamente utilizado por 18 dias.
- E2 – Estradiol
- eCG – Gonadotrofina Coriônica equina
- ECP – Cipionato de Estradiol
- FSH – Hormônio Folículo Estimulante
- FSHR- Receptor de FSH
- GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofina
- IA – Inseminação Artificial
- IATF – Inseminação Artificial em Tempo Fixo
- IGF-1 – Insulin like Growth Factor 1 (Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1)
- IGFBP – Insulin like Growth Factor Building Protein
- LH – Hormônio Luteinizante
- LHR – Receptor de Hormônio Luteinizante
- P4 – Progesterona
- P450arom – P450 aromatase
- P450scc – P450 side chain cleavage (P450 cadeia lateral de clivagem do colesterol)
- PAPP-A – Pregnancy Associate Protein A (Proteína Associada à Gestação - A)
- PGF – Prostaglandina
- RNA_m – RNA mensageiro
- RT-PCR – Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
- Sg – Colheita de sangue
- StAR – Steroidogeneses Acute Regulatory protein (Proteína aguda reguladora da esteroidogênese)
- US – Ultrassom

SUMÁRIO DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Genes alvo, sequências e tamanho.....	28
Tabela 2 – Efeito da Duração – Modelo 1.....	33
Tabela 3 – Efeito da Progesterona – Modelo 1.....	35
Tabela 4 – Aromatase: Diâmetro Folicular x Duração.....	38
Tabela 5 – Efeito do Proestro – Modelo 2.....	40
Tabela 6 – Efeito da progesterona – Modelo 2 – Mesma duração.....	42
Tabela 7 – Correlação P4 x FD	45
Tabela 8 – Correlação P4 e expressão gênica	45
Tabela 9 – Correlação FD e expressão gênica	46
Tabela 10 - Correlação entre StAR e outros genes.....	59
Tabela 11 – Correlação StAR com FD, IGF-1 e E2.....	59

SUMÁRIO DE FIGURAS

	Página
Figura1 – Padrão de secreção de LH para tratamentos com diferentes níveis de progesterona (Roberson et al., 1989).....	6
Figura 2 – Biosíntese de esteróide pelo ovário (Drummond., 2006).....	9
Figura 3 – Protocolo de pré-sincronização.....	24
Figura 4 – Grupos experimentais – Duração x P4 - Modelo 1.....	25
Figura 5 – Grupos experimentais – Proestro x P4 – Modelo 2.....	26
Figura 6 – Correlação progesterona e LHR – Modelo 1.....	36
Figura 7 – Correlação progesterona e LHR – Grupos D5 e D6.....	36
Figura 8 – Correlação LHR e Folículo Dominante – Modelo 1	37
Figura 9 – Correlação aromatase e progesterona – Modelo 1	37
Figura 10 – Correlação aromatase e FD – Modelo 1	38
Figura 11 – Correlação progesterona e LHR – Modelo 2	43
Figura 12 – Correlação LHR e diâmetro folicular	43
Figura 13 – Correlação aromatase e progesterona – Modelo 2	44
Figura 14 – Correlação aromatase e diâmetro folicular – Modelo 2	44
Figura 15 - Modelo esquemático da seleção de genes envolvidos na biossíntese de colesterol e esteroidogênese (Walsh et al., 2012).....	58

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

INTRODUÇÃO

Diversos trabalhos têm relacionado menor taxa de prenhez na IATF em bovinos de corte (*Bos indicus*) a efeitos negativos de altas concentrações de progesterona durante protocolos de sincronização da ovulação (Dias et al., 2009; Peres et al., 2009; Meneguetti et al., 2009). Foi proposto que alta concentração de progesterona diminui a frequência dos pulsos de LH, limitando o desenvolvimento do folículo dominante (*Bos taurus* - Pfeifer et al., 2009; *Bos indicus* - Cipriano et al., 2011), o que resulta em folículos de menor diâmetro na IATF (Dias et al., 2009; Peres et al., 2009), e com menor concentração de estradiol pré IA e de progesterona após a IATF (Peres et al., 2009; Vasconcelos et al., 2001).

A administração de estradiol exógeno tem aumentado a fertilidade em novilhas na IATF (Sá Filho et al., 2011). Diversos trabalhos demonstraram que maior concentração de estradiol antes da IATF aumenta a taxa de prenhez em vacas de corte (Perry et al., 2007; Perry et al., 2005; Sá Filho et al., 2010). A redução das concentrações de progesterona durante o protocolo (Dias et al., 2009; Peres et al., 2009; Utt et al., 2003), o aumento da duração do tratamento com progestinas (Utt et al., 2003), e o aumento do intervalo de proestro (Bridges et al., 2008; Bridges et al., 2010), também têm sido sugeridos como estratégias para melhorar a prenhez.

A aplicação de dispositivos intravaginais de progesterona (CIDR[®]) previamente utilizados tem resultado em aumento no diâmetro folicular e consequentemente melhor taxa de prenhez (Dias et al., 2009; Peres et al., 2009; Meneguetti et al., 2009). Dados de nosso laboratório (Martins et al., 2014), mostraram que novilhas tratadas com CIDR de primeiro uso (CIDR1) apresentaram folículos de menor diâmetro quando comparadas a novilhas tratadas com CIDR previamente utilizado durante 18 dias (CIDR3). Novilhas que receberam CIDR de 1º uso tiveram menor diâmetro folicular, provavelmente pelo efeito da progesterona diminuindo a pulsatilidade de LH ou através da diminuição da expressão de receptores de LH e outros genes relacionados ao desenvolvimento folicular.

Luo et al. (2011) verificaram que em animais tratados com antagonista de GnRH (GnRHa) houve supressão da pulsatilidade de LH e menor expressão de receptores de LH (LHR) e outros genes relacionados com a seleção e dominância folicular em células

da granulosa. Nossa hipótese é que a alta progesterona afeta negativamente a expressão de RNAm do receptor de LH e enzimas esteroidogênicas nas células da granulosa. Sugerimos que em animais com baixa concentração de progesterona ocorre maior expressão de receptores de LH e enzimas esteroidogênicas nas células da granulosa, com maior produção de estradiol, importantes para o desenvolvimento folicular.

1. LITERATURA

1.1. Progesterona em Protocolos de IATF

Relatos anteriores têm associado altas concentrações circulantes de progesterona durante protocolos de sincronização de ovulação com menores taxas de prenhez na IATF em novilhas púberes e vacas Nelore (Sá Filho et al., 2009; Dias et al., 2009). Altas concentrações de progesterona resultam na redução da frequência de pulsos de LH, o que diminui o desenvolvimento do folículo dominante (*Bos taurus*: Kinder et al., 1996; Kojima et al., 2003), e diâmetro do folículo no momento da IATF (*Bos indicus*: Dias et al., 2009; Peres et al., 2009), comprometendo a fertilidade (*Bos indicus*: Sá Filho et al., 2010; *Bos taurus*: Perry et al., 2005; Perry et al., 2007).

Alternativas para aumentar o apoio gonadotrópico aos folículos dominantes antes da IATF podem aumentar a fertilidade em bovinos de corte submetidos a protocolo de IATF (Dias et al., 2009; Peres et al., 2009; Meneghetti et al., 2009). Estas alternativas incluem a redução na circulação de concentração de P4 por administração de um dispositivo de liberação controlada de progesterona (CIDR) anteriormente utilizado por 18 dias (Dias et al., 2009; Peres et al., 2009), estimulação de liberação de gonadotropinas endógena através do tratamento com prostaglandinas (PGF) 2 dias antes da retirada do CIDR (Peres et al., 2009; Meneghetti et al., 2009) e administração de gonadotropina exógena (Baruselli et al., 2004; Dias et al., 2009; Peres et al., 2009; Sá Filho et al., 2010).

CIDR inicialmente contendo 1,9 g de P4 foi usado com sucesso em protocolos de sincronização de estro por até quatro vezes. Estudos anteriores com novilhas Nelore demonstraram concentrações séricas de P4 mais baixas (Dias et al., 2009; Meneghetti et al., 2009; Peres et al., 2009), e maiores taxas de prenhez após a sincronização com um

CIDR previamente utilizado por 18 dias (Dias et al., 2009) em comparação com o protocolo com um CIDR novo. Um aumento na taxa de concepção foi associado com o aumento das concentrações pré-ovulatórios de estradiol (E2) antes IATF, aumentando a duração do proestro (Bridges et al., 2008; Bridges et al., 2010) ou a administração exógena de E2 (cipionato de estradiol [ECP]) (Jinks et al., 2013). No Brasil, o ECP é utilizado como estímulo ovulatório no momento da remoção da progestina exógena em protocolos de sincronização da ovulação (Sá Filho et al., 2009; Dias et al., 2009; Meneghetti et al., 2009). Sá Filho et al. (2011) demonstraram que a administração de ECP no momento da remoção da progesterona aumentou a proporção de vacas Nelore expressando estro e aumento da taxa de prenhez em comparação com vacas tratadas com GnRH.

Sendo assim, reduzir as concentrações circulantes de P4 durante a sincronização de protocolos de ovulação e aumentar E2 pré-ovulatório antes IATF, pode resultar em melhorias na fertilidade. Diferentemente, maiores concentrações circulantes de P4 reduziram o diâmetro do folículo durante o protocolo de sincronização (dias 7 e 9) e diminuíram a probabilidade de novilhas Nelore conceberem. O mecanismo possível pelo qual elevada concentração sérica de P4 durante o protocolo resultou no decréscimo do tamanho do folículo nos dias 7 e 9 pode estar associado com uma reduzida frequência de pulsos de LH (Kinder et al., 1996; Kojima et al., 2003), que afeta negativamente o desenvolvimento do folículo dominante (Pfeifer et al., 2009).

Estudos em Nelore demonstraram que o surgimento de uma nova onda de crescimento folicular ocorre 3,1 (Carvalho et al., 2008) a 3,3 (Bastos et al., 2011) dias após o início de um protocolo que inclui 2 mg de benzoato de estradiol no momento da inserção de um dispositivo de P4. O desvio folicular ocorre 2,5 (Gimenes et al., 2008) a 2,8 (Sartorelli et al., 2005) dias após a emergência folicular. Folículos dominantes em animais *Bos indicus* apresentam diâmetro aproximado de 5,7 (Sartorelli et al., 2005) a 6,2 mm (Gimenes et al., 2008).

O momento em que os folículos adquirem LHR nas células da granulosa é objeto de discussão. Estudos em *Bos taurus* indicaram que a expressão ocorre antes do desvio folicular (Bet et al., 2001; Ginther et al., 2001; Ginther et al., 2003). Já Xu et al. (1995) e Bodensteiner et al. (1996) mostraram que o momento do desvio folicular coincide com aquisição de receptores de LH das células da granulosa. Outros estudos indicam que este

fato ocorra após o desvio (Xu et al., 1995; Bao et al., 1997). Porém, estudos em Nelore encontraram transcritos de LHR apenas em folículos maiores que 7 mm de diâmetro (Nogueira et al., 2007), sendo que o desvio ocorre com aproximadamente 6 mm de diâmetro (Sartorelli et al., 2005). Sendo assim a aquisição de LHR ocorreria após o desvio folicular. Recente trabalho em Nelore confirmou que a expressão de RNAm do LHR ocorreu após o desvio do folículo dominante (Ereno et al., 2015).

1.2. Progesterona e o LH

Concentrações sub-luteais de progesterona têm sido associadas com aumento na frequência dos pulsos de LH (Rahe et al., 1980; Roberson et al., 1989). Maior frequência de pulsos de LH parece estimular o crescimento do folículo dominante e a secreção de estradiol pelo folículo (Stegner et al., 2004).

Pfeifer et al. (2009) mostraram que animais tratados com baixa progesterona apresentaram maior atividade secretora de LH e correlação positiva entre a secreção de LH e produção de estradiol. Alta atividade estrogênica do folículo dominante está associada à expressão de genes como a aromatase, 3 β -hidroxi-esteróide desidrogenase, e a aquisição de receptores de LH em células da granulosa (Ireland e Roche, 1983; Xu et al., 1995; Bao et al., 1997; Evans et al., 1997). Animais submetidos à baixa progesterona apresentaram maior folículo dominante no momento da remoção do dispositivo de progesterona e no momento da IA, e consequentemente um CL maior do que animais tratados com alta progesterona (Pfeifer et al., 2009).

A concentração de progesterona influencia os pulsos de LH e, consequentemente a síntese de estradiol. A progesterona tem sido relatada como sendo o regulador primário da secreção de LH em animais adultos (Roberson et al., 1989). Maior secreção e pulsatilidade de LH ocorreram no grupo tratado com baixa progesterona (Pfeifer et al., 2009).

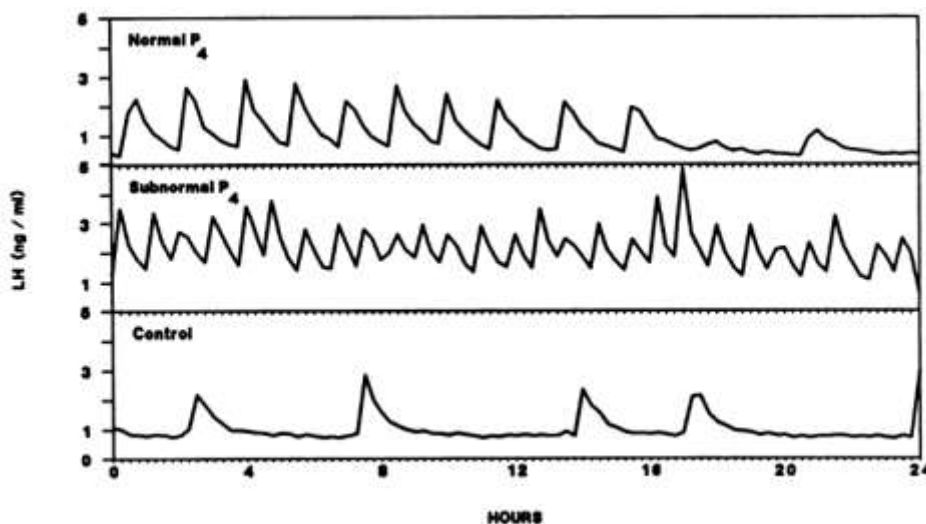


Fig.1 Roberson et al. (1989) – Padrão de secreção de LH para tratamentos com níveis de progesterona normal (2 implantes intravaginal de progesterona), subnormal (0,5 implante intravaginal de progesterona), e controle (Presença de Corpo Lúteo).

Tem sido proposto que a progesterona é o principal hormônio que regula a secreção de LH por feedback negativo durante o ciclo estral (Hauger et al., 1977). Isto tem implicações importantes ao se usar progesterona para controlar o ciclo estral e ovulação em bovinos. A dose de progesterona exógena pode ser eficaz no bloqueio do estro e pico pré-ovulatório gonadotrópico, mas insuficiente para manter as concentrações basais de LH durante a fase lútea do ciclo (Hansel et al., 1973). A hipótese de feedback negativo da progesterona no LH foi relatado por Ireland e Roche (1983).

O aumento dos níveis de LH que ocorreu com a redução nas concentrações de progesterona foi provavelmente devido a aumento no número de pulsos de LH ao invés do aumento da amplitude de cada pulso, como mostrado por Rahe et al (1980). Este perfil está de acordo com o observado durante a fase folicular do ciclo estral bovino. Este fato sugere que o efeito de retroalimentação negativa da progesterona em LH pode ser mediada por um efeito sobre a liberação de GnRH em vez de efeito direto sobre a glândula pituitária. Em contraste, Roberson et al. (1989) mostraram que em vacas que receberam menor P₄ o pico pré-ovulatório de LH ocorreu mais cedo.

1.3. Antagonista de GnRH e hipótese LH - LHR

Hormônio luteinizante (LH) é essencial não só para a ovulação e luteinização do folículo dominante, mas também para o crescimento normal e desenvolvimento de um folículo dominante competente. A ação de LH nas células da teca é uma forma importante que o LH regula o desenvolvimento folicular. LH estimula a expressão de enzimas esteroidogênicas, incluindo StAR (proteína reguladora aguda esteroidogênica) e CYP17A1 (citocromo P450 hidroxylase 17a), que são essenciais para a produção de andrógenos pelas células da teca (Magoffin et al., 1989; Ivell et al., 2000).

Luo et al. (2011) realizaram um experimento em que as vacas foram tratadas com um antagonista do receptor de hormônio libertador de gonadotrofina, Acylina, antes da seleção do folículo (perto de 7,8 mm - *Bos taurus*), para investigar o papel do LH nas concentrações de RNAm durante a seleção de um folículo dominante. A inibição de pulsos de LH pela Acylina suprimiu a expressão do RNAm do LHR em células da granulosa durante a seleção do folículo dominante, sugerindo assim que o LH promoveria a expressão dos seus próprios receptores *in vivo*. Esta conclusão é suportada por estudos *in vitro* em que o tratamento de LH aumentou o número de receptores de LH em células da granulosa de rato (Jia & Hsueh, 1984), mas não é consistente com um estudo (Hampton et al., 2004) que mostrou nenhum efeito da adição de pulsos de LH sobre a expressão de RNAm do LHR em células da granulosa. Hampton et al. (2004) sugeriram que o LH em níveis basais seria suficiente para adequado suporte à produção de estradiol pelas células da granulosa que por sua vez seria capaz de induzir expressão de LHR. O LH estimulou a expressão de P450c17 nas células da teca, produção de andrógenos e estradiol.

Apenas ligeiras alterações no LHR em células da teca foram observadas após o tratamento com Acylina, sugerindo que o LH não está envolvido na regulação deste gene nas células da teca perto do momento da seleção do folículo. Em conclusão para Luo et al. (2011), durante a seleção de um único folículo dominante, pulsos de LH são necessários para a manutenção das enzimas esteroidogênicas da teca para produzir substratos de andrógenos para a aromatase em células da granulosa. Indução de LHR em células da granulosa no futuro folículo dominante ocorre próximo à seleção folicular, com esta indução sendo dependente do LH. O mecanismo pelo qual ocorre a indução de LHR continua não inteiramente compreendido, podendo ser o LH estimulando a

expressão do LHR (Jia e Hsueh, 1984); estradiol sendo o responsável pela expressão do LHR (Ikeda et al., 2008) ou ainda efeito do LH nas células da teca através da expressão de P450c17, com produção de andrógenos convertidos pela aromatase em estradiol e expressão do LHR nas células da granulosa.

1.4. Desenvolvimento folicular e Expressão gênica

O desenvolvimento folicular ovariano em bovinos é caracterizado por ondas de crescimento durante o ciclo estral. Cada onda de crescimento folicular é caracterizada por recrutamento de um grupo de folículos. Um folículo é selecionado para o crescimento continuado e se torna dominante. Se ocorrer a luteólise durante a fase de crescimento do folículo dominante, ocorre a maturação final e ovulação. Se a luteólise não ocorre durante a fase de crescimento dos folículos, o destino é a atresia.

