

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS ARAÇATUBA

EFEITOS DA NUTRIÇÃO NO DESENVOLVIMENTO
OVARIANO FETAL DURANTE O INÍCIO DA GESTAÇÃO
EM VACAS NELORE

Heni Falcão da Costa
Médica Veterinária

Araçatuba – SP
2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS ARAÇATUBA

**EFEITOS DA NUTRIÇÃO NO DESENVOLVIMENTO
OVARIANO FETAL DURANTE O INÍCIO DA GESTAÇÃO
EM VACAS NELORE**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária – UNESP,
Campus de Araçatuba, como parte
das exigências para a obtenção do
título de Doutor em Ciência Animal
(Medicina Veterinária Preventiva e
Produção Animal).

Heni Falcão da Costa

Orientador: Prof. Adj. Guilherme de Paula Nogueira

Araçatuba – SP
2014

Catálogo na Publicação (CIP)
Serviço de Biblioteca e Documentação

Costa, Heni Falcão da

C837e

Efeitos da nutrição no desenvolvimento ovariano fetal durante o início da gestação em vacas Nelore / Heni Falcão da Costa. --
Araçatuba: [s.n.], 2014.
73 f. il.; + CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2014

Orientador: Prof. Adj. Guilherme de Paula Nogueira

1. Reprodução Fisiologia. 2. Fenômenos fisiológicos da nutrição materna. 3. Ovário. 4. Expressão gênica 5. Bovinos. T.

CDD 571.81



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação



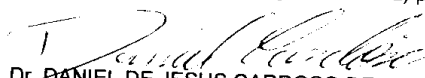
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Efeito da nutrição no desenvolvimento ovariano fetal durante o início da gestação
em vacas Nelore.

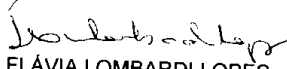
AUTORA: HENI FALCÃO DA COSTA

ORIENTADOR: Dr. GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTORA em CIÊNCIA ANIMAL
(MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E PRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora.


Dr. DANIEL DE JESUS CARDOSO DE OLIVEIRA


Dr. ALEXANDRE MENDONÇA PEDROSO


Dra. FLÁVIA LOMBARDI LOPES


Dra. JULIANA REGINA PEIRÓ


Dr. GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA

DATA DA REALIZAÇÃO: 5 de setembro de 2014.


Presidente da Comissão Examinadora
Dr. GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA
- Orientador -

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

HENI FALCÃO DA COSTA – nascida no dia 11 de maio de 1982, no município de São Joaquim da Barra – SP, é médica veterinária formada pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de Araçatuba (2006). Realizou aprimoramento profissional em Medicina Veterinária Preventiva e Mestrado na mesma área na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de Botucatu (2007-2010), ambas sob orientação do Prof. Dr. José Rafael Modolo, titular da disciplina de Planejamento de Saúde Animal e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP campus de Botucatu. Foi bolsista Fundap (nº 46050/07-9) durante o aprimoramento profissional e bolsista CNPq (no. 550806/2008-3.) e teve apoio financeiro para realização do projeto da FAPESP (nº 2008/10957-2). Ingressou no doutorado em março de 2011 na Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP campus de Araçatuba, no programa em Ciência Animal, na área de concentração Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal, sob orientação do Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira, docente responsável pelo Laboratório de Endocrinologia Animal da mesma. Foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), durante o doutorado, (bolsa DS), e teve o projeto de pesquisa financiado pela FAPESP (nº 2011/50839-1) e CNPq (nº 487036/2013-3).

DEDICATÓRIA

À **Deus**, que sempre esteve ao meu lado para guiar meus passos e me conduzir com sabedoria e amor nos Seus caminhos.

Aos meus pais, **Gilberto e Neusa**, pilares da minha vida! Agradeço por terem me ensinado valores e o verdadeiro sentido da palavra amor. Por me incentivarem a continuar meus estudos e pelo apoio nas minhas decisões.

Aos meus irmãos, **Heverton e Hélder**, nossa relação pode ser resumida com esta frase “Um por todos e todos por um!”.

Às minhas sobrinhas, **Brenda e Giovana**, que trouxeram mais luz para nossa família! E à minha cunhada **Adriana** por zelar tão bem das nossas maiores “riquezas”.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Adj. Guilherme de Paula Nogueira, agradeço-o pela oportunidade e por sua confiança em meu trabalho, pelos ensinamentos e conselhos, pelo amadurecimento, pela rigidez quando necessário e por ser um exemplo.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da FMVA - UNESP, pela oportunidade concedida para realização do doutorado.

Às professoras do curso de Medicina Veterinária e do programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Campus de Araçatuba, Dra. Juliana R. Peiró pela ajuda e orientação na “empreitada” da remoção fetal, pelos conselhos e pelos conhecimentos compartilhados e a Dra. Flávia L. Lopes pela ajuda fundamental na interpretação dos resultados do seqüenciamento, por ceder seu laboratório para realização das PCRs e agradeço acima de tudo pela paciência!

Ao pesquisador Dr. Alexandre M. Pedroso que aceitou, sem nem mesmo me conhecer, ajudar na formulação da dieta dos animais. Agradeço pelo esforço, compreensão e dicas.

Aos professores do Setor de Zootecnia do DPSA-FMVA-UNESP, Dr. Manoel G. Neto e Dr. Cecílio V.S. Filho, por cederem as instalações (curral e fábrica de ração) para realização do experimento a campo e aos funcionários do setor, Carlos e Laércio.

À Auxiliar Acadêmico Devani Mariano Pinheiro, “braços e pernas” do Laboratório de Endocrinologia Animal (FMVA), pelo convívio, ajuda, cuidado e carinho dedicado durante minha passagem. A todos os pós-graduandos do laboratório: Sarita, Maria Carolina, Rafael, Rosy, João Lucas, Cássia, Juliana, Marcos, Marco, David, Danilo, estagiários: Beatriz, Narian, Douglas, Jefferson, João Eduardo, Carlos e Joel. Ao técnico agrícola (e hoje aluno do curso de medicina veterinária) Edward pela ajuda indispensável com o manejo dos animais e nas pesadas tardes de segunda-feira quando preparávamos a tonelada da ração semanal!

À Dra. Carmen Zilda P. Toledo, médica veterinária que me inspirou ainda na infância pela profissão e que cruzou novamente meu caminho compartilhando seus ensinamentos nas cirurgias de remoção fetal.

Aos meus amigos – “A amizade é o conforto indescritível de nos sentirmos seguros com uma pessoa, sem ser preciso pesar o que se pensa, nem medir o que se diz” em especial: Michele, Fernanda, Sarita (e de quebra a pequenina Gabi), Anivaldo, Marissol, Silvana, Marina e Marcelo, Flávia, Laila, Kamila, Camila, Sayne, Vanessa, Selene e Adriana, cada um em cantos diferentes, mas que foram fundamentais nesse período e sempre serão!

Ao Professor Luis Lehman Coutinho, chefe do Laboratório Genômica Funcional Aplicada à Agropecuária e Agroenergia, ESALQ-USP, Piracicaba, SP, e sua equipe, pela realização e análise do seqüenciamento de nova geração.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa institucional (bolsa Demanda Social - DS). À Fundação de Apoio à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP, nº processo: 2011/50839-1) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, nº processo: 487036/2013-3) pelo auxílio financeiro para realização do projeto.

SUMÁRIO

CAPITULO I	Página
CONSIDERAÇÕES GERAIS	14
HIPÓTESE	20
OBJETIVOS	20
REFERÊNCIAS	21

CAPÍTULO II

MUDANÇAS NUTRICIONAIS MATERNA NO INÍCIO DA GESTAÇÃO ALTERAM O DESENVOLVIMENTO FETAL E OVARIANO EM NELORE	30
RESUMO	30
INTRODUÇÃO	31
MATERIAL E MÉTODOS	32
RESULTADOS	35
DISCUSSÃO	38
CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	43

CAPÍTULO III

MUDANÇAS NUTRICIONAIS NO INÍCIO DA GESTAÇÃO ALTERAM O PERFIL TRANSCRIPTÔMICO OVARIANO FETAL EM NELORE	49
RESUMO	49

INTRODUÇÃO	50
MATERIAL E MÉTODOS	51
RESULTADOS	55
DISCUSSÃO	61
CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS	65