Mudanças na expressão de RNAm para os receptores de gonadotrofinas (FSHR e LHR), enzimas esteroidogênicas (P450scc, P450c17, P450arom e 3 β -HSD), e fatores de crescimento (IGF-I e II) e as suas proteínas de ligação (IGFBP) têm sido associados com diferentes estágios de crescimento folicular e atresia. Em geral, a expressão de RNAm para os receptores de gonadotrofinas, enzimas esteroidogênicas e Proteína Reguladora Aguda da Esteroidogênese (StAR) aumentam com o desenvolvimento folicular progressivo e é maior quando folículos dominantes aproximam do tamanho máximo.

A expressão de RNAm diminui rapidamente e torna-se baixa ou indetectável em folículos atresícos. O IGF-I (células da granulosa) e IGF-II (células da teca) são aumentados, enquanto que o IGFBP-2 (células granulosa) é reduzido, em folículos dominantes. Recrutamento de um grupo de folículos está associado com o início da expressão de RNAm para P450scc e P450arom em células da granulosa. Seleção de folículos dominantes está associado com expressão de RNAm para LHR e 3 β -HSD em células da granulosa (Xu et al., 1995; Bao et al., 1997b,c) porém Nogueira et al. (2007) relataram que a expressão de LHR ocorreria após o desvio folicular em animais *Bos indicus*. Assim, mudanças na expressão gênica provavelmente são importantes para recrutamento, seleção, dominância e atresia de folículos ovarianos (Bao & Garverick, 1998).

1.5. Modelo “Duas células, dois hormônios”

A síntese de estradiol ocorre no folículo ovariano através de um modelo bem estabelecido de "duas células, duas gonadotrofinas" (Fortune, 1986; Hillier et al., 1994; Drummond, 2006). Em resposta ao LH, andrógenos são sintetizados pelas células da teca e transportados através da membrana basal para as células da granulosa, onde eles são aromatizados em estrogênios sob a influência do FSH. Na fase folicular ocorre aumento da amplitude e frequência dos pulsos de LH para a produção de estradiol estimulando o comportamento estral e induzindo o pico pré-ovulatório de LH (Forde et al., 2011). O pico de LH desencadeia a transformação de células da granulosa e da teca em células lútea grandes e pequenas, respectivamente (Drummond, 2006). Inicia-se a formação de um corpo lúteo funcional (CL) capaz de secretar alta progesterona. Associando-se a produção de estradiol pelo folículo pré-ovulatório e as concentrações de progesterona após a ovulação, vacas com baixo estradiol em circulação no período periestro podem ter concentrações mais baixas de progesterona posteriormente levando a maiores taxas de mortalidade embrionária (Perry et al., 2005; Starbuck et al., 2000; Pereira et al., 2015).

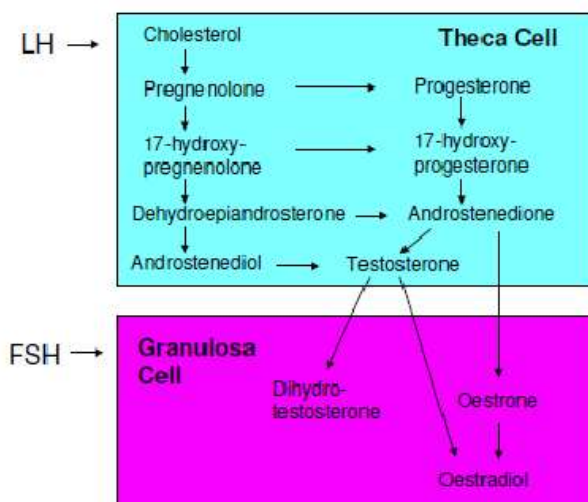


Fig. 2 – Biosíntese de esteróide pelo ovário. Nas células da teca, sob influência do LH, colesterol (que foi transportado para a mitocôndria pela StAR) é convertido em pregnenolona (pela P450scc) que é metabolizada em progesterona (pela 3β -HSD) e em uma série de substratos que culminam com a produção de andrógenos. O modelo “2 células, 2 hormônios” estabelece que estes andrógenos produzidos pela teca são transportados para as células da granulosa que os convertem em estradiol (pela P450aromatase) (Drummond., 2006).

Embora a atividade da aromatase esteja presente em pequenos folículos antrais, a produção de estrogênio nesta fase do desenvolvimento é limitada por incapacidade de produzir substrato para a aromatização de androgênio em estrogênio (Carson et al., 1981). Portanto, o desenvolvimento para além do estágio antral é caracterizado pelo aumento da atividade da aromatase que culmina na produção de estrogênio folicular. O folículo pré-ovulatório tem os maiores níveis de estradiol intrafolicular, principalmente devido ao tamanho da população de células da granulosa e a sua capacidade para a aromatização e consequente produção de estradiol (Hillier, 1981; McNatty, 1982).

Fortune (1986) sugeriu que as células da teca utilizam pregnenolona proveniente das células da granulosa para produzir androstenediona, e de que a testosterona proveniente da teca aumenta a capacidade de células da granulosa em fazer pregnenolona. Este modelo postula assim duas interações entre as células da teca e da granulosa, além da conversão de androgênio tecal em estradiol pelas células granulosas, interferência da testosterona na produção de pregnenolona pelas células da granulosa que é utilizada pela teca na produção de androstenediona. Fortune, (1986) mostrou que concentrações de estradiol semelhantes às encontradas em folículos pré-ovulatórios, antes do pico de LH diminuíram a secreção de progesterona *in vitro* pelas células da teca e da granulosa. Por isso, pareceu possível que a inibição da secreção de progesterona pode resultar em um aumento na secreção de pregnenolona, e que a capacidade para produzir pregnenolona pode ser muito maior na presença de altas concentrações de estradiol do que na ausência de estradiol.

In vivo as células da granulosa são uma importante fonte de pregnenolona, precursor para a secreção de androstenediona tecal. Fortune, (1986) observou que a concentração de pregnenolona em fluido folicular de folículos em proestro é duas vezes maior que a concentração de progesterona, sendo assim consistente com a ideia de que as células da granulosa fornecem progestina à teca na forma de pregnenolona. Estes resultados apoiam um potencial papel para o estradiol no aumento da produção de pregnenolona, sugerindo que o estradiol exerce um feedback positivo dentro do folículo pré-ovulatório sobre a sua própria produção através da inibição da conversão de pregnenolona em progesterona por 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (3 β -HSD). O estradiol assim aumenta a produção de androstenediona pelo teca.

Estradiol-17 β é sintetizado a partir da androstenediona pelo citocromo P450 aromatase, que é regulada pelo FSH e LH (Zelezink e Benyo., 1994). Produção folicular

de estradiol é dependente de quantidades suficientes de produção de andrógeno pelas células da teca (Zelezink e Benyo., 1994).

1.6. Expressão de 3 β -HSD e LHR

Seleção folicular é o processo pelo qual um único folículo é escolhido a partir de um grupo de folículos em crescimento para posterior desenvolvimento e ovulação. Folículos selecionados são estimulados pelo FSH e LH para estabelecer e manter o domínio folicular (Ireland e Roche, 1983; Ireland, 1987; Gong et al., 1996). Há relatos em animais *Bos taurus* que a expressão de LHR ocorra antes do desvio folicular (Bet et al., 2001; Ginther et al., 2001, 2003) ou após o desvio (Xu et al., 1995; Bao et al., 1997; Fortune et al., 2001). Já em *Bos indicus* Nogueira et al. (2007) relatam a expressão de LHR após o desvio folicular. Não é claro o que ocorre primeiro, a seleção do folículo dominante ou expressão de LHR e 3 β -HSD em células da granulosa do folículo dominante, ou se ocorre simultaneamente. LHR e 3 β -HSD são predominantemente detectados em um folículo saudável > 8 mm de diâmetro (*Bos taurus*) (Xu et al., 1995a; Bao et al., 1997b, c). A continuação do crescimento do folículo dominante é acompanhado por um aumento na expressão de RNAm do LHR e 3 β -HSD em células da granulosa (Bao et al., 1997b, c), que também expressam níveis mais elevados de RNAm para P450scc e P450arom. Expressão de RNAm 3 β -HSD em células da granulosa é sempre no mesmo folículo que expressa LHR (Bao et al., 1997c).

O desenvolvimento de receptores de LH nas células da granulosa pode fazer os folículos dominantes menos dependentes de FSH. Hormônio luteinizante se torna mais importante para o crescimento final e maturação dos folículos. Folículos dominantes expressam maiores níveis de StAR nas células da teca (Bao et al., 1997a) e isso pode assegurar transporte de colesterol suficiente para a mitocôndria para a produção de andrógenos. Folículos dominantes expressam níveis elevados de RNAm para a aromatase, que lhes permitem converter grandes quantidades de androgênios produzidos pela teca interna em estradiol (Xu et al., 1995b; Bao et al., 1997b).

Depois que LHR e 3 β -HSD são detectados em células da granulosa, sua expressão aumenta durante a fase de crescimento do folículo dominante (Bao et al., 1997b, c). Estes resultados indicam que as células da granulosa de folículos dominantes são capazes de converter não só andrógeno das células da teca para mais estradiol (P450arom), mas

também o colesterol em pregnenolona (P450scc) e a mesma em progesterona (3β -HSD). Pregnenolona e progesterona provenientes das células da granulosa de folículos dominantes podem ser utilizadas pelas células da teca para produzir andrógenos (Fortune, 1986; GoreLangton e Armstrong, 1994; Bao et al., 1997c.). Portanto, a progesterona no fluido folicular de folículos dominantes pode ser segregada a partir de células da teca e granulosa porque ambos expressam RNAm para 3β -HSD (Bao et al., 1997c). A proteína StAR é conhecida por regular o transporte agudo de colesterol a partir do exterior para membrana mitocondrial interna para conversão em pregnenolona pela P450scc (Stocco e Clark, 1996). Assim, níveis elevados de colesterol seriam necessários dentro da mitocôndria das células da teca para sintetizar androgênio, que é então metabolizado para estradiol nas células da granulosa.

Portanto, biossíntese de estradiol pelas células da granulosa pode ser agudamente regulamentado pela produção de andrógenos provenientes das células da teca (Badinga et al., 1992). Expressão de RNAm para enzimas esteroidogênicas aumenta ainda mais em folículos pré-ovulatórios após regressão luteal e aumento na frequência dos pulsos de LH (Tian et al., 1995).

2. REFERÊNCIAS

- BADINGA, L., DRIANCOURT, M.A., SAVIO, J.D., WOLFENSON, D., DROST, M., DE LA SOTA, R.L., THATCHER, W.W. Endocrine and ovarian responses associated with the first wave dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* 46, 871–883. 1992.
- BAO B, GARVERICK HA, SMITH GW, SMITH MF, SALFEN BE, YOUNGQUIST RS. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biol Reprod.* 56:1158–68. 1997.
- BAO, B., H. A. GARVERICK, G. W. SMITH, M. F. SMITH, B. E. SALFEN, AND R. S. YOUNGQUIST. Changes in messenger RNA encoding LH receptor, cytochrome P450 side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biol. Reprod.* 56:1158-1168. 1997b.
- BAO, B., H. A. GARVERICK, G. W. SMITH, M. F. SMITH, B. E. SALFEN, AND R. S. YOUNGQUIST. Expression of messenger RNA encoding 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/(17 β -ketoreductase) during recruitment and selection of bovine ovarian follicles: identification of dominant follicles by expression of 3 β -HSD mRNA within the granulosa cell layer. *Biol. Reprod.* 56: 1466-1473. 1997c.
- BAO B, GARVERICK HA. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: A review. *J. Anim. Sci.* 76:1903-1921. 1998.
- BARUSELLI PS, REIS EL, MARQUES MO, NASSER LF, BÓ GA. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. *Anim Reprod Sci.* Jul;82-83:479-86. Review. 2004.
- BASTOS MR, SURJUS RS, PRATA AB, MESCHIATTI MAP, BORSATO M, MOURÃO GB, et al. Efeito da dose de benzoato de estradiol em associação à progesterona na sincronização da emergência da onda folicular em vacas *Bos indicus* e *Bos taurus*. *Acta Sci Vet.* 39(Suppl.1):376 [abstract]. 2011.
- BECK TW, SMITH YG, SEGUIN BE, CONVEY EM. Bovine serum LH, GH and prolactin following chronic implantation of ovarian steroids and subsequent ovariectomy. *J Anim Sci* 42:461 -68. 1976.
- BEG MA, BERGFELT DR, KOT K, WILTBANK MC, GINTHER OJ. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biol Reprod.* Feb;64(2):432-41. 2001.
- BODENSTEINER KJ, WILTBANK MC, BERGFELT DR, GINTHER OJ. Alterations in follicular estradiol and gonadotropin receptors during development of bovine antral follicles. *Theriogenology.* 15;45(2):499-512. 1996.
- BRIDGES GA, HELSER LA, GRUM DE, MUSSARD ML, GASSER CL, DAY ML. Decreasing the interval between GnRH and PGF2 α from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed-AI pregnancy rates in beef cows. *Theriogenology.* 69:843–51. 2008.
- BRIDGES GA, MUSSARD ML, BURKE CR, DAY ML. Influence of the length of proestrus on fertility and endocrine function in female cattle. *Anim Reprod Sci.* 117:208–15. 2010.

- CARSON RS, RICHARDS JS, KAHN LE. Functional and morphological differentiation of theca and granulosa cells during pregnancy in the rat: dependence on increased basal luteinizing hormone activity. *Endocrinology*. 109:1433-1441. 1981.
- CARVALHO JBP, CARVALHO NAT, REIS EL, NICHI M, SOUZA AH, BARUSELLI PS. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*. 69:167–75. 2008.
- DIAS CC, WECHSLER FS, DAY ML, VASCONCELOS JLM. Progesterone concentrations, exogenous equine chorionic gonadotropin, and timing of prostaglandin F2 a treatment affect fertility in postpuberal Nelore heifers. *Theriogenology*. 72:378–85. 2009.
- DRUMMOND AE. The role of steroids in follicular growth. *Reprod Biol Endocrinol* 4: 16, 2006.
- ERENO RL, LOUREIRO B, CASTILHO A, MACHADO MF, PEGORER MF, SATRAPA RA, NOGUEIRA M, BURATINI J, BARROS CM. Expression of mRNA Encoding the LH Receptor (LHR) and LHR Binding Protein in Granulosa Cells from Nelore (*Bos indicus*) Heifers Around Follicle Deviation. *Reprod Domest Anim*. Oct 8. doi: 10.1111/rda.12614. 2015.
- EVANS AC, FORTUNE JE. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinology*. 138:2963–71. 1997.
- FORDE N, BELTMAN ME, LONERGAN P, DISKIN M, ROCHE JF, CROWE MA. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Anim Reprod Sci* 124: 163–169. 2011.
- FORTUNE, J. E. Bovine theca and granulosa cells interact to promote androgen production. *Biol. Reprod*. 35:292-299. 1986.
- GIMENES LU, SÁ FILHO MF, CARVALHO NAT, TORRES-JÚNIOR JRS, SOUZA AH, MADUREIRA EH, et al. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*. 69:852–8. 2008.
- GINTHER OJ, WILTBANK MC, FRICKE PM, GIBBONS JR, KOT K. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod*. 55:1187–1194. 1996.
- GINTHER OJ, BERGFELT DR, BEG MA, MEIRA C, KOT K. In vivo effects of an intrafollicular injection of insulin-like growth factor 1 on the mechanism of follicle deviation in heifers and mares. *Biol Reprod*. 70:99–105. 2004.
- GONG, J. G., B. K. CAMPBELL, T. A. BRAMLEY, C. G. GUTIERREZ, A. R. PETERS, AND R. WEBB. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biol. Reprod*. 55:68-74. 1996.
- GORE-LANGTON, R. E., ARMSTRONG, D.T. Follicular steroidogenesis and its control. In: E. Knobil and J. D. Neill (Ed.) *The Physiology of Reproduction* (Ed. 2) pp 571-627. Raven Press, New York. 1994.
- HAMPTON JH, BADER JF, LAMBERSON WR, SMITH MF, YOUNGQUIST RS, GARVERICK HA. Gonadotropin requirement for dominant follicle selection in GnRH agonist-treated cows. *Reproduction*. 127:695–703. 2004.

- HANSEL, W., CONCANNON, P.W., LUKASZEWSKA, J.H. Corpora lutea of the large domestic animals. *Biol. Reprod.* 8, 222-245. 1973.
- HAUGER, R.L., KARSCH, F.J., FOSTER, D.L. A new concept for control of the estrous cycle of the ewe based on the temporal relationships between luteinizing hormone, estradiol and progesterone in peripheral serum and evidence that progesterone inhibits tonic LH secretion. *Endocrinology* 101, 807-817. 1977.
- HILLIER SG. Regulation of follicular oestrogen biosynthesis: a survey of current concepts. *J Endo Supp.* 3P-18P. 1981.
- HILLIER SG, WHITELAW PF, SMYTH CD. Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited. *Mol Cell Endocrinol* 100: 51-54. 1994.
- IKEDA S, NAKAMURA K, KOGURE K, OMORI Y, YAMASHITA S, KUBOTA K, MIZUTANI T, MIYAMOTO K, MINEGISHI T. Effect of estrogen on the expression of luteinizing hormone-human chorionic gonadotropin receptor messenger ribonucleic acid in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology.* Apr;149(4):1524-33. 2008.
- IRELAND JJ, ROCHE JF. Development of nonovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. *Endocrinology.* 112:150-6. 1983.
- IRELAND, J. J. Control of follicular growth and development. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 34:39-54. 1987.
- IVELL R, TILLMANN G, WANG H, NICOL M, STEWART PM, BARTLICK B, WALTHER N, MASON JI, MORLEY SD. Acute regulation of the bovine gene for the steroidogenic acute regulatory protein in ovarian theca and adrenocortical cells. *J Mol Endocrinol.* 24:109-118. 2000.
- JIA XC, HSUEH AJ. Homologous regulation of hormone receptors: luteinizing hormone increases its own receptors in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology.* 115:2433-2439. 1984.
- JINKS EM, SMITH MF, ATKINS JA, POHLER KG, PERRY GA, MACNEIL MD, et al. Preovulatory estradiol and the establishment and maintenance of pregnancy in suckled beef cows. *J Anim Sci.* 91:1176-85. 2013.
- KINDER JE, KOJIMA FN, BERGFELD EG, WEHRMAN ME, FIKE KE. Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. *J Anim Sci.* 74:1424-40. 1996.
- KOJIMA FN, BERGFELD EGM, WEHRMAN ME, CUPP AS, FIKE KE, MARISCALAGUAYO DV et al. Frequency of luteinizing hormone pulses in cattle influences duration of persistence of dominant ovarian follicles, follicular fluid concentrations of steroids, and activity of insulin-like growth factor binding proteins. *Anim Reprod Sci.* 77:187-211. 2003.
- LUO, W., GUMEN, A., HAUGHIAN, J.M., WILTBANK, M.C. The role of Luteinizing Hormone in Regulating Gene Expression During Selection of Dominant Follicle in Cattle. *Biology of Reproduction*, 84(2):369-378. 2011.

- MAGOFFIN DA. Evidence that luteinizing hormone-stimulated differentiation of purified ovarian thecal-interstitial cells is mediated by both type I and type II adenosine monophosphate-dependent protein kinases. *Endocrinology*. 125:1464–1473. 1989.
- MARTINS T, PERES RFG, RODRIGUES ADP, POHLER KG, PEREIRA MHC, DAY ML, VASCONCELOS JLM. Effect of progesterone concentrations, follicle diameter, timing of artificial insemination, and ovulatory stimulus on pregnancy rate to synchronized artificial insemination in postpubertal Nelore heifers. *Theriogenology*. 81: 446-453. 2014.
- MCNATTY KP. Ovarian follicular development from the onset of luteal regression in humans and sheep. In *Follicular maturation and ovulation* Edited by: Rolland R, van Hall EV, Hillier SG, McNatty KP, Shoemaker J. Amsterdam, Excerpta Medica. 1-18. 1982.
- MENEGHETTI M, SÁ FILHO OG, PERES RFG, LAMB GC, VASCONCELOS JLM. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: basis for development of protocols. *Theriogenology*. 72:179–89. 2009.
- NOGUEIRA MF, BURATINI J JR, PRICE CA, CASTILHO AC, PINTO MG, BARROS CM. Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: changes with follicle size and regulation by FSH in vitro. *Mol Reprod Dev*. 74(6):680-6. 2007 .
- PEREIRA MH, WILTBANK MC, BARBOSA LF, COSTA WM JR, CARVALHO MA, VASCONCELOS JL. Effect of adding a gonadotropin-releasing-hormone treatment at the beginning and a second prostaglandin F2 α treatment at the end of an estradiol-based protocol for timed artificial insemination in lactating dairy cows during cool or hot seasons of the year. *J Dairy Sci*. 98(2):947-59. 2015.
- PERES RFG, JÚNIOR IC, SÁ FILHO OG, NOGUEIRA GP, VASCONCELOS JLM. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. *Theriogenology*. 72:681–9. 2009.
- PERRY, G. A., M. F. SMITH, M.C. LUCY, J. A. GREEN, T.E. PARKS, M. D. MACNEIL, A. J. ROBERTS, AND T. W. GEARY. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:5268–5273. 2005.
- PERRY GA, SMITH MF, ROBERTS AJ, MACNEIL MD, GEARY TW. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *J Anim Sci*. 85:684–9. 2007
- PFEIFER LFM, MAPLETOFT RJ, KASTELIC JP, SMALL JA, ADAMS GP, DIONELLO NJ, SINGH J. Effects of low versus physiologic plasma progesterone concentrations on ovarian follicular development and fertility in beef cattle. *Theriogenology*. 72:1237-1250. 2009.
- RAHE CH, OWENS RE, FLEEGER JL, NEWTON HJ, HARMS PG. Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: dependence upon the period of the cycle. *Endocrinology*. 107:498–503. 1980.
- ROBERSON MS, WOLFE MW, STUMPF TT, KITTOCK RJ, KINDER JE. Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of progesterone. *Biol Reprod*. 41:997–1003. 1989.

- SARTORELLI ES, CARVALHO LM, BERGFELT DR, GINTHER OJ, BARROS CM. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology*. 63:2382–94. 2005.
- SARTORI R, FRICKE PM, FERREIRA JC, GINTHER OJ, WILTBANK MC. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol Reprod*; 65:1403–1409. 2001.
- SÁ FILHO MF, TORRES-JÚNIOR JR, PENTEADO L, GIMENES LU, FERREIRA RM, AYRES H, CASTRO E PAULA LA, SALES JN, BARUSELLI PS. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Anim Reprod Sci*. 118(2-4):182-7. 2010.
- SÁ FILHO OG, MENEGHETTI M, PERES RFG, LAMB GC, VASCONCELOS JLM. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: strategies and factors affecting fertility. *Theriogenology*. 72:210–8. 2009.
- SÁ FILHO MF, CRESPILO AM, SANTOS JEP, PERRY GA, BARUSELLI PS. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Anim Reprod Sci*. 120: 23–30. 2010.
- SÁ FILHO MF, SANTOS JEP, FERREIRA RM, SALES JNS, BARUSELLI PS. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols.
- SIMÕES RA, SATRAPA RA, ROSA FS, PIAGENTINI M, CASTILHO AC, ERENO RL, TRINCA LA, NOGUEIRA MF, BURATINI J JR, BARROS CM. Ovulation rate and its relationship with follicle diameter and gene expression of the LH receptor (LHR) in Nelore cows. *Theriogenology*. Jan 1;77(1):139-47. 2012.
- STARBUCK GR, GUTIERREZ CG, MANN GE. Relationships between pre- and post-ovulatory steroidogenic function in vivo in cattle. *J Reprod Fertil Abstract Series* 25: Abstract 55, 2000.
- STEGNER JE, KOJIMA FN, BADER JF, LUCY MC, Ellersieck MR, Smith MF, Patterson DJ. Follicular dynamics and steroid profiles in cows during and after treatment with progestin-based protocols for synchronization of estrus. *J Anim Sci*. 82: 1022–8. 2004.
- STOCCO, D. M., CLARK, B.J. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr. Rev*. 17:221-244. 1996.
- TIAN, X. C., A. K. BERNDTSON, AND J. E. FORTUNE. Differentiation of bovine preovulatory follicles during the follicular phase is associated with increases in messenger ribonucleic acid for cytochrome P450 side-chain cleavage, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, and P450 17 α -hydroxylase, but not P450 aromatase. *Endocrinology* 136:5102-5110. 1995.
- UTT MD, JOUSAN FD, BEAL WE. The effects of varying the interval from follicular wave emergence to progestin withdrawal on follicular dynamics and the synchrony of estrus in beef cattle. *J Anim Sci*.81:1562–7. 2003.
- VASCONCELOS, J. L., R. SARTORI, H. N. OLIVEIRA, J. G. GUENTHER, AND M. C. WILTBANK. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology* 56:307– 314. 2001.

- XU, Z. Z., H. A. GARVERICK, G. W. SMITH, M. F. SMITH, S. A. HAMILTON, AND R. S. YOUNGQUIST. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol. Reprod.* 53:951-957. 1995a.
- XU, Z. Z., H. A. GARVERICK, G. W. SMITH, M. F. SMITH, S. A. HAMILTON, AND R. S. YOUNGQUIST. Expression of messenger RNA encoding cytochrome P450 side chain cleavage, cytochrome P450 17 α -hydroxylase and cytochrome P450 aromatase in bovine follicles during the first follicular wave. *Endocrinology*. 136:981-989. 1995b.
- ZELEZINK AJ, BENYO DE. Control of follicular development, corpus luteum function, and the recognition of pregnancy in higher primates. In: Knobil E, Neill J (eds.), *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press Ltd. 751-781. 1994.
- WALSH, S. W., MEHTA, J. P., MCGETTIGAN, P. A., BROWNE, J. A., FORDE, N., ALIBRAHIM, R.M., MULLIGAN, F.J., LOFTUS, B., CROWE, M.A., MATTHEWS, D., DISKIN, M., MIHM, M., EVANS, A.C.O. Effect of the metabolic environment at key stages of follicle development in cattle: focus on steroid biosynthesis. *Physiol Genomics*. 44(9):504-17. 2012.

CAPÍTULO 2

EFEITO DA PROGESTERONA NA EXPRESSÃO DO RNA_m DO
RECEPTOR DE LH E ENZIMAS ESTEROIDOGÊNICAS
REGULADORAS DO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR EM
CÉLULAS DA GRANULOSA DE NOVILHAS NELORE

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito da concentração de P4 sobre a abundância de RNAm do LHR e enzimas esteroidogênicas em células da granulosa de folículo dominante (FD) em novilhas Nelore. Hipotetizamos que a alta progesterona afetaria negativamente a expressão do LHR e enzimas esteroidogênicas proporcionando menor desenvolvimento folicular. Para tanto, 52 novilhas Nelore foram pré-sincronizadas (D-17: 2mg BE + dispositivo intravaginal de progesterona CIDR®; D-10: 12,5mg PGF2 α Lutalyse®; D-8: 0,5 mg ECP® e retirada CIDR®). As novilhas que responderam à pré-sincronização (presença de CL) foram submetidas à ablação folicular e colheita de sangue no D0 e aleatoriamente distribuídas em 6 grupos: **G1:** *Alta P4-D5* (implante de CIDR1 (novo) no D0 e abatidas após 5 dias); **G2:** *Baixa P4-D5* (implante de CIDR3 (previamente utilizado por 18 dias) no D0 e aplicação de 25mg PGF2 α no D0 e no D1, abate no D5); **G3:** *Alta P4-D6* (implante de CIDR1 e abatidas após 6 dias); **G4:** *Baixa P4-D6* (implante de CIDR3 no D0 e aplicação de 25mg PGF2 α no D0 e no D1, abate no D6); **G5:** *Alta P4 + PE* (proestro) (implante de CIDR1 no D0, retirada do CIDR, colheita de sangue e aplicação de 25mg PGF2 α no D5 e abatidas no D6); **G6:** *Baixa P4 + PE* (implante de CIDR3 no D0 e aplicação de 25mg PGF2 α no D0 e no D1, retirada do CIDR, colheita de sangue e aplicação de 25mg PGF2 α no D5 e abatidas no D6). Os ovários foram retirados, o FD mensurado e dissecado para obtenção das células da granulosa. As concentrações plasmáticas e intrafoliculares de P4, E2 e IGF-1 livre foram mensuradas. As comparações do efeito da duração (G1 e G2 x G3 e G4), efeito do proestro (G3 e G4 x G5 e G6) e efeito da concentração de P4 e suas interações, sobre os níveis de RNAm do LHR e enzimas esteroidogênicas foram realizadas por ANOVA. Células da granulosa provenientes de FD expostos a maior concentração de P4 apresentaram menor abundância de RNAm do LHR, 3 β -HSD e aromatase ($P < 0,05$). Em conclusão, a alta concentração de P4 leva a menor expressão de LHR e 3 β -HSD em células da granulosa de FD independente da duração do tratamento ou se submetidos ao proestro. Progesterona interfere a concentração folicular de estradiol, e expressão de aromatase sendo influenciada pela duração do tratamento e pelo proestro.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effect of P4 concentration on the abundance of LHR mRNA and steroidogenic enzymes in granulosa cells of the dominant follicle (DF) in Nellore heifers. High progesterone negatively affects the expression of LHR and steroidogenic enzymes, providing lower follicular development. 52 Nellore heifers were pre-synchronized (D-17: BE + 2 mg intravaginal device CIDR® progesterone; D-10: 12.5 mg PGF2a Lutalyse®; D-8: 0.5 mg ECP® and withdrawal CIDR®). Heifers who responded to the pre-synchronization (presence of CL) underwent follicular ablation and blood collection on D0 and randomly divided into 6 groups: **G1**: *High P4-D5* (implant CIDR1 (new) on D0 and slaughtered after 5 days); **G2**: *Low P4-D5* (implant CIDR3 (previously used for 18 days) on D0 and 25mg PGF2a in D0 and D1, D5 slaughter); **G3**: *High P4-D6* (implant CIDR1 and slaughtered after 6 days); **G4**: *Low P4-D6* (CIDR3 implant in D0 and application of 25mg PGF2a in D0 and D1, slaughter D6); **G5**: *High P4 + PE* (proestrus) (CIDR1 implant in D0, CIDR, blood collection and application of 25mg PGF2a in D5 and slaughtered in D6); **G6**: *Low P4 + PE* (CIDR3 implant in D0 and application of 25mg PGF2a in D0 and D1, CIDR, blood collection and application of 25mg PGF2a on D5, slaughtered on D6). The ovaries were removed, the DF measured and dissected to obtain the granulosa cells. The plasma concentrations and intrafollicular P4, E2 and free IGF-1 were measured. Comparisons of the effect of length (G1 e G2 x G3 e G4), proestrus effect (G3 e G4 x G5 e G6) and the effect of P4 and their interactions on the LHR mRNA levels and steroidogenic enzymes were performed by ANOVA. Granulosa cells from DF exposed to higher concentration of P4 showed lower mRNA abundance of the LHR, aromatase and 3β-HSD (P <0.05). In conclusion, the high concentration of P4 leads to lower expression of LHR and 3β-HSD in granulosa cells independently of the duration of treatment or if exposed to proestrus. Progesterone interferes follicular estradiol concentration, and aromatase expression being influenced by the duration of the treatment and the proestrus.

1. INTRODUÇÃO

Alta concentração de P4 (aproximadamente 4,5 ng/ml; Cipriano et al., 2011) compromete a pulsatilidade de LH e crescimento folicular principalmente em animais *Bos indicus*, que apresentam maiores concentrações de P4 comparados a *Bos taurus* (Carvalho et al., 2008). No entanto, na presença de concentrações sub-luteais de P4 (aproximadamente 2,14 ng/ml; Roberson et al., 1989), a pulsatilidade de LH é elevada e o folículo dominante atinge maior diâmetro, maior concentração de estradiol (Peres et al., 2009), resultando em um corpo lúteo que secreta mais P4 (Vasconcelos et al., 2001; Pfeifer et al., 2009).

A administração de estradiol exógeno tem aumentado a fertilidade em novilhas na IATF (Sá Filho et al., 2011). Diversos trabalhos demonstraram que maior concentração de estradiol antes da IATF aumenta a taxa de prenhez em vacas de corte (Perry et al., 2007; Perry et al., 2005; Sá Filho et al., 2010). A redução das concentrações de progesterona durante o protocolo (Dias et al., 2009; Peres et al., 2009; Utt et al., 2003), o aumento da duração do tratamento com progestinas (Utt et al., 2003) e o aumento do intervalo de proestro (Bridges et al., 2008; Bridges et al., 2010) também têm sido sugeridas como estratégias para melhorar a prenhez.

A aplicação de dispositivos intravaginais de progesterona (CIDR[®]) previamente utilizados tem resultado em maior diâmetro folicular e consequentemente maior taxa de prenhez (Dias et al., 2009; Peres et al., 2009; Meneguetti et al., 2009). Dados de nosso laboratório (Martins et al., 2014) utilizando protocolo de 9 dias com progestina exógena e inseminação no dia 11, mostraram que novilhas sincronizadas com CIDR de primeiro uso (CIDR1) apresentaram no dia 7 do protocolo diâmetro do folículo dominante de $6,84 \pm 0,13$ mm vs. $7,6 \pm 0,13$ mm de diâmetro em novilhas tratadas com CIDR de 3º uso. No dia 9, as médias dos folículos foram de $8,53 \pm 0,40$ mm CIDR1 vs. $9,62 \pm 0,40$ mm CIDR3. No dia 11 do protocolo, CIDR1 apresentaram média de $11,20 \pm 0,40$ mm vs. $11,65 \pm 0,11$ mm CIDR3. Novilhas grupo CIDR1 apresentaram 38,3% de animais com folículos <10,8 mm (diâmetro que apresenta menor probabilidade de prenhez), enquanto novilhas CIDR3 apresentaram 26,7% dos folículos com diâmetro <10,8 mm. Novilhas que receberam CIDR de 1º uso tiveram menor diâmetro folicular, provavelmente pelo efeito da progesterona diminuindo a pulsatilidade de LH ou através da diminuição da expressão de receptores de LH e outros genes relacionados ao desenvolvimento folicular.

Luo et al., (2011) verificaram que em animais tratados com antagonista de GnRH (GnRHa) houve supressão da pulsatilidade de LH e menor expressão de receptores de LH (LHR) e outros genes relacionados com a seleção e dominância folicular. Nossa hipótese é que a alta progesterona afeta negativamente a expressão de RNAm do LHR e enzimas esteroidogênicas reguladoras do desenvolvimento folicular. Sugerimos que em animais com menor concentração de progesterona ocorre maior expressão de receptores de LH e enzimas esteroidogênicas nas células da granulosa, afetando a produção de estradiol e o desenvolvimento folicular.

HIPÓTESE

Alta concentração de progesterona reduz o diâmetro folicular devido à diminuição da expressão de receptores de LH e outros genes associados ao desenvolvimento folicular em células da granulosa de novilhas da raça Nelore.

OBJETIVO GERAL

Quantificar os níveis de RNAm de LHR e enzimas esteroidogênicas (3 β -HSD, P450scc, P450aromatase, STAR) relacionados ao desenvolvimento folicular em células da granulosa de folículos dominantes provenientes de novilhas da raça Nelore, submetidas à alta ou baixa concentração de progesterona durante o desenvolvimento folicular, verificando o efeito da duração do tratamento e exposição ou não ao proestro.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Avaliar o efeito da progesterona na expressão de RNAm do LHR e enzimas esteroidogênicas
- 2- Avaliar o efeito da duração do tratamento (idade folicular) na expressão de RNAm do LHR e enzimas esteroidogênicas.
- 3- Avaliar o efeito do proestro (exposição ou não à baixa P4 no final do desenvolvimento folicular) na expressão de RNAm do LHR e enzimas esteroidogênicas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado em uma fazenda comercial de bovinos de corte localizada no município de Santa Maria da Serra (São Paulo, Brasil). Os animais foram mantidos em pasto *Brachiaria brizantha*, com acesso *ad libitum* à água e suplementação mineral. Neste estudo foram utilizadas sessenta novilhas Nelore (*Bos indicus*) e, após duas avaliações ultrassonográficas intervaladas por 12 dias, apenas novilhas que apresentaram corpo lúteo em pelo menos uma das avaliações foram utilizadas neste estudo (cinquenta e duas novilhas). Os animais apresentavam entre 24 e 28 meses de idade, escore de condição corporal variando de 2,75 a 3,25 (escala 1 = magra até 5 = obesa) (Faria et al., 2007) e peso variando de 290 kg até 360 kg.

Todos os animais foram pré-sincronizados no dia D-17 com 2 mg de Benzoato de Estradiol i.m (2 ml Estrogin; Farmavet, São Paulo, SP, Brasil) e receberam implante intravaginal de progesterona previamente utilizados em dois protocolos de 9 dias cada (CIDR®—Controlled Intravaginal Drug Release, Pfizer Animal Health, São Paulo, SP, Brasil). No dia D-10 as novilhas receberam 12,5 mg i.m de dinoprost trometamina (PGF2 α ; 2.5 mL Lutalyse; Pfizer Animal Health). No dia D-8 os implantes (CIDR) foram removidos e as novilhas receberam 0,5 mg de cipionato de estradiol i.m (0,25 ml de ECP; Pfizer Saúde Animal).