CAPÍTULO IV

IMPLICAÇÕES	73
-------------------	----

EFEITOS DA NUTRIÇÃO NO DESENVOLVIMENTO OVARIANO FETAL DURANTE O INÍCIO DA GESTAÇÃO EM VACAS NELORE

RESUMO – Influências ambientais, como a nutrição, durante a fase inicial da gestação de fêmeas bovinas podem ter impacto no desenvolvimento fetal e consequentemente na vida adulta. O desenvolvimento dos ovários dos fetos é estabelecido durante o início da gestação. Testamos a hipótese de que a restrição e/ou excesso de nutrientes ingeridos por vacas durante os primeiros 60 dias da gestação interfere no desenvolvimento corporal e transcriptoma ovariano dos fetos. Vinte e uma vacas Nelore uníparas foram submetidas a inseminação artificial com sêmen sexado (fêmea) de um único touro e alocadas individualmente em diferentes dietas. A dieta do grupo controle atendeu as exigências de manutenção para a categoria animal (100%), e a dos grupos de alta e baixa ingestão a 180% e 60% dos requerimentos de manutenção, respectivamente. Amostras de sangue venoso foram colhidas para quantificação de progesterona, LH, insulina e leptina. Aos 60 dias de gestação oito fetos foram removidos por colpotomia (acesso via vaginal), pesados, os ovários dissecados e pesados. Os ovários (um de cada par) foram submetidos ao RNA-Seq. Observou-se que o status nutricional materno durante os primeiros 60 dias de gestação influenciou: o perfil hormonal de progesterona, insulina e leptina, que foi menor nos animais do grupo de baixa ingestão; a relação peso ovariano/peso corporal dos fetos do grupo de alta ingestão que foi maior comparada aos demais; o padrão de expressão gênica nos ovários entre os fetos dos grupos controle, alta e baixa ingestão. Concluímos que mudanças na nutrição materna durante os primeiros 60 dias de gestação podem alterar o desenvolvimento fetal e o perfil transcriptômico dos ovários fetais.

Palavras-chave: Nutrição, ovários, expressão gênica, bovinos.

EFFECTS OF NUTRITION ON FETAL OVARIAN DEVELOPMENT DURING EARLY PREGNANCY IN NELLORE COWS

SUMMARY - Environmental influences such as nutritional restriction during early gestation may impair fetal development and compromise functions in adulthood. Ovarian development occurs during early gestation. We hypothesized that restriction or excess of nutrients ingested by cows during the first 60 days of pregnancy affects fetal body weight and ovarian development. Fifty uniparous Nelore cows were subjected to Timed Artificial Insemination with sexed semen (female) of a single bull and individually allocated on different diets. The diet used for the control group met the maintenance requirements and the groups with high and low either 180% or 60% of maintenance, respectively. Venous blood samples were collected for plasma progesterone, LH, insulin and leptin quantification. At 60 days of gestation, eight fetuses were removed by colpotomy (accessed through the vagina), weighed, ovaries were dissected and weighed. One fetal ovary (of each pair) was used for transcriptional analysis by RNA-seq. It was observed that maternal nutritional status during the first 60 days of gestation: 1) progesterone, insulin and leptin levels which were lower in the group with low; 2) the relative ovarian weight / body weight of fetuses in the high intake group was higher compared to the others groups; 3) ovarian gene expression patterns differed between control, high and low groups. Thus, we conclude that changing maternal nutrition during the first 60 days of gestation affects the development and transcriptomic profile of fetal ovaries.

Keywords: Nutrition, ovaries, gene expression, bovine.

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

Um adequado desenvolvimento ovariano durante a vida fetal é fundamental para que se tenha fertilidade e longevidade reprodutiva na vida adulta.

A quantidade total de folículos presente no ovário é determinada em ruminantes e primatas durante o período embrionário (TANAKA et al., 2001; BETTERIDGE et al., 1989) ou imediatamente após o nascimento em roedores (HIRSHFIELD et al., 1991).

Apesar de alguns trabalhos levantarem hipóteses de que possam existir mecanismos envolvidos na formação pós-natal de novas células germinativas e folículos na mulher (BUKOVSKY et al., 2004), e em camundongas adultas (JOHNSON et al., 2004), ainda é aceito que em mamíferos a reserva de oócitos seja estabelecida durante a vida fetal (VAN DER HURCK, 2005), ocorrendo por volta dos 60 dias de gestação o número máximo de oócitos e folículos no ovário fetal (ERICKSON, 1966).

A reserva folicular capaz de se desenvolver até o estágio ovulatório é finita (WEBB et al., 2004) e sofre intensa redução durante a gestação e na vida adulta (PEPLING et al., 2006; TANAKA et al., 2001; ERICKSON, 1966). Em bovinos, os relatos do período de formação e desenvolvimento folicular são conflitantes. Em fetos *Bos taurus*, Russe, (1983) observou o aparecimento de folículos primordiais, primários e secundários aos 90, 140 e 210 dias de idade respectivamente, Tanaka et al. (2001) reportaram aos 74, 91 e 210 dias respectivamente e Yang; Fortune (2008) encontraram a diferenciação entre folículos no intervalo de 90 e 140 dias de idade. Já em fetos *Bos indicus*, Mbassa (1989) relatou que os folículos primordiais eram formados a partir de 60 dias pós-coito, Diniz et al. (2005) relataram o surgimento de folículos primordiais, em crescimento (primários e secundários) e antrais aos 95, 140 e 180 dias de idade respectivamente, Monteiro et al. (2009) aos 90, 120 e 180 dias de idade e Castilho (2008) aos 75, 90 e 150 dias. Independente da

divergência do momento do aparecimento das categorias foliculares, o pico de células germinativas ocorre por volta dos 60 dias de gestação (ERICKSON, 1966).

O número de folículos pré-antrais por ovário varia entre as espécies, sendo de aproximadamente 1.500 na camundonga (SHAW et al., 2000), 33.000 na ovelha (AMORIM et al., 2000), 35.000 na cabra (LUCCI et al., 1999) e, aproximadamente 2.000.000 na mulher (ERICKSON, 1986).

Em bovinos, a diferença na população folicular está relacionada à subespécie animal, sendo que as fêmeas zebuínas possuem maior número de folículos que fêmeas taurinas (SENEDA et al., 2010). Porém, Silva et al. (2009) realizaram um estudo comparativo estimando o número de folículos pré-antrais em fêmeas da raça Nelore e da raça Angus, e não constataram diferença ($p > 0,05$) entre a população folicular de *B. indicus* e *taurus*, tanto na fase fetal quanto em novilhas.

Ireland et al. (2008; 2009) e Jimenez-Krassel et al. (2009) comprovaram haver associação positiva entre a contagem de folículos antrais e o número de oócitos e folículos morfologicamente saudáveis nos ovários de vacas taurinas em ciclos estrais sucessivos, sendo tal característica repetível por várias gerações.

Vacas holandesas no pós-parto com alta contagem folicular tinham chance três vezes maior de engravidar quando comparadas àquelas com baixa contagem (MOSSA et al. 2012). No entanto, tal característica é passível de alterações epigenéticas, como por exemplo, o tipo de nutrição materna durante a gestação que pode alterar a proliferação de oogônias e o número de folículos na vida pós-natal do conceito (EVANS et al., 2010; MOSSA et al., 2009).

Existe uma importante associação entre a nutrição e o sistema reprodutivo de ruminantes (KEISLER; LUCY, 1996). Dentre os nutrientes que compõem a dieta animal, a energia é o que mais afeta a reprodução de fêmeas bovinas (SANTOS et al., 2006). Pesquisas recentes envolvendo nutrição e fertilidade de bovinos tem demonstrado a influência nutricional sobre eventos

moleculares e celulares que envolvem a produção de gametas, o desenvolvimento embrionário, o crescimento e a implantação do conceito (SCARAMUZZI et al., 2011; BASTOS, 2008; WEBB et al., 2004).

A ingestão de nutrientes age em vários níveis do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal e afeta fatores de crescimento de origem sistêmica ou local que controlam direta ou indiretamente a função ovariana materna e a produção embrionária (DA SILVA et al., 2002; BORWICK et al., 1997). O déficit energético pode estar relacionado a um desempenho reprodutivo insatisfatório como o atraso na idade à puberdade (FUNSTON et al., 2008) e cio pós-parto (MAQUIVAR, 2011) bem como redução nas taxas de concepção e prenhez em vacas de leite e corte (DINSK et al., 2003).

Estudos apontam que os primeiros 60 dias de gestação é o período de maior sensibilidade ovariana às alterações nutricionais durante o período gestacional, o período coincide com o pico de oócitos e folículos no ovário fetal (ERICKSON, 1966). Tanto o excesso quanto a restrição alimentar podem acarretar um desenvolvimento anormal de órgãos e tecidos (LONG et al., 2012), modificação de funções fisiológicas endócrinas (como predisposição para desordens metabólicas na vida adulta) (FORD et al., 2009) e alteração na modulação da expressão gênica (WALSH et al., 2012).

Bezerras taurinas, nascidas de mães com restrição nutricional no terço inicial da gestação (60% dos requerimentos de manutenção), apresentavam menor concentração plasmática do hormônio Anti-Mülleriano (AMH), bem como menor contagem de folículos antrais quando comparadas às bezerras nascidas de mães não restritas no mesmo período (MOSSA et al., 2009).

A redução da população e da densidade folicular foi observada em bezerras de corte nascidas de mães que sofreram restrição protéica no terço inicial seguida de superalimentação no terço médio da gestação (SULLIVAN et al., 2009).