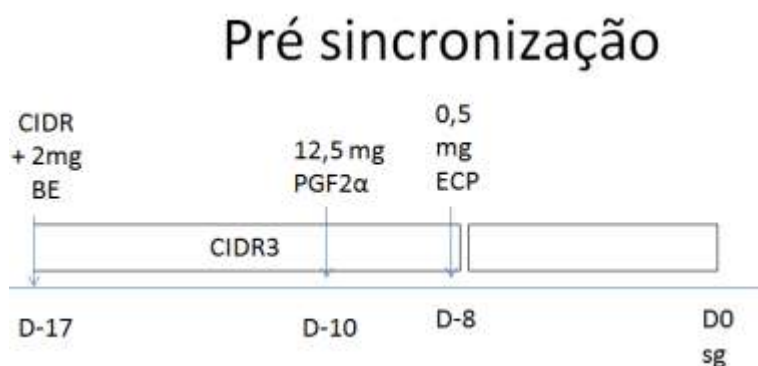


Figura 3 – Protocolo de pré-sincronização

O protocolo de pré-sincronização foi realizado para que as novilhas estivessem aproximadamente no dia 6 do ciclo estral no dia D0 do nosso delineamento experimental. No D0 os ovários foram avaliados através de exame ultrassonográfico (aparelho Aloka SSD-500 com transdutor transretal linear com 7.5 MHz; Aloka, Tokyo, Japão), foram

avaliados para detecção de tecido luteal originário do protocolo de pré-sincronização. Apenas novilhas que responderam ao protocolo de pré-sincronização, com tecido luteal (n = 45) foram submetidas à ablação folicular e colheita de sangue no D0 e distribuídas aleatoriamente em seis grupos (Figuras 4 e 5). **G1:** Alta P4-D5 (implante de CIDR1 (novo) no D0 e abatidas no D5 com colheita de sangue e obtenção dos ovários, n = 7); **G2:** Baixa P4-D5 (implante de CIDR3 (previamente utilizado durante 18 dias) no D0, 25mg de PGF2α no D0 e D1, abatidas no D5, n = 8); **G3:** Alta P4-D6 (implante de CIDR1 no D0 e abatidas no D6, n = 8); **G4:** Baixa P4-D6 (inserção de CIDR3 no D0, 25mg de PGF2α no D0 e no D1, abatidas no D6, n = 8). **G5:** Alta P4 + PE (proestro) (CIDR1 no D0, retirada do CIDR no D5 com colheita de sangue e aplicação de 25mg de PGF2α, abate no D6, n = 7); **G6:** Baixa P4 + PE (CIDR3 no D0 e aplicação de 25mg de PGF2α no D0 e D1, remoção do CIDR no D5 com colheita de sangue e aplicação de 25mg de PGF2α, abatidas no D6, n = 7).

Modelo 1 – Duração x Progesterona

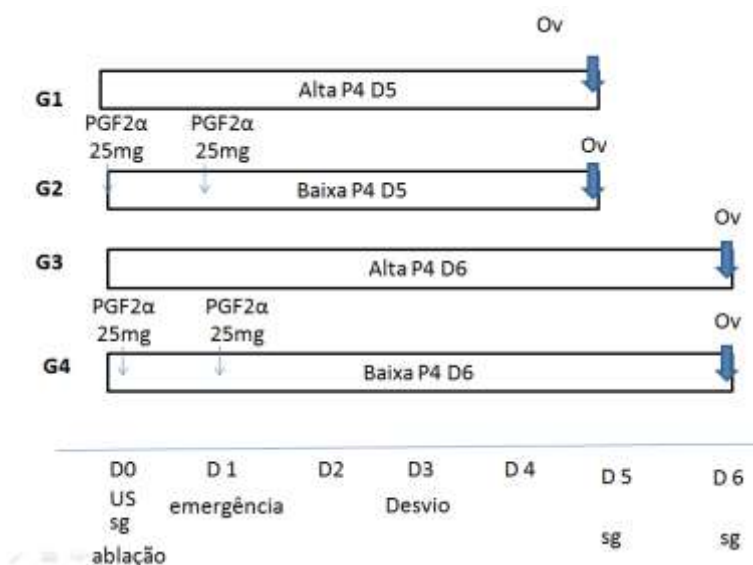


Figura 4 – Grupos Experimentais G1 e G2 – Us: Ultrassonografia; sg: Colheita de sangue; PGF2α: prostaglandina; Ov: obtenção dos ovários após o abate (Abate no mesmo dia – Início do protocolo com 1 dia de diferença). Duração 5 ou 6 dias, alta ou baixa P4.

Modelo 2 – Proestro x Progesterona

(mesma idade folicular)

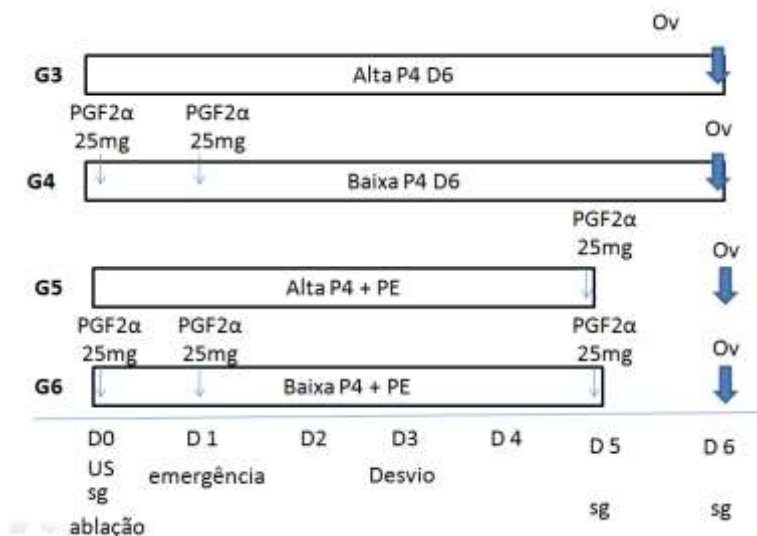


Figura 5 – Grupos Experimentais G2 e G3 – PE : proestro; Us: Ultrassonografia; sg: Colheita de sangue; PGF2α: prostaglandina; Ov: obtenção dos ovários após o abate (Mesma idade Folicular). Duração 6 dias, com ou sem proestro, alta ou baixa P4.

Todos os animais foram abatidos no mesmo dia, para isso os protocolos foram iniciados em dois dias diferentes, sendo os grupos abatidos no D5 iniciados o protocolo um dia após os grupos D6 e grupos submetidos ao proestro (PE). Os ovários foram transportados até o laboratório em solução salina (0,9%) a 4 °C. O folículo dominante de cada ovário foi dissecado e o diâmetro folicular (média entre as duas linhas perpendiculares mensuradas na extensão do folículo) foi mensurado com auxílio de paquímetro. Foi aspirado o líquido intrafolicular com o auxílio de uma agulha de insulina e seringa de 1 ml e armazenado a -80°C . O *antrum* folicular foi lavado repedidas vezes com o auxílio de solução salina refrigerada a 4 °C e as células da granulosa obtidas após centrifugação do material obtido no flush, sob rotação de 5000g durante um minuto. Após concentração das células da granulosa, foi removida a solução salina e o pellet de células da granulosa utilizados para a extração do RNAm. As células da teca foram retiradas com auxílio de uma pinça e armazenadas a -80 °C, porém não foram o alvo deste estudo.

As amostras de células da granulosa foram colocadas em Trizol® (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) e homogeneizadas com Polytron (Ultraturrax®, Luzern, Suíça). O RNA total foi extraído de acordo com o protocolo do fabricante e armazenado a -80 °C. RNA total (1µg) derivados das células da granulosa foram incubados com DNase I (Invitrogen®), após este processo foi realizada a transcrição reversa com High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies), com 100µl de volume total por amostra. Análise relativa de RT-PCR em tempo real foi realizada utilizando Step One plus thermo cycler com Power Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) utilizando primers específicos para bovinos. Nós utilizamos os primers demonstrados na tabela 1. Como genes housekeeping para as amplificações utilizamos primers de CYC-A e RPL-7. O gene mais estável foi o RPL-7 que foi utilizado nas análises e cálculos de quantificação relativa dos genes alvo.

Foi realizado um experimento de validação que demonstrou previamente que a eficiência das amplificações alvo e a eficiência dos genes de referência (gene controle endógeno) foram aproximadamente iguais. O método $\Delta\Delta C_T$ foi utilizado para calcular as diferentes amplificações e expressão dos genes alvo entre cada amostra (Pfaffl et al., 2001).

As reações foram realizadas com o volume total de 25 µl contendo 1µl (3.3ng de RNA) em cada amostra e os perfis de amplificação de PCR em cada amostra foram: 1 ciclo a 50°C durante 2 min; 1 ciclo a 95°C durante 10 min; 40 repetições a 95°C durante 15 seg, 58°C durante 10 seg, 72°C durante 1 min; e curva de dissociação. As reações foram otimizadas para permitir uma máxima eficiência de amplificação para cada gene (>90%). Cada amostra foi analisada em triplicata e a especificidade de cada produto do PCR foi determinada através da análise da curva de dissociação (temperatura de melting) e determinação do tamanho do transcrito em gel de agarose. Cada placa foi utilizada com 15 amostras para cada gene alvo juntamente com o gene housekeeping, todos em triplicata. Controles negativos (gotas com ausência de cDNA) foram colocadas para correr em cada placa com gene alvo e housekeeping.

A expressão relativa (gene alvo/RPL-7) dos genes LHR, 3beta-HSD, StAR5, Cyp11A19 (P450 side chain cleavage), Cyp19A19 (P450 aromatase) foram calculados com correção para abundância relativa comparado a uma amostra considerada com

expressão mediana em que foi considerado valor 1 e após isto todas as quantificações foram calculadas em relação a esta amostra em questão. Os cálculos foram realizados utilizando o método $\Delta\Delta C_t$ com correção para eficiência (Pfaffl, 2001; Ramakers et al., 2003). Tabela 1 com primers dos genes alvo, sequência e tamanho.

Tabela 1 – Genes alvo, sequências e tamanho.

Genes	Sequência (5' - 3')*	Tamanho Amplicons (bp)
STAR	F: CCCCAGCTGCGTGGATTAAC	96
	R: ATATGGGCCAGCTCTTGGTC	
CYP11A1	F: GAGGAGGTTCTGAATGCCCG	97
	R: CTCAGCGTCTCCTTGATGCT	
CYP19A1	F: TCACCAAGCATCTGGACAGG	69
	R: ATGAGGGTCAACACGTCCAC	
HSD3B1	F: TTCCCGGATGAGCCTTCCTA	119
	R: GTCACTAGGTGGCGGTTGAA	
RPL7	F: AGGATGGCAAAGCCGGT	101
	R: TCGAACCTTTGGGCTCACACCA	
LHCGR	F: GGGAAATCAGCGTTGTCCCATTTGA	132
	R: GCATCCACAAGCTTCCAGATGTTACGA	

Foi realizada colheita de sangue nos dias D0, D5 e D6 através da veia coccídea utilizando tubos Vacutainer com volume de 10 ml (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) que foram armazenados a 4°C durante 24 horas e após este período centrifugados a 1.200 x g durante 15 minutos. O soro sanguíneo foi separado e armazenado a -20°C até a realização do Radioimunoensaio (RIA). Nos grupos Alta P4-D5 e Baixa P4-D5 foram realizadas colheita de sangue no D0 para dosagem de progesterona e no D5 para dosagem de progesterona, estradiol e IGF-1 livre. Nos grupos Alta P4-D6 e Baixa P4-D6 foram realizadas colheitas de sangue no D0 para dosagem de progesterona e no D6 para

dosagem de progesterona, estradiol e IGF-1. Nos grupos Alta P4 + PE e Baixa P4 + PE foram realizadas colheitas de sangue no D0 para dosagem de progesterona, no D5 para dosagem de progesterona e estradiol, no D6 para dosagem de progesterona, estradiol e IGF-1.

A dosagem de estradiol- 17β extraído do soro sanguíneo foi realizado pelo método do radioimunoensaio como descrito previamente por Kirby et al. (1997). Os coeficientes de variação (CV) intra e inter-ensaios para estradiol foram $< 10\%$. A sensibilidade do ensaio foi de 0,5 pg/ml. As concentrações séricas de estradiol em todas as amostras apresentaram-se dentro da curva padrão.

Concentração sérica de progesterona foi quantificada com o kit de radioimunoensaio Coat-a-Count RIA kit (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA) como descrito previamente (Kirby et al., 1997). Os coeficientes de variação (CV) intra e inter-ensaios para as análises de progesterona foram $< 10\%$.

A concentração sérica de IGF-1 livre foi determinada por radioimunoensaio (Echternkamp et al., 1990) após extração com etanol-ácido durante 16 horas a 4 °C. Os coeficientes de variação intra e inter-ensaios foram $< 10\%$.

As concentrações intrafoliculares de progesterona, estradiol e IGF-1 livre foram analisados utilizando os mesmos métodos utilizados para dosar esses hormônios no soro sanguíneo.

A maturidade folicular (maduro, transicional ou atresico) foi calculada utilizando a razão entre estradiol e progesterona intrafolicular (Grimes e Ireland, 1986). Apenas folículos com razão E2/P4 > 1 foram selecionados para as análises, baseando-se na premissa que esta concentração seria característica de folículos não atresicos.

Após a realização dos protocolos e análises, nós excluimos nove animais das análises finais e estatísticas. Um animal proveniente do grupo Alta P4-D5 foi excluído, pois apresentou no dia do abate concentração sérica de progesterona com valor 2,74 ng/ml sendo que a média para este grupo foi de $9,10 \pm 1,61$ ng/ml. Dois animais do grupo Alta P4-D6 foram excluídos, pois não apresentaram nenhum folículo com diâmetro maior que 6 mm no momento do abate. Um animal do grupo Alta P4 + PE foi excluído das análises, pois no D5 (remoção do CIDR e aplicação de prostaglandina) apresentou concentração de progesterona 1,19 ng/ml, concentração esta considerada baixa, sendo

que a média para este grupo neste mesmo momento foi de $7,76 \pm 1,23$ ng/ml. Um animal proveniente do grupo Baixa P4-D5 foi excluído do experimento, pois apresentou no dia do abate concentração de progesterona de 9,04 ng/ml sendo que a média para este grupo foi de $2,40 \pm 0,38$ ng/ml. Dois animais do grupo Baixa P4-D6 foram excluídos das análises por apresentarem no dia do abate concentrações séricas de progesterona de 5,73 ng/ml e 5,60 ng/ml respectivamente, sendo que a média para este grupo foi de $1,04 \pm 0,30$ ng/ml. Dois animais do grupo Baixa P4 + PE foram excluídos das análises pois apresentaram progesterona no D5 (Retirada do CIDR e aplicação de prostaglandina) com concentração de 7,21 ng/ml e 6,76 ng/ml, sendo que a média para este grupo neste mesmo momento foi de $3,05 \pm 0,82$ ng/ml.

Com estes nove animais removidos das análises finais e comparações estatísticas, o número final de animais disponíveis para as análises neste experimento foi de 36 novilhas, distribuídas nos grupos da seguinte forma: Alta P4-D5 n = 6, Baixa P4-D5 n = 7, Alta P4-D6 n = 6, Baixa P4-D6 n = 6, Alta P4 + PE n = 6 e Baixa P4 + PE n = 5.

Análises Estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas por ANOVA utilizando o programa SAS 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Inicialmente todas variáveis foram analisadas avaliando: Modelo 1 (Animais G1 e G2 vs. G3 e G4 = D5 vs. D6), verificando assim efeito da duração do tratamento, efeito do nível de progesterona e a interação; Modelo 2 (Animais G3 e G4 vs. G5 e G6 = D6 vs. PE), verificando assim efeito do proestro, efeito do nível de progesterona e a interação. Foi utilizado o modelo proc mixed do SAS. No modelo analisamos todas as variáveis, verificando efeito da progesterona, do tratamento (Modelo 1: duração 5 ou 6; Modelo 2: com ou sem proestro) e suas interações. Como efeito aleatório foi incluído no modelo o animal dentro de cada tratamento. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão (lsmeans) com ajuste pdiff. Diferenças significativas foram consideradas quando o valor de P foi menor que 0,05, consideradas tendência quando o valor de P menor que 0,10.

Após realizarmos análises comparando animais nos modelos 1 e 2 (efeito da progesterona, duração e proestro) foi realizado no programa SAS análise de correlação de Pearson entre concentração de progesterona e diâmetro folicular, correlação entre

progesterona e expressão dos genes alvo, correlação entre diâmetro do folículo dominante e expressão dos genes avaliados e também análises de Correlação.

Referências Material e Métodos

ECHTERNKAMP, S.E., L.J. SPICER, K.E. GREGORY, S.F. CANNING., J.M. HAMMOND. Concentrations of insulin-like growth factor-1 in blood and ovarian follicular fluid of cattle selected for twins. *Biol. Reprod.* 43:8-14. 1990.

FARIA, C. U., MAGNABOSCO, C. U., ALBUQUERQUE, L. G., REYES, A. BEZERRA, L. A. F., LOBO, R. B. Utilização de escores visuais de características morfológicas de bovinos nelore como ferramenta para o melhoramento genético animal. Embrapa Gado de Corte, Documentos n. 177. www.cpac.embrapa.br/download/1193/t. 2007.

KIRBY, C. J., M. F. SMITH, D. H. KEISLER, AND M. C. LUCY. Follicular function in lactating dairy cows treated with sustained-release bovine somatotropin. *J. Dairy Sci.* 80:273–285. 1997.

MICHAEL W. PFAFFL in: Real-time PCR. Published by *International University Line* (Editor: T. Dorak), p 63-82. 2001.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45. doi:10.1093/NAR/29.9.E45. 2001.

RAMAKERS C, RUIJTER JM, DEPREZ RH, MOORMAN AF. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett.* 339: 62-66. 2003.

3. RESULTADOS

Serão apresentados os resultados do Modelo 1- Duração e P4 (G1: Alta e Baixa D5 e G2: Alta e Baixa D6) e do Modelo 2 – Proestro e P4 (G2: Alta e Baixa D6 e G3: Alta e Baixa + PE).

Modelo 1

Não houve interação entre duração (5 ou 6 dias) e o nível de progesterona (Alta e Baixa) para nenhuma variável mensurada. Os resultados quanto à duração do tratamento estão apresentados na Tabela 2. A duração do tratamento não alterou significativamente os níveis séricos de progesterona no momento do abate (D5: $5,75 \pm 0,67$ ng/ml e D6: $4,31 \pm 0,69$ ng/ml; $P = 0,152$), diâmetro folicular (D5: $10,83 \pm 0,73$ mm e D6: $11,29 \pm 0,76$ mm; $P = 0,668$), concentração de estradiol circulante ($3,50 \pm 0,51$ pg/ml e $3,63 \pm 0,53$ pg/ml; $P = 0,866$) e IGF-1 livre no soro ($110,35 \pm 9,39$ ng/ml e $122,83 \pm 9,74$ ng/ml; $P = 0,367$). Duração do tratamento, também não afetou as concentrações de estradiol ($P = 0,811$), progesterona ($P = 0,256$) e IGF-1 ($0,312$) presentes no líquido folicular. Quanto à expressão de RNAm de LHR, 3β -HSD, StAR e P450scc não apresentaram diferença significativa em folículos provenientes de tratamentos durante 5 ou 6 dias após ablação folicular. O único parâmetro que apresentou efeito de duração do tratamento, e consequentemente idade folicular, foi a expressão de RNAm da enzima aromatase, que apresentou no D5 valor médio de $1,04 \pm 0,24$ vs. $1,76 \pm 0,24$ no D6 ($P = 0,0498$).

Tabela 2 – Efeito da Duração – Modelo 1

	D5	D6	P
n	13	12	.
P4D0 (ng/ml)	5,64 ± 1,04	5,18 ± 1,08	0,7649
P4 abate (ng/ml)	5,75 ± 0,67	4,31 ± 0,69	0,1525
FD (mm)	10,83 ± 0,73	11,29 ± 0,76	0,6685
E2 abate (pg/ml)	3,50 ± 0,51	3,63 ± 0,53	0,8663
E2 Fol. (pg/ml)	265,82 ± 68,16	243,40 ± 62,78	0,8114
P4 Fol. (ng/ml)	85,29 ± 8,86	70,41 ± 9,19	0,2569
Razão E2/P4	4,28 ± 1,32	3,54 ± 1,22	0,6838
IGF-1 abate (ng/ml)	110,35 ± 9,39	122,83 ± 9,74	0,367
IGF-1 Fol. (ng/ml)	96,97 ± 8,00	108,28 ± 7,37	0,312
LHR	1,67 ± 0,54	1,47 ± 0,56	0,8036
3β-HSD	1,30 ± 0,30	1,06 ± 0,31	0,5879
StAR	8,25 ± 3,41	2,48 ± 3,71	0,2659
P450scc	1,80 ± 0,35	2,24 ± 0,36	0,4031
Aromatase	1,04 ± 0,24	1,76 ± 0,24	0,0498

No Modelo 1, o efeito do nível de Progesterona nas diversas análises está demonstrado na Tabela 3. Não houve diferença nas concentrações séricas de progesterona no D0, resultado este esperado, pois todos os animais foram pré-sincronizados. Nosso tratamento foi eficaz em alterar a concentração sérica de progesterona, sendo a concentração sérica de progesterona no momento do abate para Baixa P4 de $1,72 \pm 0,67$ ng/ml e para Alta P4 de $8,34 \pm 0,69$ ng/ml ($P < 0,0001$). O nível de progesterona afetou o diâmetro do folículo dominante, sendo $12,66 \pm 0,73$ mm para animais tratados com Baixa P4 e $9,45 \pm 0,76$ mm para Alta P4 ($P = 0,006$). A concentração de estradiol no soro sanguíneo foi alterada pelo tratamento, sendo $4,74 \pm 0,51$ pg/ml para animais submetidos à Baixa P4 e $2,39 \pm 0,53$ pg/ml para submetidos à Alta P4 ($P = 0,004$).

O tratamento com diferentes níveis de progesterona afetou a concentração intrafolicular de estradiol (Baixa P4: $401,42 \pm 60,50$ pg/ml e Alta P4: $107,80 \pm 70,19$ pg/ml; $P = 0,005$), porém não alterou a concentração intrafolicular de progesterona ($P = 0,460$). A progesterona não afetou a concentração de IGF-1 livre tanto no soro sanguíneo ($P = 0,726$), quanto no líquido folicular ($P = 0,697$).

Os resultados de expressão gênica nos animais tratados com Baixa vs. Alta P4 no Modelo 1 serão demonstrados a seguir. Animais tratados com Baixa P4 apresentaram maior expressão de RNAm do receptor de LH nas células da granulosa ($2,92 \pm 0,54$) comparado a animais tratados com Alta P4 ($0,22 \pm 0,56$), $P = 0,002$. Progesterona também afetou a expressão da enzima 3β -HSD (Baixa P4: $1,89 \pm 0,30$ e Alta P4: $0,46 \pm 0,31$; $P = 0,003$). Aromatase também foi afetada pela concentração de progesterona a qual o folículo foi exposto (Baixa P4: $1,94 \pm 0,24$ vs. Alta P4: $0,85 \pm 0,24$; $P = 0,005$). Não houve diferença significativa na expressão de P450scc ($P = 0,393$) e StAR ($P = 0,142$).

Tabela 3 – Efeito da Progesterona – Modelo 1

	Baixa P4	Alta P4	P
n	13	12	.
P4D0 (ng/ml)	5,66 ± 1,04	5,16 ± 1,08	0,7447
P4 abate (ng/ml)	1,72 ± 0,67	8,34 ± 0,69	<0,0001
FD (mm)	12,66 ± 0,73	9,45 ± 0,76	0,0062
E2 abate (pg/ml)	4,74 ± 0,51	2,39 ± 0,53	0,0046
E2 Fol. (pg/ml)	401,42 ± 60,50	107,80 ± 70,19	0,0051
P4 Fol. (ng/ml)	82,65 ± 8,86	73,05 ± 9,19	0,4608
Razão E2/P4	6,06 ± 1,17	1,76 ± 1,36	0,0281
IGF-1 abate (ng/ml)	118,99 ± 9,39	114,20 ± 9,74	0,7268
IGF-1 Fol. (ng/ml)	100,47 ± 7,10	104,78 ± 8,24	0,697
LHR	2,92 ± 0,54	0,22 ± 0,56	0,0024
3β-HSD	1,89 ± 0,30	0,46 ± 0,31	0,0039
StAR	9,22 ± 3,59	1,51 ± 3,54	0,1426
P450scc	2,24 ± 0,35	1,80 ± 0,36	0,3936
Aromatase	1,94 ± 0,24	0,85 ± 0,24	0,0051

Houve correlação negativa entre concentração de progesterona e expressão de RNAm do LHR (Figura 6), independente da duração do tratamento (Figura 7).

Figura 6 – Correlação progesterona e LHR – Modelo 1

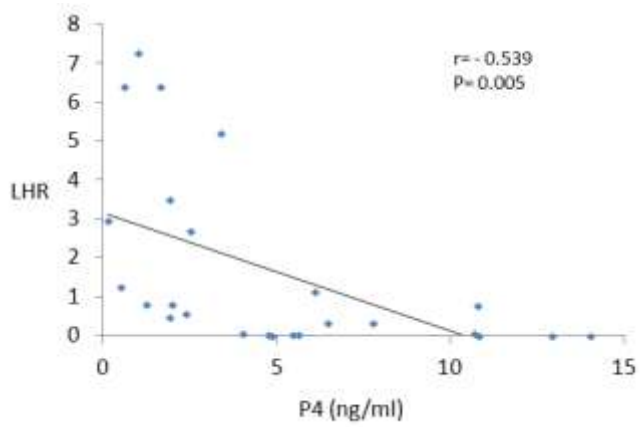
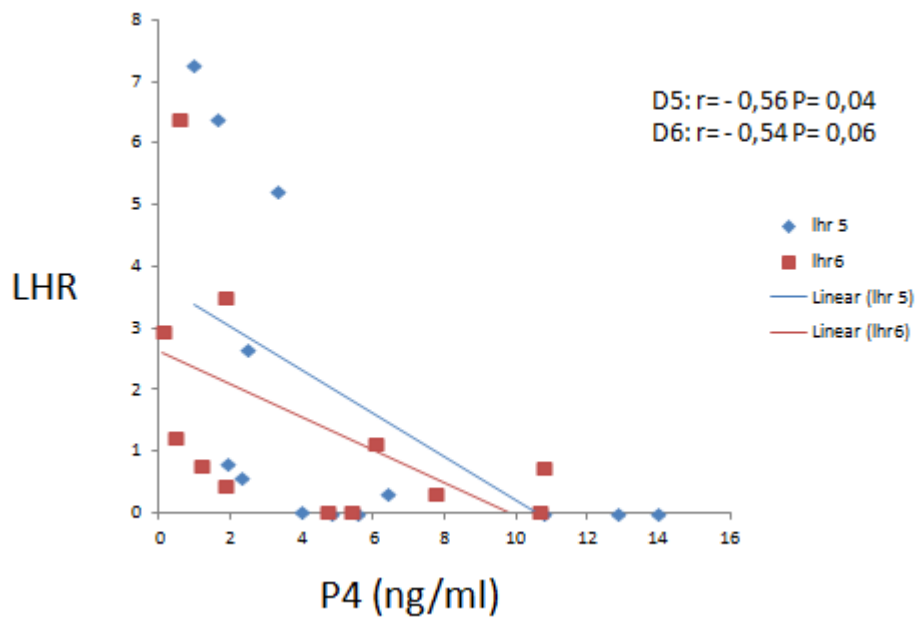
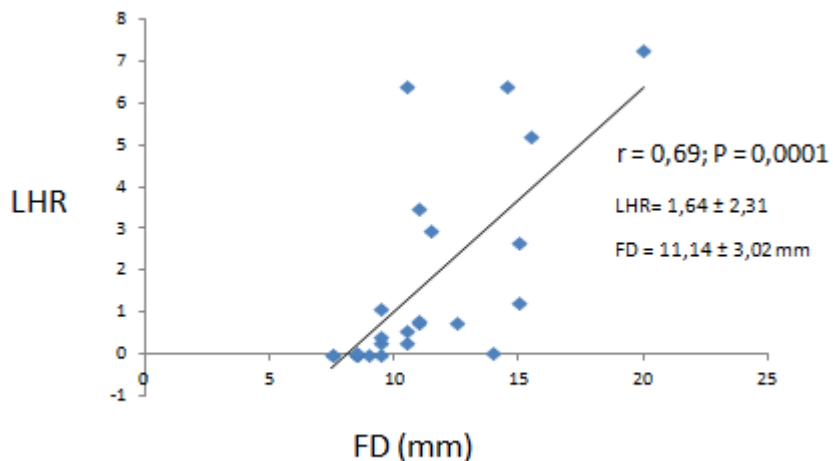


Figura 7 – Correlação progesterona e LHR - Grupos D5 e D6



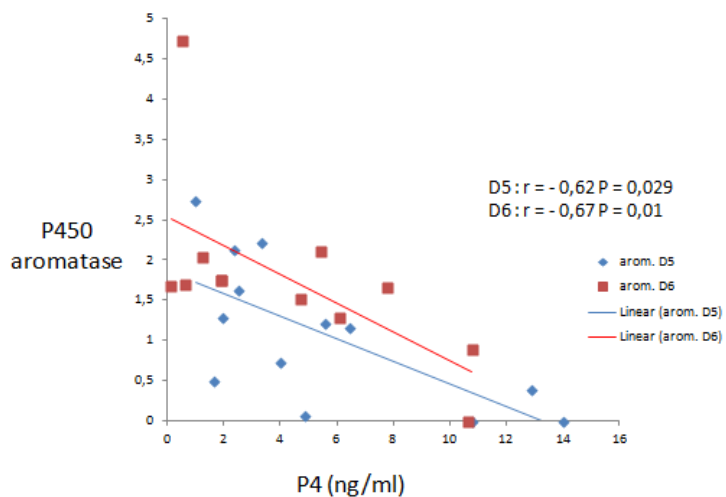
Houve correlação positiva ($r = 0,69$; $P = 0,0001$) entre a expressão do RNAm do LHR e diâmetro do folículo dominante, demonstrado na Figura 8.

Figura 8 – Correlação LHR e Folículo Dominante – Modelo 1



A expressão de RNAm da enzima P450aromatase apresentou uma correlação negativa com a concentração de progesterona ao qual o folículo foi exposto, independente da duração, demonstrado na figura 9.

Figura 9 – Correlação Aromatase e Progesterona plasmática – Modelo 1



Como a expressão da aromatase foi a única que apresentou diferença significativa quanto a duração do tratamento, foi realizado a correlação entre diâmetro folicular e expressão de aromatase (Figura 10). Houve diferença significativa na sua expressão

entre os dias D5 e D6 apenas em folículos menores que 10,5 mm, demonstrado na tabela 4.

Figura 10 – Correlação Aromatase e FD – Modelo 1

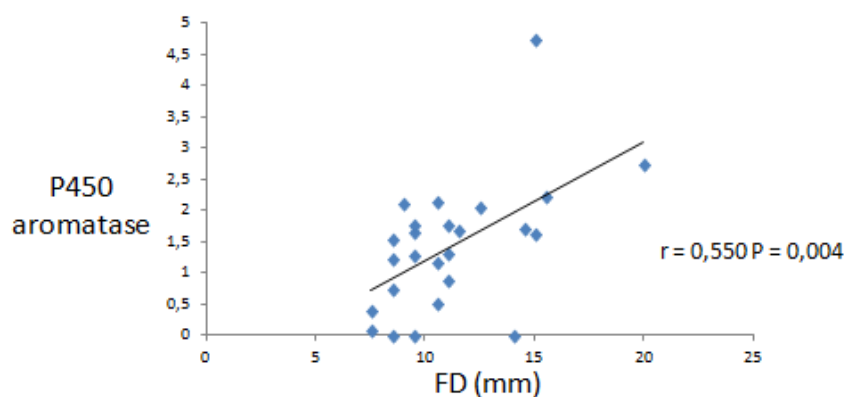


Tabela 4 – Aromatase: Diâmetro Folicular x Duração

Aromatase	D5	D6	P
Fol. < 10.5mm	0.49 ± 0.40	1.74 ± 0.41	0.021
Fol. > 10.5mm	1.15 ± 0.36	1.52 ± 0.33	0.423
P	0.238	0.679	

Modelo 2

No modelo 2 foram avaliados o efeito do proestro e do nível de progesterona (alta ou baixa). Não houve interação entre Proestro x P4, sendo assim os resultados serão apresentados separadamente.

A Tabela 5 mostra o efeito do proestro (D6: sem proestro e PE: com proestro). Não houve diferença na concentração de progesterona no D0 ($P = 0,490$) devido à pré-sincronização. Apenas animais submetidos ao proestro tiveram análise da progesterona no D5 (retirada do CIDR e aplicação de PGF).

Diferença significativa foi encontrada na concentração de progesterona circulante no momento do abate (D6: $4,52 \pm 0,46$ ng/ml e PE $0,48 \pm 0,58$ ng/ml; $P < 0,0001$). O proestro apresentou uma tendência em aumentar o diâmetro do folículo dominante, sendo $13,14 \pm 0,73$ mm para animais submetidos ao proestro e $11,41 \pm 0,58$ mm para animais não submetidos ao proestro ($P = 0,087$).

Apesar da diferença na concentração de progesterona no momento do abate, não houve diferença na concentração sérica de Estradiol neste mesmo momento ($P = 0,260$), também não houve diferença no IGF-1 livre tanto no soro ($P = 0,693$) quanto no líquido folicular ($0,957$). O proestro aumentou a concentração intrafolicular de Estradiol (PE = $941,22 \pm 122,27$ pg/ml e D6 = $239,47 \pm 96,93$ pg/ml; $P = 0,0005$). Não houve efeito do proestro na concentração intrafolicular de progesterona ($P = 0,665$).

O proestro não afetou a expressão de RNAm do receptor de LH ($P = 0,759$), 3β -HSD ($P = 0,655$), StAR ($P = 0,363$) e P450scc ($P = 0,897$). Porém, houve diferença significativa na expressão do RNAm da enzima P450 aromatase, sendo que o proestro estimulou a sua expressão, que apresentou valor de $18,16 \pm 3,67$ vs. $1,67 \pm 2,91$ quando não submetidos ao proestro ($P = 0,003$).

Tabela 5 – Efeito do Proestro – Modelo 2

	D6	PE	P
n	12	11	.
P4 D0 (ng/ml)	5,08 ± 1,32	6,59 ± 1,67	0,4903
P4 D5 (ng/ml)	.	5,29 ± 0,91	.
P4 abate (ng/ml)	4,52 ± 0,46	0,48 ± 0,58	<0,0001
FD (mm)	11,41 ± 0,58	13,14 ± 0,73	0,0874
E2 abate (pg/ml)	3,70 ± 0,64	4,92 ± 0,81	0,2605
E2 Fol. (pg/ml)	239,47 ± 96,93	941,22 ± 122,27	0,0005
P4 Fol. (ng/ml)	68,65 ± 4,58	71,91 ± 5,78	0,6658
Razão E2/P4	3,53 ± 1,36	13,18 ± 1,72	0,0006
IGF-1 abate (ng/ml)	125,04 ± 10,44	118,27 ± 13,16	0,6932
IGF-1 Fol. (ng/ml)	110,37 ± 9,99	109,50 ± 12,61	0,9577
LHR	1,508 ± 0,43	1,28 ± 0,55	0,7597
3β-HSD	1,03 ± 0,15	1,15 ± 0,20	0,6551
StAR	2,55 ± 1,98	5,48 ± 2,39	0,3634
P450scc	2,02 ± 0,36	1,94 ± 0,45	0,8978
Aromatase	1,67 ± 2,91	18,16 ± 3,67	0,0034

Similar aos resultados já apresentados quanto ao efeito da progesterona em animais do modelo 1 (5 ou 6 dias de duração do tratamento), mostraremos agora o efeito da progesterona alta ou baixa nestes animais submetidos ou não ao proestro (Tabela 6 - Modelo 2 – mesma duração dos tratamentos). Não houve interação proestro x P4.

Houve tendência estatística na concentração de progesterona sérica no D5 (momento da retirada do CIDR em animais submetidos ao proestro), sendo $3,10 \pm 1,38$ ng/ml em animais tratados com baixa P4 e $7,48 \pm 1,19$ ng/ml em animais tratados com alta P4 ($P = 0,062$). Já no momento do abate a diferença foi significativa (Baixa P4: $0,66 \pm 0,53$ ng/ml e Alta P4: $4,35 \pm 0,51$ ng/ml; $P = 0,0002$).

A baixa progesterona aumentou significativamente o diâmetro folicular ($13,75 \pm 0,68$ mm vs. $10,81 \pm 0,64$ mm para Alta P4; $P = 0,007$).

A progesterona afetou a concentração de estradiol circulante ($P = 0,059$) e observamos uma tendência para estradiol no líquido folicular ($P = 0,093$). Não houve diferença na concentração folicular de progesterona ($P = 0,337$). Não houve efeito nas concentrações séricas de IGF-1 livre e também de IGF-1 livre no líquido folicular ($P = 0,436$ e $0,417$ respectivamente).

Os resultados de expressão gênica mostraram que houve efeito da progesterona no receptor de LH, sendo maior nos grupos tratados com baixa P4 ($2,12 \pm 0,50$ vs. $0,67 \pm 0,48$ para Alta P4; $P = 0,057$). Diferença significativa foi encontrada para a enzima 3 β -HSD ($P = 0,001$).

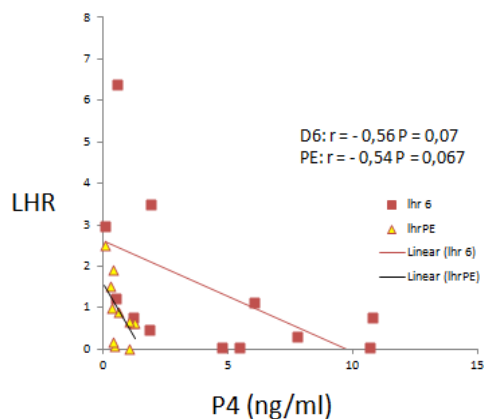
A enzima StAR apresentou valores para Baixa P4 de $6,71 \pm 2,29$ e a Alta P4 valor de $1,32 \pm 2,10$ ($P = 0,106$). Não houve diferença para P450scc ($P = 0,928$) e, diferente das análises anteriores, não houve diferença para a expressão de RNAm da P450 aromatase (Baixa P4: $13,30 \pm 3,40$ e Alta P4: $6,53 \pm 3,22$; $P = 0,171$).