Em ovinos, redução na taxa de ovulação de borregas, filhas de ovelhas restritas nutricionalmente (50% dos requerimentos de manutenção) foi relatada

durante o início da gestação, quando comparadas com as borregas filhas de ovelhas que receberam dieta controle no mesmo período (ERA et al., 2002).

Em roedores e humanos, alterações epigenéticas decorrentes de mudanças no aporte nutricional durante o início da gestação também foram observadas. Homens filhos de mães que sofreram restrição alimentar durante o início da gestação, apresentavam maiores taxas de doenças metabólicas e cardiovasculares na vida adulta, em relação aos filhos de mães que sofreram restrição nutricional no terço médio e final da gestação (SCHULZ et al. 2010). Ratas nutricionalmente restritas, porém com altas concentrações de leptina circulante apresentaram alterações no desenvolvimento placentário e conseqüentemente da nutrição fetal (SCHULZ et al., 2012).

Por outro lado, filhos de ratas submetidas a restrição alimentar no terço inicial da gestação tinham menor percentual de gordura corpórea quando comparados aos filhos de mães restritas porém que receberam suplementação endógena de leptina (PENNINGTON et al. 2012). A prole de ratas com dieta restrita (50% manutenção) terço inicial gestação apresentaram baixa concentração de leptina (SCHLIT; SCHULZ, 2012), o mesmo encontrado em ovelhas submetidas a restrição alimentar (BISPHAN et al., 2003).

Alguns estudos evidenciaram que tanto alterações nutricionais quanto na homeostase da fêmea prenhe podem acarretar variações no perfil hormonal e na reserva ovariana da prole.

Léonhardt et al. (2003) comprovaram que a restrição alimentar no terço final de gestação de vacas diminuiu a concentração sérica de leptina mas, não afetou os níveis séricos de LH, progesterona e estradiol de suas bezerras. Ireland et al. (2010) evidenciaram a importância da sanidade dos animais durante a gestação, ao demonstrarem que novilhas taurinas, filhas de vacas que apresentaram quadros de mastite crônica (contagem de células somáticas > 2000000) ao longo da gestação, tinham menor concentração circulante de hormônio anti-mülleriano, produzido por células da granulosa dos folículos ovarianos. Jimenez-Krassel et al. (2009) revelaram haver uma associação

entre número de folículos, função lútea deficiente e pequena proliferação endometrial no grupo de vacas com baixa contagem folicular.

Membro da família TGF- β e produzido por células da granulosa (LA MARCA; VOLPE, 2006), o hormônio anti-mulleriano (AMH) tem sido utilizado como um biomarcador confiável que reflete a quantidade de folículos e oócitos em ovários bovinos e humanos (BAARENDS et al., 1995; ELGYND et al., 2007; RICO et al., 2009; JAYAPRAKASAN et al., 2010; MONNIAUX et al., 2010; IRELAND et al., 2011). Sua mensuração reflete a população folicular no ovário de bovinos (IRELAND et al., 2008) e esta apresenta repetibilidade no mesmo animal em sucessivos ciclos (BURNS et al., 2005; IRELAND et al., 2007). A quantificação do AMH foi proposta como um método diagnóstico presuntivo da capacidade individual de vacas taurinas produzirem embriões em resposta ao tratamento superestimulatório baseado por meio de uma única mensuração do nível circulante do AMH, melhorando assim os resultados obtidos por essa biotecnologia.

Bovinos adultos com baixa fertilidade apresentaram baixa concentração circulante do AMH proporcionalmente a uma menor reserva folicular (IRELAND et al., 2008; RICO et al., 2009).

Correlação positiva entre a contagem folicular e a concentração sérica de AMH já foram relatadas em humanos (WEENEN et al., 2004; JAYAPRAKASAN et al., 2010). E em bovinos tal correlação foi constatada tanto por contagem folicular realizada histologicamente (IRELAND et al., 2008) como por avaliação ultrassonográfica (RICO et al., 2009).

Outro fator relevante na formação ovariana fetal além da herdabilidade seria a possível influência de alguns hormônios esteróides fetais, como a progesterona e o estradiol, durante o desenvolvimento ovariano de algumas espécies como ovinos (JUENGEL et al., 2002), bovinos (BUENO, 2012; NILSSON; SKINNER, 2009).

Sabe-se que ocorre uma diminuição na concentração de tais esteróides de acordo com o aumento da idade fetal (NILSSON; SKINNER, 2009; YANG; FORTUNE, 2008), porém sem que ocorram mudanças nos níveis de

progesterona materna (ECHTERNKAMP et al., 2006). Já Hogg et al. (2011) observaram que esteróides maternos podem afetar positivamente a produção de estradiol no ovário fetal.

Bueno (2012) constatou um declínio nos níveis de RNAm CYP19A1(citocromoP450 aromatase) nos ovários fetais bovinos com idade gestacional de 60-90 dias, coincidindo com a redução na concentração de estradiol e aumento do número de folículos primários, previamente reportado por Yang; Fortune (2008).

Fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs) também são reconhecidos na participação de inúmeros processos fisiológicos, como no desenvolvimento embrionário (PORTELA et al., 2010; BURATINI et al., 2007; BASILÍCO et al., 1992). Dentre os membros dessa família, o FGF-10 teve sua expressão em ovários fetais bovinos associada ao aumento no número de folículos primários (CASTILHO, 2008). Gasperin et al. (2012) demonstraram que o mesmo FGF-10 foi capaz de inibir a produção de estradiol via supressão da CYP19A1.

HIPÓTESE

Alteração no aporte nutricional de vacas Nelore durante o início da gestação influencia o desenvolvimento fetal e ovariano.

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

- Avaliar o efeito da alta e baixa ingestão alimentar de vacas Nelore, durante os primeiros 60 dias de gestação, no desenvolvimento fetal.

Objetivos específicos:

Avaliar o efeito de alta e baixa ingestão alimentar materna durante o início gestacional sobre:

- O desenvolvimento fetal – peso e comprimento;
- O desenvolvimento ovariano fetal – peso e perfil transcriptômico.
- A variação nas concentrações séricas dos hormônios maternos – progesterona, LH, leptina e insulina;

REFERÊNCIAS

- AMORIM, C.A., RODRIGUES, A.P.R., LUCCI, C.M., FIGUEIREDO, J.R., GONÇALVES, P.B.D. Effect of sectioning on the number of isolated ovine preantral follicles. **J Small Rum Res**, v.37, p.269-277, 2000.
- BASILICO, C., MOSCATELLI, D. The FGF family of growth factors and oncogenes. **Adv. Cancer Res.**, v.59, p. 115-65, 1992.
- BASTOS, M.R. Influência da ingestão de matéria-seca e da condição corporal na produção in vivo de embriões bovinos. 170p. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária na area de concentração Reprodução Animal). Universidade Estadual Paulista UNESP Campus Botucatu. 2008.
- BETTERIDGE, K.J., SMITH, C. STUBBINGS, R.B., XU K.P., KING, W.A. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal in vitro. **Journal of Reproduction & Fertility**, (Suppl) v. 38, p.87-98, 1989.
- BISPHAM, J., GOPALAKRISHNAN, G.S., DANDREA, J., WILSON, V., BUDGE, H., KEISLER, D.H., BROUGHTON PIPKIN, F.,STEPHENSON ,T., SYMONDS, M.E. Maternal endocrine adaptation throughout pregnancy tonutritional manipulation: consequences for maternal plasma leptin and cortisol and theprogramming of fetal adipose tissue development. **Endocrinology**,v.144, p.3575-3585, 2003.
- BORWICK, S.C., RHIND, S.M., McMILLEN, S.R.; RACEY, P.A. Effect of undernutrition of ewes from the time of mating on foetal ovarian development in mid-gestation **Reproduction, Fertility and Development** v.9, p. 711–715, 1997.
- BUENO, R.S. Efeito dos fatores de crescimento fibroblástico 10 e 18 (FGFs 10 e 18) sobre a esteroidogênese em ovários fetais bovinos. 96f. **Tese** (doutorado), Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2012.