Tabela 6 – Modelo 2 – Efeito da progesterona – Mesma duração

	Baixa	Alta	P
n	11	12	.
P4D0 (ng/ml)	6,36 ± 1,54	5,31 ± 1,46	0,628
P4 D5 (ng/ml)	3,10 ± 1,38	7,48 ± 1,19	0,0624
P4 abate (ng/ml)	0,66 ± 0,53	4,35 ± 0,51	0,0002
FD (mm)	13,75 ± 0,68	10,81 ± 0,64	0,0075
E2 abate (pg/ml)	5,38 ± 0,75	3,25 ± 0,71	0,0599
E2 Fol. (pg/ml)	730,96 ± 113,20	449,73 ± 107,39	0,093
P4 Fol. (ng/ml)	73,95 ± 5,35	66,61 ± 5,08	0,3371
Razão E2/P4	10,82 ± 1,59	5,89 ± 1,51	0,0421
IGF-1 abate (ng/ml)	114,93 ± 12,19	128,38 ± 11,56	0,4368
IGF-1 Fol. (ng/ml)	103,21 ± 11,67	116,66 ± 11,07	0,4174
LHR	2,12 ± 0,50	0,67 ± 0,48	0,0573
3β-HSD	1,61 ± 0,18	0,57 ± 0,17	0,0011
StAR	6,71 ± 2,29	1,32 ± 2,10	0,1067
P450scc	2,01 ± 0,42	1,95 ± 0,40	0,9282
Aromatase	13,30 ± 3,40	6,53 ± 3,22	0,1711

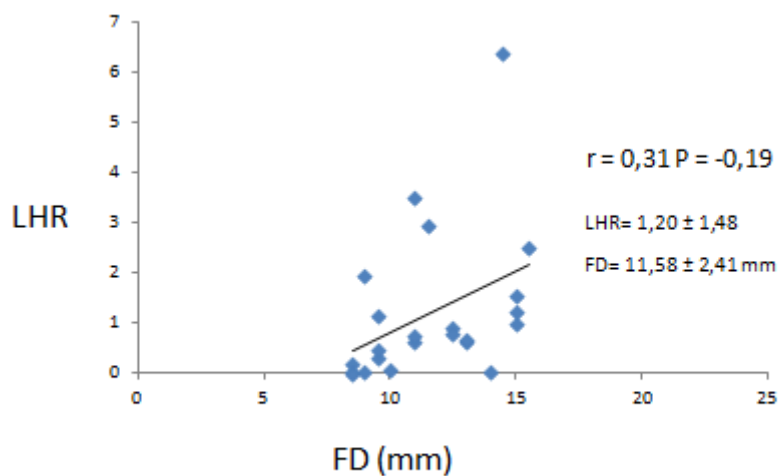
Houve correlação negativa entre concentração de progesterona e expressão de LHR nos grupos submetidos ao proestro (PE) ou não (D6). Figura 11.

Figura 11- Correlação progesterona LHR – Modelo 2



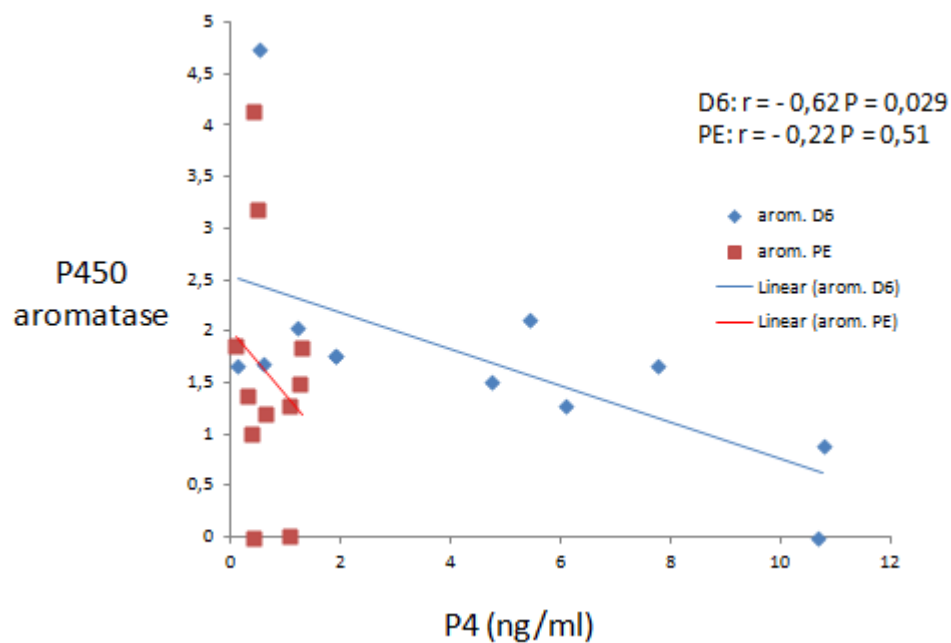
Correlacionando a expressão de RNAm do LHR com o diâmetro folicular no segundo modelo, não houve correlação, conforme demonstrado na figura 12.

Figura 12 – Correlação LHR e diâmetro folicular



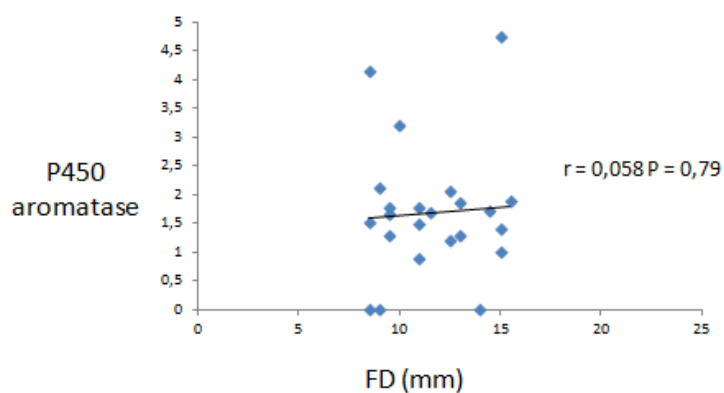
A enzima aromatase apresentou diferença quanto a duração do tratamento e concentração de progesterona no modelo 1, e efeito do proestro. Não apresentou diferença no modelo 2 quanto ao efeito da progesterona, realizamos a correlação entre aromatase e progesterona no Modelo 2. Figura 13.

Figura 13 – Correlação Aromatase e progesterona – Modelo 2



Não houve correlação entre esta enzima e a concentração de progesterona quando submetidos ao proestro ($r = -0,22$, $P = 0,51$). Adicionalmente, não houve correlação da aromatase com o diâmetro folicular, conforme demonstrado na Figura 14.

Figura 14 – Correlação aromatase e diâmetro folicular – Modelo 2



Correlações

Depois de avaliados os efeitos dos diferentes tratamentos nas dosagens hormonais e expressão gênica, foram analisados no programa SAS a correlação de Pearson entre concentração de progesterona e diâmetro folicular.

A correlação (Tabela 7) entre concentração de progesterona no momento do abate e o diâmetro folicular foi $r = -0,43$ ($P = 0,022$), quando retiramos das análises animais submetidos ao proestro a correlação permaneceu aproximadamente a mesma $r = -0,45$, $P = 0,048$. Animais dos grupos tratados durante 5 dias e que receberam um dia de proestro apresentaram forte correlação da progesterona no dia 5 (momento da retirada do CIDR e aplicação de prostaglandina) com o diâmetro do Folículo Dominante (correlação $r = -0,719$, $P = 0,028$).

Tabela 7 – Correlação Diâmetro folicular com concentração de progesterona

Correlação	FD	P
P4 abate	- 0,43	0,022
P4 grupos D5 e D6	- 0,45	0,048
P4d5 grupo proestro	- 0,719	0,028

Analisando a correlação entre concentração de progesterona e expressão gênica (Tabela 8) verificamos uma correlação média para os genes LHR, 3 β -HSD e P450arom, já para STAR e P450scc a correlação foi baixa.

Tabela 8 – Correlação concentração de progesterona e expressão gênica

Correlação	P4abate grupos D5 e D6	P	P4d5 (grupo proestro)	P
LHR	- 0,539	0,017	- 0,341	0,367
3β-HSD	- 0,506	0,027	- 0,619	0,075
STAR	- 0,278	0,262	- 0,287	0,452
P450scc	- 0,37	0,118	- 0,309	0,418
P450arom	- 0,659	0,002	- 0,176	0,649

Analisando a correlação do diâmetro do Folículo Dominante com a expressão gênica (Tabela 9), encontramos forte correlação com 3 β -HSD ($r = 0,719$; $P = 0,0001$), correlação média para LHR ($r = 0,561$; $P = 0,0019$) e STAR ($r = 0,605$; $P = 0,0008$), baixa correlação para P450scc ($r = 0,247$; $P = 0,204$) e P450arom ($r = 0,132$; $P = 0,5$). Isto comprova que o gene 3 β -HSD pode ser utilizado como um marcador de diâmetro do Folículo Dominante (FD).

Tabela 9 – Correlação diâmetro folicular com expressão gênica

Correlação	FD	<i>P</i>
LHR	0,561	<i>0,0019</i>
3β-HSD	0,719	<i>0,0001</i>
STAR	0,605	<i>0,0008</i>
P450scc	0,247	<i>0,204</i>
P450arom	0,132	<i>0,5</i>

4. DISCUSSÃO

O importante achado deste experimento foi que a alta progesterona afeta negativamente o desenvolvimento folicular por reduzir a expressão de RNAm do receptor de LH e de enzimas esteroidogênicas como 3β -HSD e P450 aromatase, afetando assim a produção de estradiol pelas células foliculares. Alta progesterona afeta negativamente o diâmetro folicular e estes achados sugerem que o efeito negativo se prolongue até a formação do corpo lúteo, uma vez que evidências mostraram que um corpo lúteo normal seja dependente de níveis adequados de LHR em células da granulosa (Garverick e Smith, 1986).

Spicer et al. (1986b) propuseram que a aquisição de maior expressão de LHR e maior secreção de estradiol são fatores críticos para o período pré-ovulatório e fatores limitantes para adequada função do corpo lúteo. Aquisição de certa quantidade de receptores de LH e capacidade esteroidogênica permitem que o folículo ovule e luteinize em resposta ao pico de LH. Mais receptores de LH e uma maior secreção de estradiol são necessários para o folículo se tornar um corpo lúteo funcional (Inskeep et al., 1988).

A reduzida frequência dos pulsos de LH está associada a uma redução na esteroidogênese e no tamanho do folículo (Badinga et al., 1992). Assim, o LH pode influenciar a expressão de enzimas esteroidogênicas em folículos dominantes. Folículos de segunda onda folicular apresentam maior crescimento e expressão de enzimas esteroidogênicas, influenciado por pulsos de LH. Sabemos que a P4 pode afetar o diâmetro do folículo dominante (Martins et al., 2014) e com base em nossos resultados influenciar a expressão de enzimas esteroidogênicas (3β -HSD e aromatase) e LHR.

Com base nos dados de Martins et al. (2014) que mostraram o diâmetro folicular no dia 7 do protocolo, 7 dias após aplicação de BE (CIDR1: 6,54 mm vs. CIDR3: 7,33 mm) sugerimos que esta diferença seja causada pela diferente concentração de progesterona. É provável que a maioria dos folículos já atingisse a dominância no dia 7 do protocolo e este momento é afetado negativamente pela alta concentração de progesterona (Ginther et al., 1996).

Como em nossos dados a baixa progesterona permitiu um maior tamanho do folículo dominante e foi relatado que o folículo de maior diâmetro se tornará um corpo lúteo com maior produção de progesterona (Peres et al., 2009; Perry et al., 2007;

Vasconcelos et al., 2001), nossos resultados sugerem que este aumento na produção de progesterona pelo corpo lúteo possa ocorrer devido a maior expressão de LHR nas células da granulosa que sofrem o processo de luteinização.

Folículos pequenos apresentam diminuição na taxa de concepção e ovulação e estão associados com diminuição da concentração de E2 pré-ovulatório e a diminuição das concentrações circulantes de P4 no diestro subsequente (Perry et al., 2005; Vasconcelos et al., 2001). Diminuição na taxa de ovulação em novilhas com folículos pequenos na IATF é consistente com achados por Gimenes et al. (2008). Assim, a ovulação de folículos dominantes com status adequado parece ser crítica para a fertilidade. Com base nestes dados, folículos menores que 10,7 mm apresentaram menores taxas de prenhez, mesmo quando administrado E2 exógeno (Martins et al., 2014), sugerimos que isso ocorra devido a menor expressão de LHR, menor expressão de enzimas esteroidogênicas e uma produção de estradiol deficiente. Mesmo com aplicação de E2 exógeno, o mais importante foi o diâmetro folicular (Martins et al., 2014), confirmando ser mais importante a maturidade folicular estimulada pela baixa P4.

Vacas em anestro, quando tratadas com progesterona apresentaram aumento nas concentrações circulantes e intrafolicular de estradiol, aumento nos pulsos de LH e aumento no número de LHR nas células da granulosa e teca (Inskeep et al., 1988; Rhodes et al., 2002; Baruselli et al., 2004) que contribuíram para maior porcentagem de animais expressando estro após retirada do CIDR (Sá Filho et al., 2010). É evidente a relação negativa da alta progesterona com fertilidade principalmente em novilhas Nelore. Nossos dados mostram que esta alta progesterona afeta negativamente a expressão principalmente de LHR independente da duração do tratamento. Dados de expressão de estro foram apresentados por Claro Junior et al. (2010) em que animais tratados com baixa P4 apresentaram maior percentual de estro. Relacionamos assim menor expressão de LHR com menor atividade esteroidogênica (pela redução de 3 β -HSD e principalmente aromatase), sendo então este folículo menos capaz de produzir estradiol suficiente para expressão do estro.

Nossos dados não mostraram diferença quanto a duração do tratamento, apenas para a expressão de RNAm da enzima aromatase que é aumentada com a maturidade e desenvolvimento folicular sendo mais sensível às mudanças foliculares e relacionando com produção de estradiol. Martins et al. (2014) mostraram que maior duração do

tratamento com CIDR (9 vs. 7 dias, após aplicação de BE) reduziu o intervalo entre remoção do CIDR e estro, melhorando a taxa de concepção e prenhez. Ainda mostraram que o intervalo entre remoção de CIDR e estro foi negativamente correlacionado com diâmetro folicular, assim quanto maior diâmetro folicular, menor o intervalo para o estro. Estes folículos estariam em um estágio mais avançado do desenvolvimento e apresentaram assim melhores índices, em nosso experimento a diferença em um dia de duração aumentou a aromatase, podendo ser o primeiro fator a explicar melhor preparação folicular. Porém, como o efeito principal foi relacionado à progesterona, folículos expostos à baixa progesterona apresentam maior maturidade folicular (expressão de LHR, enzimas esteroideogênicas e concentração de estradiol) refletindo em melhores índices reprodutivos.

Roberson et al. (1989) observaram maiores concentrações de E2 em vacas que receberam níveis subnormais de P4. Isto sugere estágio de maturação folicular avançado em vacas que receberam níveis subnormais de P4. As populações de folículos ovarianos presentes no início da fase folicular, após a remoção do dispositivo intravaginal de progesterona, apresentaram maturidade mais avançada nas vacas que receberam níveis subnormais de P4. Isso explica por que os grupos submetidos à baixa progesterona apresentaram níveis mais elevados de LHR, 3 β -HSD e P450arom em comparação com grupos de alta progesterona, sugerindo estágio de desenvolvimento folicular mais avançado.

Em nosso estudo a correlação entre tamanho folicular e expressão de RNAm de LHR foi de $r = 0,56$ ($P = 0,0019$). Estudos anteriores indicaram que o aumento do diâmetro folicular está relacionado com o aumento de LHR (Ireland e Roche, 1983; Spicer et al, 1995; Webb et al., 1992). Com base na correlação mediana encontrada em nossos dados, entendemos que o principal efeito na expressão gênica do folículo dominante é baseado no nível de progesterona o qual este folículo foi submetido durante seu desenvolvimento. A expressão de LHR não estaria apenas relacionada ao diâmetro, assim mesmo folículos de mesmo tamanho apresentariam diferentes expressões de LHR, sendo quando submetidos à baixa progesterona apresentam maior expressão e consequentemente melhor qualidade.

O primeiro folículo que adquire LHR nas células da granulosa se torna dominante (Xu et al., 1995), isto pode explicar que talvez em ambiente de baixa progesterona a

dominância ocorra mais cedo, preparando o folículo e o oócito mais precocemente. A alta progesterona atrasa este processo.

Em bovinos, a maioria das evidências sugerem que as células da granulosa expressam LHR após o folículo se tornar dominante. Nogueira et al. (2007) demonstraram que LHR não era detectável em células da granulosa de folículos <7 mm de diâmetro (não dominantes). Estes dados sugerem que as células da granulosa não adquirem LHR funcional até o processo de seleção do folículo dominante ocorrer. Ereno et al. (2015) sugeriram que a expressão de RNAm do LHR nas células da granulosa é estabelecida após o desvio folicular ocorrer. Nossos dados levantam a hipótese de que a alta progesterona atrasa o processo de seleção e por isso apresentaram expressão reduzida de LHR no início da dominância folicular. Simões et al. (2012) demonstraram que a capacidade ovulatória em Nelore é relacionada com maior diâmetro folicular e expressão de LHR nas células da granulosa.

Claro Junior et al. (2010) demonstraram que ocorre diferença no diâmetro folicular entre animais tratados com CIDR1 vs. CIDR4. Nossos dados mostram que a concentração de progesterona ao qual o folículo é exposto durante o desenvolvimento interfere na expressão de LHR, a alta P4 afeta negativamente esta expressão, porém, folículos submetidos à baixa P4 ao final do desenvolvimento (proestro), poderia acelerar o desenvolvimento de folículos expostos à alta P4, contudo em nossos dados a concentração de P4 foi o principal fator, mesmo a diferença sendo reduzida com um dia de proestro (LHR entre alta e baixa P4; Modelo 1: $P = 0,0034$; Modelo 2: $P = 0,0573$). O proestro neutralizou o efeito da P4 na expressão de aromatase (aromatase entre alta e baixa P4; Modelo 1: $P = 0,005$; Modelo 2: $P = 0,171$). Estes resultados explicam a taxa de crescimento folicular encontrada nos dados de Martins et al., (2014) em que animais submetidos a alta progesterona durante o protocolo apresentaram maior taxa de crescimento folicular após a retirada do implante intravaginal de progesterona. Portanto, alta progesterona interfere negativamente a expressão de LHR nas células da granulosa de folículos dominantes, porém estes folículos quando submetidos à baixa progesterona ao final do desenvolvimento (proestro) apresentam um desenvolvimento acelerado. Como em nosso estudo os animais foram submetidos apenas a um dia de proestro, não foi suficiente para apresentar diferenças significativas no LHR, mostrando a concentração de

P4 ser o principal regulador da qualidade folicular e a aromatase sendo sensível à duração, nível de P4 e proestro.

Antagonista GnRH e hipótese LH - LHR

Nos dados de Luo et al. (2011) não houve diferença na expressão de FSHr, apenas para LHR. Surgiu assim a hipótese de que o LH estimula a expressão do seu próprio receptor, podendo ser diretamente, ou indiretamente através da regulação de fatores nas células da teca, culminando na produção de androstenediona e consequentemente estradiol, que afetaria estes receptores. Nossos dados em Novilhas Nelore mostram que baixa P4 permite maior diâmetro folicular, e confirmamos nossa hipótese de que a progesterona influencia a expressão de LHR e enzimas esteroidogênicas como 3 β -HSD e aromatase, estes relacionados com o desenvolvimento folicular.

Nas células da granulosa, LH regula as concentrações de RNAm de numerosos genes que funcionam na esteroidogênese, sinalização autócrina e parácrina, na transdução de sinal intracelular, na regulação do citoesqueleto e apoptose (Sekar et al., 2000; Sasson et al., 2004.). Então, LH estimula a expressão de enzimas esteroidogênicas em células da teca, incluindo StAR, CYP11 e CYP17. Hampton et al. (2004) mostraram que o LH estimula a expressão de CYP17 nas células da teca, refletindo uma maior produção de androstenediona e maior concentração de estradiol no líquido folicular. Em nosso experimento demonstramos que baixa progesterona estimula a expressão principalmente de 3 β -HSD, LHR e P450arom em células da granulosa (aromatase tempo dependente, sendo afetada também pela duração, diminuindo a diferença quando os folículos foram submetidos ao proestro). Ainda, Beg et al. (2001) apresentaram dados em que a aquisição de LHR se inicia antes de diferenças na concentração de estradiol e como sendo importante no estabelecimento do diâmetro e desvio folicular.

As ações do GnRHa nos dados de Luo et al. (2011) foram provavelmente mediadas pela redução no pulsos de LH. Em nosso experimento, a progesterona influenciou a concentração de estradiol no fluido folicular, encontramos grande diferença na expressão de LHR e 3 β -HSD em células da granulosa. A aromatase foi afetada pela duração do tratamento, pela concentração de progesterona e pelo proestro. A alta progesterona afetou negativamente as enzimas esteroidogênicas e LHR e, consequentemente, a

produção de estradiol pelas células da granulosa. Desta forma, a alta progesterona afeta negativamente o desenvolvimento folicular e produção de estradiol pelas células da granulosa, comprometendo a função do futuro corpo lúteo.

Com estes dados e resultados de nosso grupo de pesquisa (Martins et al., 2014) conclui-se com nosso experimento que a concentração de progesterona influencia a expressão de LHR e algumas enzimas esteroidogênicas em células da granulosa de novilhas da raça Nelore. Os nossos dados comprovaram que o estímulo com baixa progesterona aumentou a expressão de LHR e consequentemente a qualidade do folículo. Soumano et al. (1996) apresentaram evidências que sugerem que a expressão de aromatase possa ser regulada pela atividade do LH. Em nosso estudo mostramos que a P4 afeta a expressão desta enzima importante para a esteroidogênese.

Orisaca et al. (2006) avaliaram os mesmos genes avaliados em nosso experimento e mostraram a importância das células da teca influenciando a produção de estradiol através da produção de androstenediona. A injeção de FSH estimulou a expressão de aromatase, mas não a produção de estradiol. As células da teca não foram o foco do nosso trabalho, porém, folículos expostos a diferentes níveis de progesterona apresentaram diferentes concentrações de estradiol. Desta forma, propomos que a baixa P4 estimula a expressão do LHR, 3β -HSD e aromatase, que estimulam o desenvolvimento folicular e produção de estradiol.

Richards e Rolfes (1980) mostraram que o estradiol é também responsável por facilitar a diferenciação de células da granulosa, incluindo a indução de receptores de FSH, LH e prolactina. Em conjunto com o LH e FSH, estradiol estimula o acúmulo de AMPc (Richards et al., 1979) e aumenta o número de sítios de ligação de AMPc em células da granulosa (Richards & Rolfes, 1980). Eles sugeriram que o estradiol estimula a aquisição de receptor de LH, nossos dados não estabelecem o mecanismo específico, mas provamos que o nível de progesterona é capaz de afetar tanto a produção de estradiol pelo folículo quanto a expressão de LHR e enzimas esteroidogênicas (3β -HSD e aromatase), porém não podemos afirmar qual acontece primeiro ou se é um processo que acontece simultaneamente.

P450scc

Fortune (1986) mostrou que andrógeno proveniente da teca (que é estimulada por LH) pode aumentar a capacidade de células da granulosa em produzir pregnenolona e explicar o efeito estimulador do LH sobre a secreção de pregnenolona pela parede do folículo (Com influência do P450scc). Os resultados apresentados acima fornecem evidências de que as células da granulosa secretam pregnenolona e assim aumentam a produção de androstenediona pela teca através do fornecimento de precursor. Experimentos em que pregnenolona e progesterona foram adicionadas a cultivo de células da teca demonstraram que a pregnenolona é o substrato preferido para a síntese de androstenediona pelas células da teca. Desta forma, P450scc é importante pois converte o colesterol em pregnenolona, e a 3 β -HSD converte pregnenolona em progesterona, que é um importante substrato para as células teca.

Adição de Hormônio Luteinizante aumentou a produção de pregnenolona pela parede do folículo, mas não pelas células da granulosa isoladas (Fortune, 1986). Isto sugere que um produto das células da teca, estimulada pelo LH, pode aumentar a capacidade de células da granulosa para produzir pregnenolona. Esta hipótese foi suportada pela observação de que os níveis mais elevados de pregnenolona foram secretados por células da granulosa cultivadas com testosterona exógena.

Em resumo, Fortune (1986) sugere que as células da granulosa desempenham um papel na síntese de andrógeno, fornecendo progestinas como precursor às células da teca. Em nossos dados não houve nenhum efeito sobre a expressão de P450scc que afetaria a conversão do colesterol em pregnenolona, portanto esta etapa da esteroidogênese não foi influenciada pela progesterona, mostrando que o efeito encontrado é específico da progesterona na expressão de outros genes relacionados à esteroidogênese e desenvolvimento folicular. Esta enzima não foi afetada pelos tratamentos por ser normalmente instável e dificilmente há alterações em resposta a tratamentos.

O nível de progesterona, duração do tratamento ou exposição ao proestro não estão envolvidos na regulação da P450scc. Isso porque não encontramos diferença na expressão destes genes em animais submetidos a elevada vs. baixas concentrações de progesterona ($P = 0,963$ para P450scc).

Enzimas esteroidogênicas e o LH

Os níveis de expressão de RNAm para receptores de gonadotrofinas (LHR e FSHR), enzimas esteroidogênicas (P450scc, P450c17, P450arom, e 3 β -HSD), e StAR em células da teca e (ou) células da granulosa geralmente aumentam durante a fase de crescimento dos folículos e diminui durante a atresia (Bao et al., 1997a, b, c). Em geral, LHR, P450scc, P450c17, 3 β -HSD, e StAR nas células da teca são expressas a partir do momento da formação da camada de células da teca e decresce com a atresia. Em contraste com as células da teca, a expressão destes genes em células da granulosa é dependente do estágio de desenvolvimento folicular. Expressão de LHR e 3 β -HSD em células da granulosa foi detectado após o início da onda em torno do momento de seleção do folículo dominante. Nossos resultados mostram que a baixa de progesterona estimula a maior expressão destes genes. Já em alta progesterona esta expressão é reduzida, sugerindo assim que mesmo com o diâmetro de um folículo dominante, alta progesterona influencia negativamente a expressão destes genes.

O efeito do tratamento com antagonista de GnRH forneceu evidências de que a indução de aromatase durante a seleção do folículo não é mediada pela ação de LH nas células da granulosa (Luo et al., 2011). Os nossos resultados mostram diferença na expressão da aromatase relacionadas à duração do tratamento, sendo maior nos tratamentos com maior duração. Ainda a baixa progesterona afetaria positivamente sua expressão. O proestro também foi capaz de estimular a expressão de aromatase, neutralizando o efeito da alta P4, sugerindo esta ser uma enzima mais sensível às mudanças foliculares. Portanto, estes achados evidenciam que a estimulação da aromatase ocorre de diferente maneira comparado ao LHR e 3 β -HSD. Enquanto estes foram diretamente influenciados pelos níveis de P4, aromatase seria influenciada por diversos fatores como idade, nível de P4 durante o desenvolvimento e em estágios mais avançados (proestro). Luo et al. (2011) indicaram que o mecanismo de indução da aromatase seria diferente ao de indução do LHR, isto devido à diferente resposta próximo ao momento de seleção e quando tratados com GnRHa.

Para folículos maiores que 10,5 mm não houve diferença na expressão de aromatase entre o D5 e D6, porém, para folículos pequenos (<10,5 mm), a duração do tratamento interferiu na expressão desta enzima, sendo maior com um dia a mais de tratamento (Aromatase; Fol < 10,5 mm, D5: $0,49 \pm 0,40$ vs. D6: $1,74 \pm 0,41$; $P = 0,021$).

3 β -HSD e LHR

Em nosso experimento, encontramos diferença na concentração intrafolicular de estradiol, na expressão de LHR, P450arom e 3 β -HSD. Esta diferença ocorre devido à diferente concentração de progesterona durante o crescimento do folículo. Com base nos resultados de Pfeifer et al. (2009) em que a concentração de progesterona estimula a pulsatilidade de LH; com base em Luo et al. (2011) que LH poderia estimular a expressão de seu próprio receptor e analisando dados de Martins et al. (2014) com novilhas Nelore que respondem com diferentes taxas de crescimento folicular quando submetidas a diferentes concentrações de progesterona durante o protocolo, a progesterona interfere na expressão do LHR e desenvolvimento do folículo dominante, afetando a produção de estradiol e regulação na expressão de enzimas esteroidogênicas.

Manikkam et al (2001) demonstraram que a infusão de LH estimula a expressão de 3 β -HSD em células da granulosa. Após a luteólise, ocorre aumento RNAm de citocromo P450scc e 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (3 β -HSD) (Tian et al., 1995). Esta resposta pode ser devida a um aumento no número de pulsos de LH e um aumento no número de receptores de LH (Rahe et al., 1980; Ireland e Roche, 1983; Schallenberger et al., 1984). Os nossos resultados vêm confirmando esta influencia, em que a progesterona influencia a expressão de LHR e, provavelmente, a expressão 3 β -HSD, mas não a expressão de P450scc.

A expressão do RNAm da 3 β -HSD no interior das células da granulosa pode ser associada com o mecanismo de seleção do folículo dominante durante uma onda folicular e pode ser necessária para a produção de esteróides durante dominância folicular (Bao et al., 1997). Desta forma, a expressão de 3 β -HSD é importante para a produção de estradiol pelo folículo dominante. A expressão deste gene permaneceu elevada em todos os grupos submetidos a tratamento com baixa progesterona. Expressão de 3 β -HSD em células da granulosa aumentou com o aumento do tamanho dos folículos ($r = 0,665$ $P < 0,01$; Bao et al, 1997c). Em nosso experimento a correlação entre 3 β -HSD e diâmetro do folículo dominante foi alta ($r = 0,719$, $P = 0,0001$), confirmando dados de Bao et al. (1997c).

A diferença que encontramos na expressão de 3β -HSD mostra que a progesterona interfere no processo de dominância folicular, com a baixa progesterona estimulando a conversão de pregnenolona em progesterona por esta enzima em folículos dominantes.

Correlação Enzimas e FD

De acordo com dados de Bao et al. (1997b), o tamanho folicular foi positivamente correlacionado com a expressão de RNAm para os receptores de gonadotropinas e enzimas esteroidogênicas. As correlações mais fortes com tamanho folicular foram encontradas na expressão de RNAm para P450arom, LHR e P450scc nas células da granulosa. Diferente destes dados, nosso estudo não encontrou forte correlação entre a expressão destes genes e o tamanho do folículo (P450arom $r = 0,132$, $P = 0,5$; P450scc $r = 0,247$, $P = 0,204$), porém para outros genes a correlação foi superior e estatisticamente significativa (3β -HSD $r = 0,719$, $P = 0,0001$; StAR $r = 0,605$, $P = 0,0008$; LHR $r = 0,561$, $P = 0,0019$).

IGF-1

Manikkam e Rajamahendran (1997) relataram que a disponibilidade de IGF-1 nas células foliculares aumenta a capacidade de resposta para o FSH e LH proporcionando crescimento adicional e produção aumentada de esteroides, os nossos resultados não mostraram nenhuma diferença na concentração de IGF-1 livre entre os grupos de alta ou baixa progesterona, o que mostra que a diferença nos folículos foi devido à influência da concentração de progesterona na expressão de LHR e algumas enzimas esteroidogênicas, pois caso houvesse diferença na concentração de IGF-1 poderia ser um efeito indireto devido ao sinergismo que esse fator proporcionaria à ação do FSH e LH.

O IGF-1 aumenta a capacidade de resposta das células foliculares às gonadotrofinas para aumentar a secreção de esteroides foliculares, como nossos resultados não mostraram diferença neste hormônio, as diferenças no diâmetro do folículo que ocorrem quando os folículos são submetidos a diferentes concentrações de progesterona é devido ao LHR e enzimas esteroidogênicas que são alterados pelo efeito da concentração de progesterona.

Além disso, Luo et al. (2011) mostraram que o tratamento com antagonista de GnRH reduziu a expressão de PAPP-A (Proteína Plasmática Associada a Gestação- A)

que é uma protease de IGFBP. IGFBPs combinam com IGF-1 reduzindo a disponibilidade de IGF-1 livre. Assim, reduzindo a expressão de PAPP-A permite aumento de IGFBP e, conseqüentemente, reduz IGF-1 intrafolicular. Em nosso experimento não houve diferença nas concentrações de IGF-1 livre. Como nós não medimos a expressão de PAPP-A, caso ocorresse esta diferença provavelmente seria mais tardia, com base em que a progesterona não alterou as concentrações de IGF-1 livre.

O complexo relacionado com o IGF-1 é importante para o processo de dominância, no nosso experimento não houve diferença entre os tratamentos alta vs. baixa progesterona, que mostra que os folículos estavam realmente na mesma fase de dominância, apresentando algumas enzimas esteroidogênicas e LHR alterados influenciados pela concentração de progesterona. Como Luo et al. (2011) mostraram diferença na expressão de PAPP-A mas em nossos dados não houve diferença em IGF-1, provavelmente, o efeito deste hormônio seria mais tardio caso ocorra.

StAR

Luo et al. (2011) encontraram redução significativa na expressão da StAR em células da teca de vacas tratadas com antagonista de GnRH. Nossos dados não apresentaram diferenças significativas na StAR quando analisadas nas células da granulosa, sugerindo que duração do tratamento, proestro e nível de progesterona não afetam esta enzima, sendo esta etapa provavelmente regulada por outros fatores metabólicos. Esta enzima não foi afetada pelos tratamentos por ser normalmente instável e dificilmente há alterações em resposta a tratamentos.

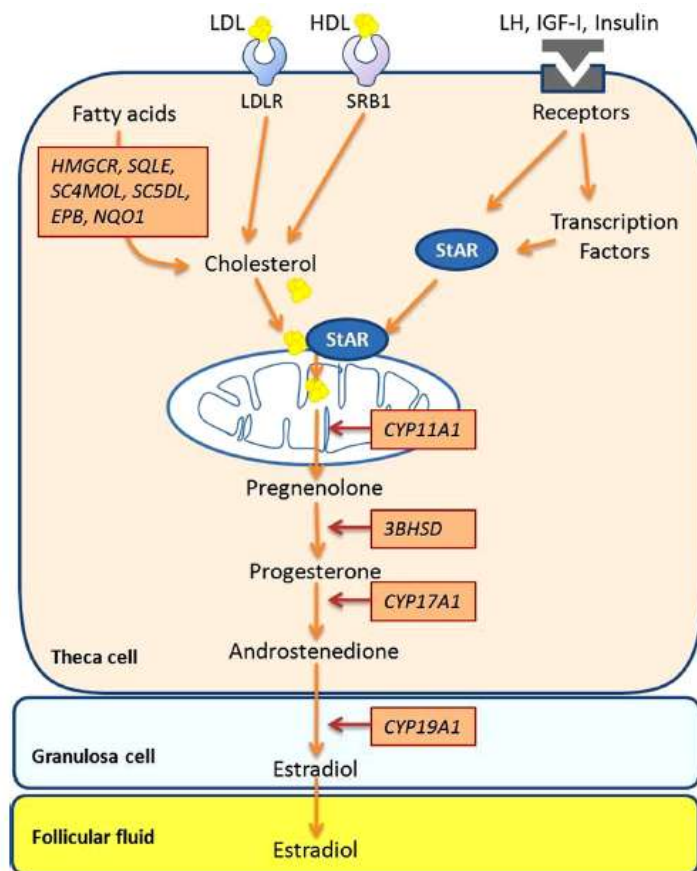


Figura 15 – Modelo esquemático da seleção de genes envolvidos na biossíntese de colesterol e esteroidogênese. Internalização do colesterol extracelular na forma de lipoproteínas de alta densidade (HDL) e baixa densidade (LDL) através de seus receptores (LDLR e SRB1) na membrana das células da teca, enquanto colesterol intracelular é obtido através de ácidos graxos. Colesterol livre é então transportado para a mitocôndria pela StAR. Esta é uma etapa limitante para a formação do estradiol nas células da teca e células da granulosa (Walsh et al., 2012).

Este modelo demonstra que a StAR é limitante para a produção de estradiol. Como não encontramos diferenças entre os tratamentos na expressão deste gene, foram calculados a correlação entre StAR e outros genes e foi encontrada alta correlação entre StAR e β -HSD e também correlação média com o LHR. Foi baixa a correlação entre StAR e P450scc e aromatase. Desta forma, mantém a hipótese de que StAR afeta o desenvolvimento do folículo dominante, porém sem relação com o nível de progesterona, duração ou proestro em que o folículo foi exposto, tendo apenas correlação com expressão de alguns genes independente do grupo tratado.

Tabela 10 - Correlação entre StAR e outros genes

Correlação	StAR	P
LHR	0,52	0,005
3β-HSD	0,773	<0,0001
P450scc	-0,065	0,745
P450arom	0,1	0,618

Walsh et al. (2012) mostraram que o ambiente metabólico comprometido diminui a expressão de StAR e contribui para a redução da capacidade do folículo dominante em produzir estradiol. Este estado metabólico comprometido poderia estar relacionado com baixa pulsatilidade de LH fisiológico e este apresentar um efeito indireto na expressão de StAR e outros genes.

Com base no exposto foi avaliada a correlação entre StAR e IGF-1, E2 e diâmetro folicular, em que verificamos apenas correlação entre esta enzima e diâmetro folicular e ainda com concentração de estradiol circulante no momento do abate.