- BUKOVSKY, A., CAUDLE, M.R., SVETLIKOVA, M., UPADHYAYA, N.B. Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. **Reprod. Biol. Endocrinol.** v.2, p.20-24, 2004.
- BURATINI, J. Jr ; PINTO, M.G.L. ; CASTILHO, A.C.S. ; AMORIM, R.L. ; GIOMETTI, I.C.; CAO, M.; NICOLA, E.S ; PRICE, C.A . Expression and function of fibroblast growth factor-10 and its receptor, fibroblast growth factor receptor 2b, in bovine follicles **Biol. of Reprod.**, v.77, p.743-750, 2007
- CARAMBULA, S.F.; GONÇALVES, P.B.D; COSTA, L.F.S.; FIGUEIREDO, J.R.; WHEELER,M.B.; NEVES, J.P.; MONDADORI, R.G. Effect of foetal age and method of recovery on isolation of preantral follicles from bovine ovaries. **Theriogenology.** v.52, p.563-571, 1999.
- CASTILHO, A.C.S. Expressão do fator de crescimento fibroblástico 10 (FGF-10) em folículos pré-antrais e antrais jovens durante o desenvolvimento ovariano em fetos bovinos. 80f. **Dissertação** (Mestrado Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista UNESP, Botucatu. 2008.
- DINIZ, E.G; ESPER, C.R.; JACOMINI, J.O.; VIEIRA, R.C. Desenvolvimento morfológico dos ovários em embriões e fetos bovinos da raça Nelore. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.57, n.1, p.70-76, 2005.
- DISKIN, M.G.; MACKEY, D.R.; ROCHE, J.F.; SREENAN, J.M. Effects of nutrition and metabolic status on circulation hormones and ovarian follicle development in cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v.78, p.345-70, 2003.
- ECHTERNKAMP SE, VONNAHME KA, GREEN JA, FORD SP. Increased vascular endothelial growth factor and pregnancy-associated glycoproteins, but not insulin-like growth factor-I, in maternal blood of cows gestating twin fetuses. **J AnimSci**, v.84, p.2057-2064, 2006.
- ELGINDY, E.A., EI-HAIEG, D.O., EI-SEBAEY, A. Anti-Mullerian hormone: correlation of early follicular, ovulatory and mid luteal levels with ovarian response and cycle outcome in intracytoplasmic sperm injection patients. **Fertil Steril.**, v. 89, p.1670–1676, 2007.
- ERICKSON, B.H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **J. Anim. Sci.** v.25, p.800–805, 1966.

EVANS A.C.O. MOSSA, F. FAIR, T., LONERGAN, P., SMITH, G.W., JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J.K.; IRELAND, J.L.H.; IRELAND, J.J. Variação no número de folículos ovarianos em bovinos: possíveis causas e consequências. XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE), **Acta**. p.227-231. 2010.

FORD, S.P.; ZHANG, L.; ZHU, M. Maternal obesity accelerates fetal pancreatic cell but not cell development in the sheep: prenatal consequences. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** v.287, p.835–43, 2009.

FUNSTON, R. N., MARTIN, J. L.; ADAMS, D. C.; LARSON, E D. M. Effects of winter grazing system and supplementation during late gestation on performance of beef cows and progeny. **Proc. West. Sec. Amer. Soc. Anim. Sci.** 59:102-105, 2008.

FUNSTON, R. N.; SUMMERS, A. S. Epigenetics: Setting Up Lifetime Production of Beef Cows by Managing Nutrition. **Annu. Rev. Anim. Biosci.** v.1, p.339–363, 2013.

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

GOUGEON, A.; CHAINY, G.B.N. Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. **J. Reprod. Fert.** v.81, p.433-442, 1987.

HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovarian. **International Review of Cytology**, v. 124, p. 43-101, 1991.

HOGG, K.; MCNEILLY, A.S.; DUNCAN, W.C. Prenatal androgen exposure leads to alterations in gene and protein expression in the ovine fetal ovary. **Endocrinology**, v.152, p.2048-2059, 2011.

HULSHOF, S.C.J.; FIGUEIREDO, J.R.; BECKERS, J.F.; BEVERS, M.M.; VAN DEN HURK, R. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Vet. Quarterly**. v.16, n.2, p.78-80, 1994.

IRELAND, J.J.; SMITH, G. W.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J. K.; IRELAND, J. L. H.; MOSSA, F.; LONERGAN, P. & EVANS, A. C. O. Does size matter in females? An overview of the impact of the high

variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v.23, p.1–14, 2011.

IRELAND, J.J., SCHEETZ, D., JIMENEZ, F., FOLGER, J.K., SMITH, G.W., MOSSA, F., EVANS, A.C.O. Evidence that mammary gland infection/injury during pregnancy in dairy cows may have a negative impact on size of the ovarian reserve in their daughters. **In_ 43rd Annual Meeting for the Society for Study of Reproduction**, Milwaukee, WI., 2010.

IRELAND, J.L.H.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; THEMME, A.P.N.; WARD, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G.W.; PEREZ, G.I.; EVANS, A.C.O.; IRELAND, J.J. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. **Biol.of Reprod.** v.79, p.1219-1225. 2008.

JAYAPRAKASAN, K., DEB, S.; BATCHA, M., HOPKISSON, J.A., JOHNSON, I., CAMPBELL, B.; RAINE-FENNING, N. The cohort of antral follicles measuring 2–6 mm reflects the quantitative status of ovarian reserve as assessed by serum levels of anti-Müllerian hormone and response to controlled ovarian stimulation. **Fert. Sterility**. v.94, n.5, p.1775-1881, 2010.

JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J.K.; IRELAND, J.L.H.; SMITH, G.W.; HOU, X.; DAVIS, J.S.; LONERGAN, P.; EVANS, A.C.O.; IRELAND, J.J. Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. **Biol. Reprod.** v.80, p.1272-1281. 2009.

JOHNSON, J., CANNING, J., KANEKO, T., PRU, J. K., TILLY, J. L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. **Nature**, v.428, p.145–150, 2004.

Juengel J.L, Sawyer, H.R., Smith, P.R., Quirke, L.D., Heath, D.A., Lun, S., Wakefield, S.J., McNatty, K.P. Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries. **Mol Cell Endocrinol**, 191:1-10, 2002

- KEYSLER, D.H., LUCY, M.C. Perception and interpretation of the effects of undernutrition on reproduction. **J.Anim.Sci.**v.74, n.3, p.1-17, 1996.
- La MARCA A, STABILE G, ARTENISIO AC, VOLPE A. Serum anti-Mullerian hormone throughout the human menstrual cycle. **Hum Reprod**; 21:3103–3107; 2006.
- LEI, H.; OH, S. P.; OKANO, M.; JUTTERMANN, R.; GOSS, K. A.; JAENISCH, R.; LI, E. De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. **Development**, v.122, p.3195-3205, 1996.
- LÉONHARDT, M.; LESAGE, J.; CROIX, D.; DUTRIEZ-CASTELOOT, I.; BEAUVILLAIN, J.C.; DUPOUY, J.P. Effects of perinatal maternal food restriction on pituitary-gonadal axis and plasma leptin level in rat pup at birth and weaning and on timing of puberty. **Biol. Reprod.** v.68; p.390-400, 2003.
- LI, E.; BEARD, C.; JAENISCH, R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. **Nature**, v.366, p.362-365, 1993.
- Long,N. M. Tousley,C. B. Underwood,K. R. Paisley,S. I. Means,W. J. Hess,B. W., Du, M., Ford, S. P.Effects of early- to mid-gestational undernutrition with or without proteinsupplementation on offspring growth, carcass characteristics, and adipocyte size inbeef cattle. **J. Anim Sci**, v.90, p:197-206, 2012.
- LUCCI, C.M., AMORIM, C.A., BÁO, S.N., FIGUEIREDO, J.R., RODRIGUES, A.P.R., SILVA, J.R., GONÇALVES, P.B.D. Effect of the interval of serial sections of ovarian in the tissue chopper on the number of isolated caprinepreantral follicles. **Anim Reprod Sci**, v.56, p.39-49, 1999.
- LUCIFERO,D.; SUZUKI, J.; BORDIGNON, V.; MARTEL, J.; VIGNEAULT, C.; THERRIEN, T.; FILION, F.; LAWRENCE, C.; SMITH;. TRASLER; J.M. Bovine SNRPN methylation imprint in oocytes and day 17 *in vitro*-produced and somatic cell nuclear transfer embryos. **Biol. of Reprod.** v.75; p.531-536; 2006.
- MAQUIVAR, M.G. Nutritional regulation of precocious puberty in heifers. Degree of Doctor of Philosophy. 182f. Ohio State University, 2011.
- MBASSA, G.K. Studies on the ovarian development in zebu cattle (*Bos indicus*). **Anat. Histol. Embr.**, v.18, n.2, p.143-149, 1989.

- MONNIAUX, D., BARBEY, S., RICO, C., FABRE, S., GALLARD, Y., LARROQUE, H. Anti-Müllerian hormone: a predictive marker of embryo production in cattle? **Reprod. Fertil. Dev.** v.22, p.1083–1091, 2010.
- MONTEIRO, C.M.R.; BIAGI, M.B.; PERRI, S.H.V.; CARVALHO, R.G.; NOGUEIRA, G.P. Desenvolvimento folicular em ovários de fetos zebuínos (*Bos taurus indicus*). **Biotemas**, v.22, n.3, p.185-191, 2009.
- MOSSA, F., WALSH, S.W., BUTLER, S.T., BERRY, D.P., CARTER, F., LONERGAN, P., SMITH, G.W., IRELAND, J.J., EVANS, A.C.O. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. **J. Dairy. Sci.** v.95, p.2355-2361, 2012.
- MOSSA, F., KENNY, D., JIMENEZ-KRASSEL, F., SMITH G.W., BERRY, D., BUTLER, S., FAIR, T., LONERGAN, P., IRELAND, J.J., EVANS, A.C.O. Undernutrition of heifers during the first trimester of pregnancy diminishes size of the ovarian reserve in female offspring, **42nd Annual Meeting of the Society for Study of Reproduction**, Pittsburg, PA, p. 77.2009.
- NILSSON, E.E., SKINNER, M.K. Progesterone regulation of primordial follicle assembly in bovine fetal ovaries. **Mol Cell Endocrinol**, 313:9-16, 2009.
- PENNINGTON, K.A.; SIGAFOOS, H.J.; BEFFA, A.N.; CARLETON, L.M.; PHILLIPS, S.M.; SCHULZ, C.L. Effect of Food Restriction and Leptin Supplementation on Fetal Programming in Mice. **Endocrinology**, v.153, n.9, p.4556–4567, 2012.
- PEPLING, M. E. From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. **Genesis** v.44, p.622–632, 2006.
- PORTELA V. M.; MACHADO M.; BURATINI J. JR.; ZAMBERLAM G.; AMORIM R. L.; GONCALVES P.; PRICE C. A. Expression and function of fibroblast growth factor 18 in the ovarian follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v.83, n.3, p.339-346, 2010.
- RAE, M. T., KYLE, C. E., MILLER, D. W., HAMMOND, A. J., BROOKS, A. N., RHIND, S. M.. The effects of undernutrition, *in utero*, on reproductive function in adult male and female sheep. **Anim. Reprod. Sci.** 72, 63–71, 2002

RICO, C., DROUILHET, L., SALVETTI, P., DALBIÈS-TRAN, R., JARRIER, P., TOUZÈ, J.L., PILLET, E., PONSART, C., FABRE, S., MONNIAUX, D. Determination of anti-Müllerian hormone concentrations in blood as a tool to select Holstein donor cows for embryoproduction: from the laboratory to the farm. **Reproduction, Fertility and Development**, v.24, p. 932–944, 2012.

RICO, C.; FABRE, S.; MÉDIGUE, C.; CLEMENTE, N.; CLÉMENT, F.; BONTOUX, M.; TOUZÉ, J.L.; DUPONT, M.; BRIANT, E.; RÉMY, B.; BECKERS, J.F.; MONNIAUX, D. Anti-Müllerian Hormone Is an Endocrine Marker of Ovarian Gonadotropin-Responsive Follicles and Can Help to Predict Superovulatory Responses in the Cow. **Biology of Reproduction** v. 80, p. 50–59, 2009.

RUSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibl Anat**; v.24, p.77–92, 1983.

SANTOS, J.E.P.; SÁ FILHO, M.F. Nutrição e reprodução em bovinos. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, Londrina, v.2, p.30-54, 2006.

SCARAMUZZI R.J.; BAIRD D.T.; CAMPBELL B.K.; DRIANCOURT M.A.; DUPONT J.; FORTUNE J.E.; GILCHRIST R.B.; MARTIN G.B.; MCNATTY K.P.; MCNEILLY A.S.; MONGET P.; MONNIAUX D.; VIÑOLES C.; WEBB R. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.23, p.444-467, 2011.

SCHLITT, J.M, SCHULZ, LC. The source of leptin, but not leptin depletion in response to food restriction, changes during early pregnancy in mice. **Endocrine**, v.41, p.227–235, 2012.

Schulz LC. The Dutch Hunger Winter and the developmental origins of health and disease. **Proc Natl Acad Sci**,; v.107, p.16757-16758, 2010.

SCHULZ, L.C., SCHITT, J.M., CAESAR, G., PENNINGTON, A. Leptin and the Placental Response to Maternal Food Restriction During Early Pregnancy. **Biology of Reproduction**. 16;87(5):120, 2012.

SENEDA, M.M.; SILOTO, L.S.; MOROTTI, F.; SCHINEIDER, C.L. Fisiologia do crescimento folicular em bovinos. In: IV Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada. Anais. p.14-22, 2010.

- SHAW, J.M., ORANRATNACHAI, A., TROUNSON, A.O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v.53, p.59-72, 2000.
- SILVA, K.C.F. Estudo comparativo da recuperação do complexo cumulusoócito e da população de folículos pré-antrais entre fêmeas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*. 103f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR. 2009.
- SULLIVAN, T.M., MICKE, G.C., GREER, R.M., IRVING-RODGERS, H.F., RODGERS, R.J., PERRY, V.E. Dietary manipulation of *Bos indicus* x heifers during gestation affects the reproductive development of their heifer calves. **Reprod. Fertil. Dev.** v.21, p.773-784, 2009.
- TANAKA, Y.; NAKADA, K.; MORIYOSHI, M.; SAWAMUKAI, Y. Appearance and number of follicles and change in the concentration of serum FSH in female bovine fetuses. **Reproduction**. v.121, p.777-782, 2001.
- VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovaries follicles. **Theriogenology**, v.63, p.1717-1751, 2005.
- WALSH, S.W.; MATTHEWS, D.; BROWNE, J.A., FORDE, N., CROWE, M.A., MIHM, M., DISKIN, M., EVANS, A.C.O. Acute dietary restriction in heifers alters expression of genes regulating exposure and response to gonadotrophins and IGF in dominant follicles. **Animal Reproduction Science**, v.133, p. 43– 51, 2012.
- WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; GONG, J.G.; ASRMSTRONG, D.G. Control of follicular interactions and nutritional influences. **J. Anim. Sci.**, v.82(Supl), p.E63-E74, 2004.
- WEENEN, C., LAVEN, J.S., VON BERGH, A.R., CRANFIELD, M., GROOME, N.P., VISSER, J.A., KRAMER, P., FAUSER, B.C., THEMME, A.P. Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. **Mol. Hum. Reprod.** v.10, p.77–83, 2004.

YANG, M.Y., FORTUNE J.E. Testosterone stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles *in vitro*. **Biol Reprod**, v.75, p.924-932, 2006.

YANG, M.Y.; FORTUNE, J.E. The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth *in vitro* develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. **Biol. Reprod.**, v.78, p.1153–1161, 2008.

CAPÍTULO II - MUDANÇAS NUTRICIONAIS MATERNA NO INÍCIO DA GESTAÇÃO ALTERAM O DESENVOLVIMENTO FETAL E OVARIANO EM NELORE

RESUMO - Influências ambientais, como a nutrição, durante a fase inicial da gestação de fêmeas bovinas podem ter impacto no desenvolvimento fetal e consequentemente na vida adulta. O desenvolvimento dos ovários dos fetos é estabelecido durante o início da gestação. Testamos a hipótese de que a restrição e/ou excesso de nutrientes ingeridos por vacas durante o início da gestação interfere no desenvolvimento fetal e ovariano. Vinte e uma vacas Nelore uníparas foram submetidas a inseminação artificial com sêmen sexado (fêmea) de um único touro e alocadas individualmente em diferentes dietas oferecidas desde a inseminação até os 60 dias de gestação. A dieta do grupo controle atendeu as exigências de manutenção para a categoria animal (100%; NRC, 2006), e a dos grupos de alta e baixa ingestão a 180% e 60% dos requerimentos de manutenção, respectivamente. Amostras de sangue venoso foram colhidas ao longo do tratamento para quantificação dos hormônios progesterona, LH, insulina e leptina por radioimunoensaio. Aos 60 dias de gestação oito fetos foram removidos por colpotomia (acesso via vaginal), pesados, os ovários dissecados e pesados. O efeito dos tratamentos na concentração plasmática hormonal materna, no peso do feto e peso dos ovários foi comparado por ANOVA (SAS 9.3 – PROC GLM). Observou-se que o status nutricional materno durante os primeiros 60 dias de gestação não influenciou na concentração de LH entre os animais dos grupos controle, alta e baixa ingestão ao longo dos 60 dias de tratamento ($p > 0,05$). Observou-se aumento gradativo ao longo dos dias de gestação nas concentrações de progesterona, insulina e leptina das vacas dos grupos de alta ingestão e controle. Não houve diferença entre os grupos alta ingestão e controle ao longo do tempo para progesterona sérica ($p < 0,05$), houve aumento na concentração de insulina a partir do 21º até o 60º dia ($p < 0,05$) e diferença para leptina sérica do 49º ao 60º dia ($p < 0,05$) no grupo de alta ingestão. A

concentração de progesterona das vacas do grupo de baixa ingestão também aumentou durante os 60 dias de gestação, porém com médias inferiores ($p < 0,05$) que os animais dos demais grupos. Já as concentrações média de insulina e leptina reduziram ao longo do tratamento e diferiu das vacas do grupo controle e alta ingestão ($p < 0,05$). A subnutrição materna durante os 60 dias iniciais da gestação comprometeu o crescimento fetal. Os fetos do grupo de baixa ingestão foram menores ($p = 0,0004$), mais leves ($p = 0,0015$) e com ovários mais leves ($p = 0,0325$) quando comparados aos grupos de alta ingestão e controle. Assim, podemos concluir que mudanças na nutrição materna durante os primeiros 60 dias de gestação podem alterar o desenvolvimento inicial dos ovários fetais.