Tabela 11 – Correlação StAR com FD, IGF-1 e E2

Correlação	StAR	P
IGF-1sg	0,17	0,38
IGF-1ff	-0,13	0,52
E2a	0,59	0,001
E2ff	-0,08	0,68
FD	0,6	0,0008

Comparações P4 x duração x proestro

-Baixa P4-D5 vs. Alta P4-D6

Comparação importante foi em animais submetidos a 6 dias de tratamento com CIDR1 e animais submetidos a 5 dias de tratamento com CIDR3. De acordo com cálculos realizados com os dados de Martins et al. (2014), a taxa de crescimento folicular em animais CIDR3 é de 1,2mm por dia da emergência até o desvio e de 1,01 mm/dia após o desvio até a retirada do CIDR, já o crescimento folicular em animais CIDR1 é de 0,95 mm/dia antes do desvio e 0,85 mm/dia após desvio até a retirada do CIDR. Assim, era esperado que animais submetidos à baixa progesterona até o dia 5 tivesse diâmetro folicular próximo a animais com CIDR1 até o dia 6. Assim, verificamos o padrão de expressão gênica de folículos com diâmetro folicular semelhante, porém submetidos a diferentes exposições de progesterona.

O grupo Baixa P4-D5 apresentou média do diâmetro folicular de $13,0 \pm 1,51$ mm, já o grupo Alta P4-D6 média de $10,25 \pm 2,01$ mm ($P=0,6112$). Os dados apresentados mostram que a progesterona influencia a expressão gênica e que um ambiente com baixa progesterona permite um desenvolvimento mais rápido do folículo dominante. Alta progesterona apresenta um desenvolvimento mais lento e provavelmente seja necessário um período mais longo para atingir a maturidade folicular. Mesmo sendo um dia mais novo, folículos do grupo Baixa P4-D5 apresentaram significativamente maior expressão de LHR ($3,284 \pm 1,131$ vs. $0,330 \pm 0,188$; $P = 0,0117$) e 3β -HSD ($2,348 \pm 0,733$ vs. $0,674 \pm 0,118$; $P = 0,0311$). Isto demonstra que animais submetidos à alta progesterona durante o protocolo necessitam de um período maior para ficarem preparados fisiologicamente para o processo ovulatório, mesmo não havendo diferença significativa entre os diâmetros foliculares entre os dois grupos.

- Baixa P4-D6 vs. Alta P4 + PE

Nos grupos tratados por 5 dias com CIDR e abatidos no dia 6 (proestro) foi observado a diferença em relação a expressão gênica quando comparado a animais que continuaram com o tratamento até o dia 6, verificando animais com folículos de mesma idade, porém diferentes exposições à progesterona, verificando o efeito molecular de um importante manejo utilizado no final de protocolos de IATF que consiste na retirada do dispositivo intravaginal de progesterona, reduzindo sua concentração no proestro. De

acordo com cálculos realizados com dados de Martins et al. (2014), o crescimento folicular em animais CIDR3 após a retirada do CIDR é 1,01 mm/dia, já em animais CIDR1 é 1,33 mm/dia, o que torna importante a comparação de folículos com ou sem CIDR nos estágios finais do crescimento folicular e ainda qual foi o efeito da retirada do CIDR em animais tratados com CIDR1 vs. CIDR3.

Comparando folículos do grupo Baixa P4-D6 (média $12,33 \pm 0,86$ mm) com o grupo Alta P4 + PE ($10,66 \pm 1,83$ mm) $P = 0,6190$, analisamos assim folículos com mesma idade, porém submetidos a diferentes concentrações de progesterona durante o desenvolvimento porém com o grupo submetido a alta progesterona recebendo o efeito benéfico do proestro no final do desenvolvimento, não houve diferença significativa no diâmetro folicular entre estes grupos.

Estes dados mostram que o proestro foi efetivo em acelerar o desenvolvimento do folículo submetido à alta P4, pois não houve diferença significativa em relação a expressão de LHR ($2,562 \pm 0,914$ vs. $0,718 \pm 0,273$; $P = 0,1878$). Por outro lado, a expressão de 3β -HSD continuou apresentando diferença significativa ($1,447 \pm 0,254$ vs. $0,562 \pm 0,138$; $P = 0,0168$), demonstrando que provavelmente seria necessário um maior período de proestro para igualar o estágio de desenvolvimento folicular.

5. CONCLUSÃO

Baseado nos principais resultados encontrados, conclui-se que a concentração de P4 em que o folículo foi exposto foi determinante para a qualidade folicular, sendo a expressão de RNAm do LHR e as enzimas esteroidogênicas 3 β -HSD e aromatase negativamente influenciada pela alta concentração de progesterona. A duração do tratamento não interferiu na qualidade folicular, sendo a enzima aromatase a única alterada em folículos de diferentes idades.

Para animais tratados com baixa progesterona o folículo apresentou maior expressão gênica e maiores níveis de estradiol, essenciais para um adequado processo ovulatório. A duração do período a partir da emergência em que o folículo se desenvolveu mostrou não ser o principal fator relacionado ao desenvolvimento folicular, sendo o nível de progesterona o principal regulador. O proestro seria capaz de minimizar o efeito negativo da alta progesterona, porém durante o período que foi exposto neste estudo, a progesterona se apresentou como principal fator regulador do desenvolvimento folicular.

Assim, alta progesterona afeta negativamente o desenvolvimento folicular independentemente da duração do tratamento e exposição ao proestro, sendo o LHR, 3 β -HSD, aromatase e concentração intrafolicular de estradiol os principais responsáveis pela deficiente qualidade folicular em animais tratados com alta P4.

6. REFERÊNCIAS

- BADINGA, L., DRIANCOURT, M.A., SAVIO, J.D., WOLFENSON, D., DROST, M., DE LA SOTA, R.L., THATCHER, W.W. Endocrine and ovarian responses associated with the first wave dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* 46, 871–883. 1992.
- BAO B, GARVERICK HA, SMITH GW, SMITH MF, SALFEN BE, YOUNGQUIST RS. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biol Reprod.* 56:1158–68. 1997.
- BAO, B., H. A. GARVERICK, G. W. SMITH, M. F. SMITH, B. E. SALFEN, AND R. S. YOUNGQUIST. Changes in messenger RNA encoding LH receptor, cytochrome P450 side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biol. Reprod.* 56:1158-1168. 1997b.
- BAO, B., H. A. GARVERICK, G. W. SMITH, M. F. SMITH, B. E. SALFEN, AND R. S. YOUNGQUIST. Expression of messenger RNA encoding 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/(17 β -isomerase during recruitment and selection of bovine ovarian follicles: identification of dominant follicles by expression of 3 β -HSD mRNA within the granulosa cell layer. *Biol. Reprod.* 56: 1466-1473. 1997c.
- BARUSELLI PS, REIS EL, MARQUES MO, NASSER LF, BÓ GA. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Anim Reprod Sci* 82/83:479–86. 2004.
- BEG MA, BERGFELT DR, KOT K, WILTBANK MC, GINTHER OJ. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biol Reprod.* Feb;64(2):432-41. 2001.
- CARVALHO JBP, CARVALHO NAT, REIS EL, NICHI M, SOUZA AH, BARUSELLI PS. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*. 69:167–75. 2008.
- DIAS CC, WECHSLER FS, DAY ML, VASCONCELOS JLM. Progesterone concentrations, exogenous equine chorionic gonadotropin, and timing of prostaglandin F2 α treatment affect fertility in postpubertal Nelore heifers. *Theriogenology*. 72:378–85. 2009.
- ERENO RL, LOUREIRO B, CASTILHO A, MACHADO MF, PEGORER MF, SATRAPA RA, NOGUEIRA M, BURATINI J, BARROS CM. Expression of mRNA Encoding the LH Receptor (LHR) and LHR Binding Protein in Granulosa Cells from Nelore (*Bos indicus*) Heifers Around Follicle Deviation. *Reprod Domest Anim.* Oct 8. doi: 10.1111/rda.12614. 2015.
- FORTUNE, J. E. Bovine theca and granulosa cells interact to promote androgen production. *Biol. Reprod.* 35:292-299. 1986.

FORTUNE, J. E., AND S. M. QUIRK. Regulation of steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. *J. Anim. Sci.* 66(Suppl. 2):1-8. 1988.

GARVERICK HA, SMITH MF. Mechanisms associated with subnormal luteal function. *J Anim Sci* 62:92-105 (Suppl.) 1986

GIMENES LU, SÁ FILHO MF, CARVALHO NAT, TORRES-JÚNIOR JRS, SOUZA AH, MADUREIRA EH, et al. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*. 69:852–8. 2008.

GINTHER OJ, WILTBANK MC, FRICKE PM, GIBBONS JR, KOT K. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod*. 55:1187–1194. 1996.

GINTHER OJ, BERGFELT DR, BEG MA, MEIRA C, KOT K. In vivo effects of an intrafollicular injection of insulin-like growth factor 1 on the mechanism of follicle deviation in heifers and mares. *Biol Reprod*. 70:99–105. 2004.

HAMPTON JH, BADER JF, LAMBERSON WR, SMITH MF, YOUNGQUIST RS, GARVERICK HA. Gonadotropin requirement for dominant follicle selection in GnRH agonist-treated cows. *Reproduction*. 127:695–703. 2004.

INSKEEP EK, BRADEN TD, LEWIS PE, GARCIA-WINDER M, NISWENDER GD. Receptors for luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in largest follicles of postpartum beef cows. *Biol Reprod*. 38:587–91. 1988.

IRELAND JJ, ROCHE JF. Development of nonovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. *Endocrinology*. 112:150–6. 1983.

LUO, W., GUMEN, A., HAUGHIAN, J.M., WILTBANK, M.C. The role of Luteinizing Hormone in Regulating Gene Expression During Selection of Dominant Follicle in Cattle. *Biology of Reproduction*, 84(2):369-378. 2011.

MANIKKAM, M., AND R. RAJAMAHENDRAN. Progesterone-induced atresia of the proestrous dominant follicle in the bovine ovary: changes in diameter, insulin-like growth factor system, aromatase activity, steroid hormones, and apoptotic index. *Biol. Reprod*. 57:580-587. 1997.

MANIKKAM, M., CALDER, M.D., KEISLER, D.H., SALFEN, B.E., GARVERICK, H.A., YOUNGQUIST, R.S. 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. Repr. Science*. 67:189-203. 2001.

MARTINS T, PERES RFG, RODRIGUES ADP, POHLER KG, PEREIRA MHC, DAY ML, VASCONCELOS JLM. Effect of progesterone concentrations, follicle diameter, timing of artificial insemination, and ovulatory stimulus on pregnancy rate to synchronized artificial insemination in postpubertal Nellore heifers. *Theriogenology*. 81: 446-453. 2014.

NOGUEIRA MF, BURATINI J JR, PRICE CA, CASTILHO AC, PINTO MG, BARROS CM. Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: changes with follicle size and regulation by FSH in vitro. *Mol Reprod Dev.* 74:680–686. 2007.

ORISAKA M¹, MIZUTANI T, TAJIMA K, ORISAKA S, SHUKUNAMI K, MIYAMOTO K, KOTSUJI F. Effects of ovarian theca cells on granulosa cell differentiation during gonadotropin-independent follicular growth in cattle. *Mol Reprod Dev.* Jun;73(6):737-44. 2006.

PERES RFG, JÚNIOR IC, SÁ FILHO OG, NOGUEIRA GP, VASCONCELOS JLM. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. *Theriogenology.* 72:681–9. 2009.

PERRY, G. A., M. F. SMITH, M.C. LUCY, J. A. GREEN, T.E. PARKS, M. D. MACNEIL, A. J. ROBERTS, AND T. W. GEARY. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:5268–5273. 2005.

PERRY GA, SMITH MF, ROBERTS AJ, MACNEIL MD, GEARY TW. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. *J Anim Sci.* 85:684–9. 2007

PFEIFER LFM, MAPLETOFT RJ, KASTELIC JP, SMALL JA, ADAMS GP, DIONELLO NJ, SINGH J. Effects of low versus physiologic plasma progesterone concentrations on ovarian follicular development and fertility in beef cattle. *Theriogenology.* 72:1237-1250. 2009.

RAHE CH, OWENS RE, FLEEGER JL, NEWTON HJ, HARMS PG. Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: dependence upon the period of the cycle. *Endocrinology.* 107:498–503. 1980.

RHODES FM, BURKE CR, CLARK BA, DAY ML, MACMILLAN KL. Effect of treatment with progesterone and oestradiol benzoate on ovarian follicular turnover in postpartum anoestrous cows and cows which have resumed oestrous cycles. *Anim Reprod Sci* 69:139–50. 2002.

RICHARDS JS, JONASSEN JA, ROLFES AI, KERSEY K, REICHERT LE Jr. Adenosine 3', 5'-monophosphate, LH receptor and progesterone during granulosa cell differentiation: effects of oestradiol and FSH. *Endocrinology.* 104:765-773. 1979.

RICHARDS JS, ROLFES AI. Hormonal regulation of cyclic AMP binding to specific receptor proteins in rat ovarian follicles. *J Biol Chem.* 225:5481-5489. 1980.

RICHARDS, J. S. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol. Rev.* 60:51-89. 1980.

ROBERSON MS, WOLFE MW, STUMPF TT, KITOK RJ, KINDER JE. Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of progesterone. *Biol Reprod.* 41:997–1003. 1989.

SÁ FILHO OG, DIAS CC, LAMB GC, VASCONCELOS JLM. Progesterone- based estrus synchronization protocols in non-suckled and suckled primiparous *Bos indicus* beef cows. *Anim Reprod Sci* doi:10.1016/j.anireprosci.2009.12.011. 2010.

SARTORELLI ES, CARVALHO LM, BERGFELT DR, GINTHER OJ, BARROS CM. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology*. 63:2382–94. 2005.

SASSON R, RIMON E, DANTES A, COHEN T, SHINDER V, LAND-BRACHA A, AMSTERDAM A. Gonadotrophin-induced gene regulation in human granulosa cells obtained from IVF patients. Modulation of steroidogenic genes, cytoskeletal genes and genes coding for apoptotic signaling and protein kinases. *Mol Hum Reprod*. 10:299–311. 2004.

SCHALLENBERGER, E., SCHAMS, D., BULLERMANN, B., WALTERS, D.L. Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin in cows during prostaglandin induced regression of the corpus luteum. *J. Reprod. Fertil*. 71, 493–501. 1984.

SEKAR N, GARMEY JC, VELDHUIS JD. Mechanisms underlying the steroidogenic synergy of insulin and luteinizing hormone in porcine granulosa cells: joint amplification of pivotal sterol-regulatory genes encoding the low-density lipoprotein (LDL) receptor, steroidogenic acute regulatory (StAR) protein and cytochrome P450 side-chain cleavage (P450scc) enzyme. *Mol Cell Endocrinol*. 159:25–35. 2000.

SOUMANO, K., D.W. SILVERSIDES, F. DOIZ6, AND C.A. Price2. Follicular 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase and Cytochromes P450 17 α -Hydroxylase and Aromatase Messenger Ribonucleic Acids in Cattle Undergoing Superovulation'. *Biology of Reproduction* 55, 1419-1426. 1996.

SPICER LI, CONVEY EM, TUCKER HA, ECHTERNKAMP SE. Effects of intermittent injections of LHRH on specific binding of I-251 labeled gonadotropins to granulosa and theca, and concentrations of steroids in serum and ovarian follicles during postpartum anovulation in suckled beef cows. *Anim Sci* 62:1324-31. 1986b.

SPICER, L. J., AND S. E. ECHTERNKAMP. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domest. Anim. Endocrinol*. 12:223-245. 1995.

TIAN, X. C., A. K. BERNDTSON, AND J. E. FORTUNE. Differentiation of bovine preovulatory follicles during the follicular phase is associated with increases in messenger ribonucleic acid for cytochrome P450 side-chain cleavage, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, and P450 17 α -hydroxylase, but not P450 aromatase. *Endocrinology* 136:5102-5110. 1995.

VASCONCELOS, J. L. M., D. G. B. DEMÉTRIO, R. M. SANTOS, J. R. CHIARI, C. A. RODRIGUES, AND O. G. SÁ FILHO. Factors potentially affecting fertility of lactating dairy cow recipients. *Theriogenology* 65:192–200. 2006.

VASCONCELOS, J. L., R. SARTORI, H. N. OLIVEIRA, J. G. GUENTHER, AND M. C. WILTBANK. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology* 56:307– 314. 2001.

VASCONCELOS JLM, SÁ FILHO OG, PEREZ GC, SILVA ATN. Intravaginal progesterone device and/or temporary weaning on reproductive performance of anestrous crossbred Angus x Nelore cows. *Anim Reprod Sci.* 111:302–11. 2009.

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

WALSH, S. W., MEHTA, J. P., MCGETTIGAN, P. A., BROWNE, J. A., FORDE, N., ALIBRAHIM, R.M., MULLIGAN, F.J., LOFTUS, B., CROWE, M.A., MATTHEWS, D., DISKIN, M., MIHM, M., EVANS, A.C.O. Effect of the metabolic environment at key stages of follicle development in cattle: focus on steroid biosynthesis. *Physiol Genomics.* 44(9):504-17. 2012.

WEBB R, GONG JG, LAW AS, RUSBRIDGE SM. Control of ovarian function in cattle. *J Reprod Fertil Suppl.* 45:141-156. 1992.

CAPÍTULO 3

CONSIDERAÇÕES GERAIS E IMPLICAÇÕES

CONSIDERAÇÕES GERAIS E IMPLICAÇÕES

De acordo com a conclusão do experimento em que animais submetidos à baixa progesterona apresentaram maior expressão de LHR e das enzimas 3β -HSD e aromatase, verificamos que novilhas Nelore apresentam fisiologicamente um nível alto de progesterona e sabemos que o metabolismo dos mesmos é reduzido, assim quando submetidos a protocolos de alta progesterona ocorre uma menor expressão de LHR, menor produção de E2 e consequentemente menor P4 após IATF, sendo que faz-se necessário utilização de protocolos com baixas concentrações de P4, através de implantes previamente utilizados e aplicação adiantada de PGF para minimizar o efeito deletério da alta progesterona. Quando se utiliza protocolos com baixa progesterona, estes folículos adquirem expressão de LHR no momento ideal, correlacionando-se com capacidade ovulatória e produção de P4 no diestro subsequente, o que é benéfico para os resultados reprodutivos.

Em contraste, vacas de leite, apresentam baixas concentrações de progesterona devido à metabolização hepática e maior fluxo sanguíneo, estes animais apresentam concentrações de progesterona muito baixas, e assim provavelmente os folículos adquirem LHR precocemente, porém como o desenvolvimento folicular necessita de um período maior para maturidade oocitária, apresenta assim um efeito negativo da baixa progesterona nessa categoria animal, sob baixas concentrações de P4, folículo pré-ovulatório e oócito são expostos a maior período de elevados pulsos de LH que podem levar a ovulação de um oócito superestimulado ou prematuramente ativado com reduzida fertilidade.