Palavras-chave: bovinos, fetos, ingestão alimentar, ovários

Introdução

Alterações nutricionais e endócrinas durante o desenvolvimento fetal podem comprometer a formação ovariana e influenciar negativamente o desempenho reprodutivo da cria quando adulta (MOSSA et al., 2013; EVANS et al., 2012; IRELAND et al., 2009; MURDOCH et al., 2003; RAE et al., 2002).

Estudos em ovinos (LEA et al., 2006; RAE et al., 2001) e bovinos (EVANS et al., 2012; MURDOCH et al., 2003; GARVERICK et al., 1985) tem demonstrado que a prole de animais submetidos a restrição nutricional durante a gestação, manifestavam alterações reprodutivas, incluindo baixas taxas de ovulação e concepção e deficiente sobrevivência embrionária. A causa das oscilações em características reprodutivas ainda não está clara, e vem sido associada a prováveis perturbações sofridas durante o desenvolvimento das células germinativas afetando a meiose das mesmas.

Em taurinos, ovários de bezerras nascidas de gestação que passaram por desafio nutricional apresentavam baixa contagem de folículos antrais e baixa

concentração de AMH (MOSSA et al., 2013), comprometendo assim, a longevidade da vida reprodutiva em animais adultos. Resultados similares foram reportados em ratas (BERNAL et al., 2010). Alterações nutricionais maternas no período periconcepcional acarretaram modificações já no início do desenvolvimento embrionário (PEÑAGARICANO et al., 2013; FLEMING et al., 2012).

A formação da reserva folicular ovariana de bovinos e outros mamíferos é determinada no início da gestação. Acredita-se que os animais nascem com um número finito e não renovável de oócitos (PEÑAGARICANO et al., 2013; PEPLING et al., 2006), e em fetos bovinos o número de folículos pré-antrais vai reduzindo do início da gestação até o nascimento (TANAKA et al., 2001). O número de folículos varia entre indivíduos (BURNS et al., 2005) e trata-se de característica herdável (IRELAND et al., 2009; JIMENEZ-KRASSEL et al., 2009; IRELAND et al., 2008). Logo, o comprometimento do desenvolvimento ovariano poderá comprometer o desempenho reprodutivo da cria e ser transmitidas para gerações subseqüentes.

A subnutrição materna durante a gestação foi identificada por ser a causa de nascimento de cordeiros com baixo peso corporal (WALLACE et al., 1999), baixo peso ovariano (Da SILVA et al., 2002; RAE et al., 2001; BORWICK et al., 1997), atraso da puberdade e menores taxas de ovulação na ovelha adulta (Da SILVA et al., 2002; RAE et al., 2002).

No presente estudo testamos a hipótese de que o peso ovariano, corporal e tamanho fetal seriam afetados pela restrição ou superalimentação de vacas Nelore (*Bos indicus*) nos primeiros 60 dias de gestação, período de desenvolvimento que coincide com o pico do número de oócitos nos ovários fetais (PEPLING, 2006; ERICKSON, 1966).

Material e métodos

O procedimento com os animais foi aprovado pela Comissão de Experimentação para Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária FMVA – UNESP.

Cinquenta vacas uníparas Nelore (*Bos indicus*) (Peso corporal= 488 ± 24 kg, Escore de condição corporal= 3 ± 0.1 ; 48 meses de idade) foram submetidas à IATF com sêmen (de um único touro) sexado para fêmea, alocadas em baias individuais e alimentadas diariamente com uma de três dietas; o grupo controle (C; n=17) foi alimentado com os requerimentos de manutenção (100 %; CNCPV.6), grupo alta (A; n=17; 180%) e grupo baixa (B; n=16; 60%) ingestão do respectivo percentil necessários para manutenção. Os tratamentos corresponderam a 1,37% (C), 0,82% (B) e 2,47% (A) de ingestão de matéria-seca por peso vivo. Os tratamentos foram iniciados no dia da inseminação artificial e terminaram após completos 60 dias de gestação. As vacas foram igualmente distribuídas nos grupos de acordo com a contagem de folículos antrais (CFA: número de folículos antrais ≥ 3 mm). Os animais passaram por acompanhamento ultrassonográfico transretal prévio ao início do experimento por um período mínimo de seis meses para que fosse estabelecida a contagem folicular antral, a qual foi posteriormente confirmada pela quantificação do hormônio anti-mülleriano (AMH) sérico (Bovine AMH ELISA, AnshLabs, AL-114) (IRELAND et al., 2008). A partir dessa avaliação, os animais foram classificados em três categorias – alta, média e baixa contagem folicular e uniformemente distribuídos nas três dietas.

A dieta das vacas durante os 60 dias de experimento era composta à base de 48,2% de bagaço de cana, 16,53% de milho moído, 29,42% de polpa cítrica, 3,23% de farelo de soja, 1,24% de uréia, 0,58% de sal mineral, 0,36% de cloreto de potássio e 0,44% de calcário calcítico, totalizando 72% de matéria-seca na dieta total. O peso e o escore de condição corporal dos animais foram mensurados semanalmente para ajuste individual das dietas.

Quantificação hormonal

Durante os 60 dias de tratamento foram colhidas amostras sanguíneas dos animais. O procedimento era realizado duas vezes por semana, entre 6 e 8 horas manhã, antes da oferta única e diária da dieta total. Após a colheita das amostras sanguíneas em tubos contendo EDTA (10%), o plasma era separado por centrifugação refrigerada e armazenado a -20°C . As concentrações de

progesterona, insulina e leptina foram mensuradas utilizando kits de radioimunoensaio: PROGESTERONE IMMUNOTECH, Beckman Coulter - IM1188, Human Insulin Specific, Millipore - HI-14K, Multi-Species Leptin, Millipore - XL-85K respectivamente, com adaptações na metodologia e validação para espécie bovina. Os coeficientes de variação inter-ensaio (alto e baixo); intra-ensaio (alto e baixo) e o limite de detecção foram: progesterona CV=16,54% e 0,41%; 15,56% e 9,7% e 0,0064ng/mL, insulina CV=7,87% e 1,16%; 8,03% e 7,01 e 0,964 μ U/mL, leptina CV=3,24% e 0,45%; 3,13% e 4,06 e 0,1826 ng/dL. A quantificação do hormônio luteinizante (LH) foi realizada por radioimunoensaio de acordo com descrição prévia de Bolt; Rollins, (1983) e Bolt et al., (1990), a sensibilidade foi 0,038 ng/mL, os coeficientes de variação (alto e baixo) intra e inter-ensaio foram: CV=7,52% e 6,79%; 17,31% e 9,7%.

Remoção fetal

Um total 21 vacas, das 50 inseminadas, mantiveram a gestação por 30 dias e dessas 21, 11 mantiveram a gestação até o 60º dia e foram então, submetidas à colpotomia para remoção fetal. Para a colpotomia os animais foram contidos em estação e após anestesia epidural realizou-se uma incisão dorsal à cérvix no fórnix vaginal, entre 11 e 2 h, com auxílio do Bisturi Q[®] para ter acesso ao corno gestante. Outra incisão ($\pm$ 4cm) foi realizada no corno uterino gestante com lâmina de bisturi (nº 24) protegida pela mão enluvada, a ponto de permitir a remoção do feto pós-ruptura do cordão umbilical. As incisões, por serem pequenas, cicatrizaram por segunda intenção. Em virtude das dificuldades da técnica, foi possível a remoção de somente oito fetos (sendo alta ingestão n=3, baixa ingestão n=3 e controle n=2). Os fetos foram transferidos para uma placa de Petri estéril, transportados até o laboratório e imediatamente pesados, mensurados (*crown-rump*) e os ovários removidos, pesados, armazenados individualmente, embebidos em *RNA later Tissue Collection*[®] (AM7020/Ambion) e estocados a -80°C.

Análise estatística

A distribuição normal dos dados de todas as variáveis dependentes foi avaliada pelo procedimento UNIVARIATE do SAS (versão 9.3; SAS Institute). O peso corporal e as concentrações plasmáticas de progesterona, LH, insulina e leptina maternos e o peso corporal, o tamanho e a média do peso dos dois ovários fetais foram analisadas por ANOVA (SAS 9.3 - Proc GLM) seguida pelo teste de Tukey. A significância foi estabelecida com $p < 0,05$ e os resultados foram apresentados como média $\pm$ EPM.

Resultados

Durante os primeiros 30 dias de tratamento, as vacas do grupo de alta ingestão ganharam 26 kg (de 450,3 $\pm$ 13.1 kg para 476 $\pm$ 14) e 0.5 ponto no ECC (de 3,0 para 3,5). Enquanto as vacas do grupo de baixa ingestão perderam 21 kg (433 $\pm$ 6,1 para 412 $\pm$ 4,6) e 0.25 ponto no ECC (de 3,0 para 2,75) (Figura 1).

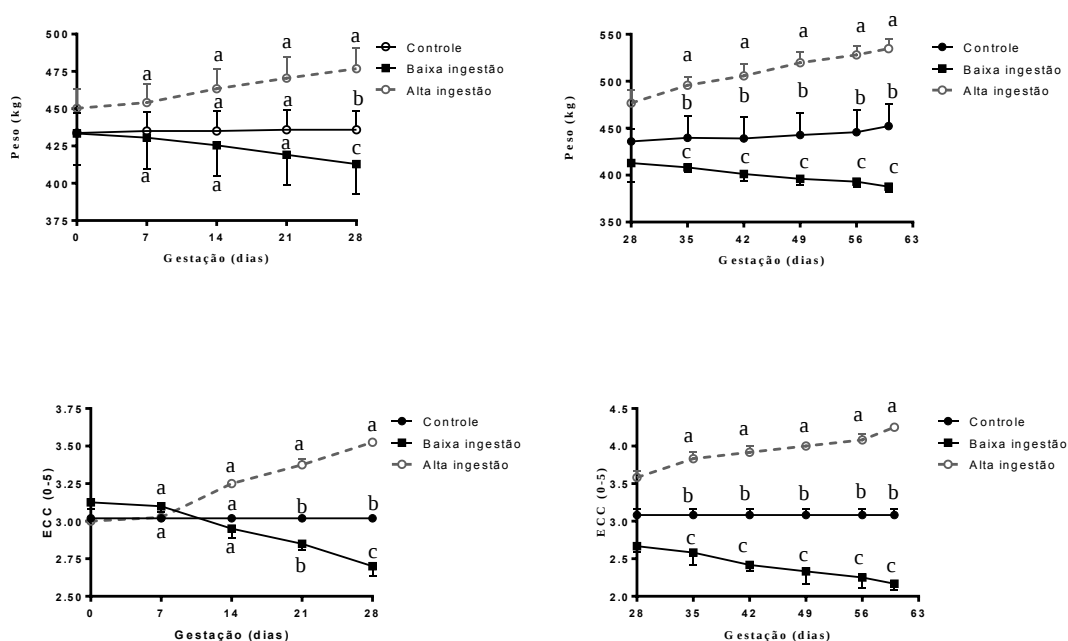


Figura 1. Efeitos da variação nutricional do momento da inseminação artificial até o 60º dia de gestação em vacas Nelore no peso corporal médio e escore de condição corporal. Valores médios $\pm$ EPM a cada 7 dias por grupo. De 0 a 28 dias, n=21; e de 28 a 60 dias, n=11. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças (* $p < 0,05$) entre grupos no período.

Avaliando-se os animais que mantiveram a gestação até a remoção fetal, ou seja, aos 60 dias observou-se que as vacas do grupo A ganharam 58 kg (de 476 ± 14 kg para 534 ± 10 kg) e 0,75 pontos no ECC (de 3,5 para 4,25). Enquanto as vacas do grupo B perderam 25 kg (de $412 \pm 4,6$ kg para 387 ± 3 kg) e 0,5 ponto no ECC (de $2,7 \pm 0,1$ para $2,2 \pm 0,1$) (Figura 1 A, B, C, D, E).

A concentração de LH não diferiu entre os animais dos grupos controle, alta e baixa ingestão ao longo dos 60 dias de tratamento ($p > 0,05$). Observou-se aumento gradativo ao longo dos dias de gestação nas concentrações de progesterona, insulina e leptina das vacas dos grupos de alta ingestão e controle. Não houve diferença entre os grupos nos períodos avaliados (intervalo de quatro dias) para progesterona ($p < 0,05$), a concentração de insulina aumentou a partir do 21º até o 60º dia ($p < 0,05$) e leptina sérica aumentou do 49º ao 60º dia ($p < 0,05$) nos animais do grupo de alta ingestão. A concentração de progesterona das vacas do grupo de baixa ingestão também aumentou durante os 60 dias de gestação, porém com médias inferiores ($p < 0,05$) que os animais dos demais grupos. Já as concentrações média de insulina e leptina reduziram ao longo do tratamento e diferiu das vacas do grupo controle e alta ingestão ($p < 0,05$). (Figura 2 A, B, C, D, E, F, G, H).

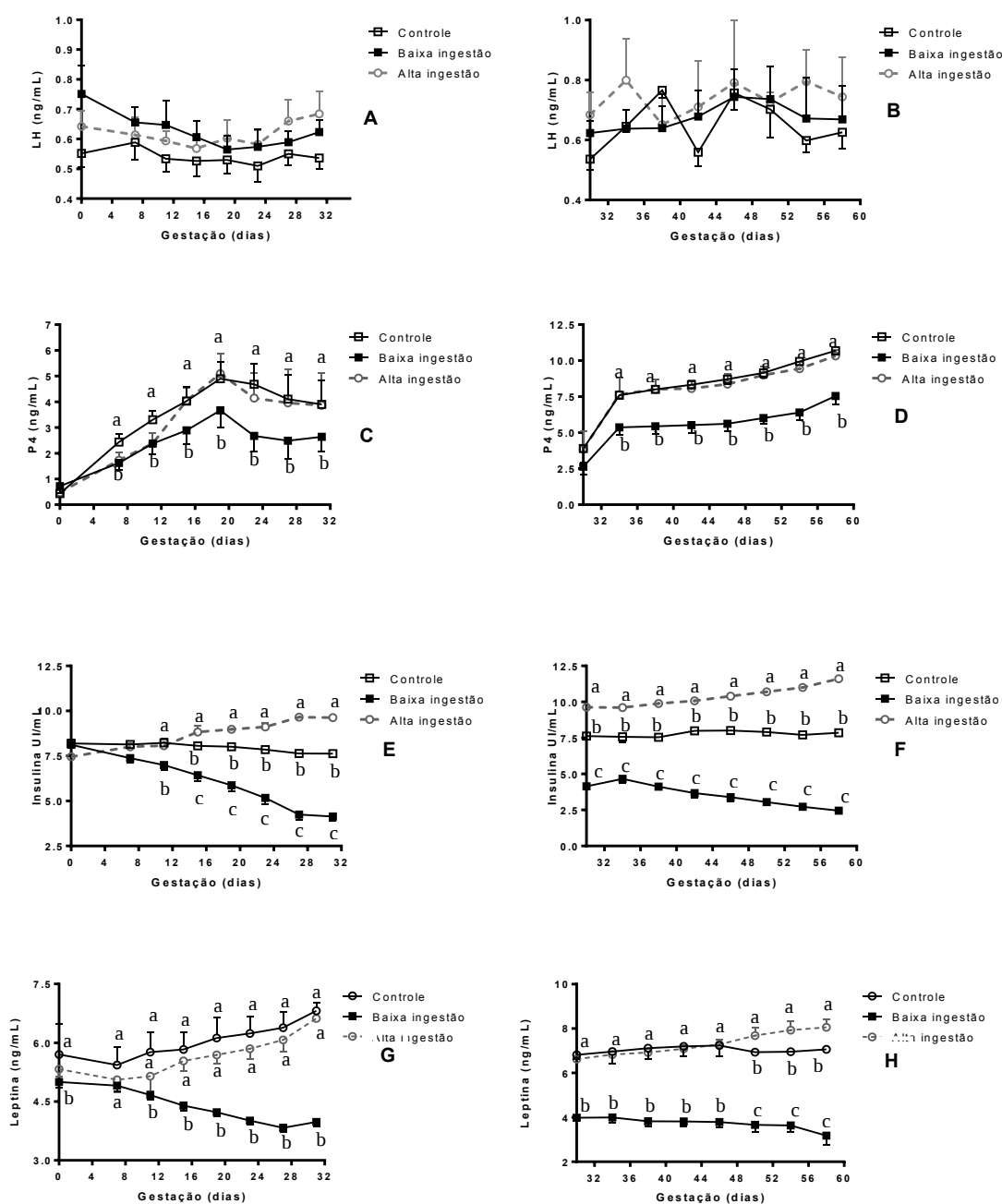


Figura 2. Efeitos da variação nutricional do momento da inseminação artificial até o 60º dia de gestação em vacas Nelore nas concentrações plasmáticas de LH (A; B) progesterona (C; D), insulina (E; F) e leptina (G; H). Valores médios±EPM a cada 4 dias por grupo. De 0 a 28 dias, n=21; e de 28 a 60 dias, n=11. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças (* p<0,05) entre grupos no período.

A subnutrição materna durante os 60 dias iniciais da gestação comprometeu o crescimento fetal. Os fetos do grupo de baixa ingestão foram menores ($p=0,0004$), mais leves ($p=0,0015$) e com ovários mais leves ($p=0,0325$) quando comparados aos grupos de alta ingestão e controle (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito da nutrição em vacas Nelore durante os primeiros 60 dias de gestação no desenvolvimento fetal

Fetos	Controle (100% M, n=2)	Baixa ingestão (60% M, n=3)	Alta ingestão (180% M, n=3)
Peso (g)	18,877± 0,297 ^b	12,431± 0,337 ^c	21,728± 0,527 ^a
Peso ovariano* (g)	0,013± 0,0002 ^{ab}	0,008± 0,0002 ^b	0,023± 0,0024 ^a
Peso O/Peso F** (%)	0,07	0,06	0,11
Tamanho (cm)	7,45±0,05 ^a	6,067±0,145 ^b	8,8± 0,116 ^a

Valores médios±erro padrão da média

*média da soma dos pesos ovarianos

** relação: (peso ovariano médio/peso fetal) x 100

^{a,b,c}valores nas linhas com diferentes letras sobrescritas diferem significativamente ($p<0,05$)

Discussão

Intencionalmente o período de alteração da dieta coincidiu com a fase crítica do desenvolvimento ovariano fetal (JUNGEL et al., 2002), e notavelmente a variação nutricional causou mudanças em algumas características do desenvolvimento ovariano e fetal de vacas Nelore. A restrição alimentar materna durante os primeiros 60 dias de gestação interferiu negativamente no desenvolvimento fetal do presente estudo. Resultados semelhantes foram encontrados em taurinos, em que a subnutrição materna (60% dos requerimentos de manutenção para categoria animal) durante o terço inicial reduziu em 60% a reserva folicular ovariana na vida adulta da prole

(MOSSA et al., 2013). O impacto negativo da restrição nutricional na fase inicial da gestação no desenvolvimento ovariano da prole não foi revertido pela subsequente superalimentação no terço médio da gestação como demonstrado por Sullivan et al., (2009).

No entanto, tanto Mossa et al., (2013) quanto Sullivan et al., (2009) avaliaram o impacto da variação nutricional no início da gestação nos ovários da prole após o nascimento, quando a população folicular já passou pela diferenciação e atresia durante a fase gestacional, que acontecem no desenvolvimento ovariano em mamíferos (PEPLING et al., 2006). Nosso estudo, porém apresenta o diferencial por avaliar a influência que a alta ou baixa ingestão alimentar materna acarretou tanto no desenvolvimento ovariano fetal como um todo (peso e comprimento fetal), quanto no desenvolvimento ovariano aos 60 dias de gestação de vacas Nelore. Este período é considerado crítico para o desenvolvimento dos ovários (JUNGEL et al., 2002), uma vez que as células germinativas estão em plena meiose e precisam escapar de processos degenerativos para permanecerem nos ovários.

A influência da nutrição materna no desenvolvimento ovariano fetal foi observada em outras espécies. Em ovinos, Rae et al. (2002) observaram que a redução do peso ovariano de fetos de ovelhas submetidas a restrição nutricional estava associada ao menor número de células germinativas quando comparados aos ovários fetais oriundos de ovelhas superalimentadas no mesmo período de gestação. O delineamento deste estudo se assemelha ao

nosso por avaliar o ovário na fase de pico da reserva ovariana (PEPLING, 2006; ERICKSON, 1966), bem como seus resultados.

O perfil hormonal materno do momento da inseminação artificial até os 60 dias de gestação foi influenciado pela dieta. As concentrações séricas média de progesterona e insulina foram menores ($p < 0,05$) do sétimo ao sexagésimo dia de gestação nos animais sob baixa ingestão alimentar. Sabe-se que a insulina, dentre outras funções, age no corpo lúteo gestacional (CL) aumentando as concentrações periféricas de progesterona (LUCY et al., 1993). Selvaraju e colaboradores, (2003) observaram aumento da concentração de progesterona após ovulação em cabras pré-tratadas com insulina e Mao e colaboradores, (2001) observaram que células luteínicas de suínos tratadas com insulina, quando cultivadas *in vitro*, produzem mais progesterona que as células do grupo controle. Tais resultados puderam ser evidenciados em nosso estudo, em que a elevação da concentração de progesterona foi acompanhada do aumento da concentração de insulina nas vacas do grupo de alta ingestão. Importante considerar que, nesse período, a concentração de LH não variou entre os grupos. No entanto, os mecanismos pelos quais a insulina atua aumentando a concentração plasmática de progesterona pós-ovulação em bovinos não estão claros. Em ruminantes, há evidências mostrando que a insulina exerce influência benéfica no desenvolvimento embrionário (SPICER; ECHTERNKAMP, 1995). Vacas com elevada concentração plasmática de insulina apresentaram blastocistos com maior taxa de clivagem e número total de células embrionárias, antes mesmo da diferenciação do sistema reprodutivo

(AUGUSTIN et al., 2003). Coincidentemente, nas vacas do grupo de alta ingestão com maior concentração de insulina ao longo dos 60 dias de gestação, os fetos eram maiores e mais pesados, quando comparados aos fetos de vacas do grupo de baixa ingestão que apresentaram menor concentração de insulina.

A progesterona é responsável pela manutenção da gestação, e nas vacas é produzida pelo corpo lúteo até os 210-230 dias de gestação e, após esse período, quem assume a produção de progesterona é a placenta (THIBAUT, LEVASSEUR, 2001).

Nos ruminantes, a transformação do corpo lúteo cíclico em corpo lúteo gestacional é assegurada por intervenção do embrião, que bloqueia a ação luteolítica do útero inibindo a secreção de prostaglandina $F2\alpha$ e mantém a ação luteotrófica do LH necessária ao seu desenvolvimento (THIBAUT, LEVASSEUR, 2001). O LH é um dos principais hormônios endócrinos envolvidos na formação do CL (MILVAE et al., 1996), e a produção de progesterona pelo corpo lúteo parece estar altamente correlacionada com o número de receptores de LH (JONES et al., 1992; GARVERICK et al. 1985). Em nosso estudo não foi observada diferença na concentração de LH ao longo dos 60 dias de gestação em bovinos consumindo diferentes dietas. Desse modo, podemos afirmar que a produção de progesterona pelo CL não sofreu interferência do LH. Provavelmente a atividade ovariana foi influenciada por fatores metabólicos como, por exemplo, insulina.

Vacas do grupo de baixa ingestão apresentaram concentração de leptina sérica menor que as vacas dos grupos de alta ingestão e controle.

A menor concentração de leptina sérica observada nas vacas do grupo de baixa ingestão durante os 60 dias, pode ser atribuída à provável diminuição da reserva de tecido adiposo, pois os animais estavam submetidos a dieta de restrição e perderam mais de 1.5 no escore de condição corporal nesse período. E/ou pode estar relacionada ao comprometimento do desenvolvimento placentário que, como o tecido adiposo, também produz leptina (ZHU et al., 2006; VONNAHME et al., 2004). Uma limitação do modelo adotado para remoção cirúrgica do feto (colpotomia) neste estudo foi a impossibilidade de se coletar a placenta para comparação entre os grupos.

Nossos resultados identificaram potencial impacto na pecuária brasileira, pois constatamos que, com a manipulação da dieta materna durante um curto período da gestação é possível produzir fetos com maior peso corporal, comprimento e peso ovariano.

Ademais, o entendimento de fatores que influenciam a formação da reserva folicular ovariana pode favorecer a otimização das biotécnicas reprodutivas com o objetivo de aumentar a disponibilidade de oócitos e prolongar a vida reprodutiva do animal aumentando assim a produção de carne e leite. Além de contribuir para pesquisas sobre casos de baixa fertilidade feminina na espécie humana, uma vez que a cronologia de desenvolvimento ovariano fetal em ruminantes é muito semelhante à de humanos.

Conclusão

Nossos resultados nos permitem inferir que o desenvolvimento fetal e ovariano inicial foi influenciado pela nutrição materna durante os primeiros 60 dias de gestação. Estudos de possíveis fatores específicos que podem influenciar a interação entre a nutrição materna e na possível alteração na expressão de genes que coordenam o desenvolvimento ovariano fetal estão em andamento e poderão gerar mais informações sobre o prejuízo que a dieta materna de vacas Nelore acarreta para o ovário fetal.

Referências

- AUGUSTIN R., POCAR P., WRENZYCKI C., MNIEMANN H., FISCHER B. Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced *in vitro*. **Reproduction**, v.126, p.91-99. 2003.
- BERNAL A.B., VICKERS M.H., HAMPTON M.B., POYNTON R.A., SLOBODA D.M. Maternal undernutrition significantly impacts ovarian follicle number and increases ovarian oxidative stress in adult rat offspring. **PLoS ONE** 5 e15558. 2010.
- BORWICK S.C., RHIND S.M., McMILLEN S.R., RACEY P.A. Effect of undernutrition of ewes from the time of mating on foetal ovarian development in mid-gestation **Reprod. Fertil. Devel.** v.9, p.711–715. 1997.
- BURNS D.S., JIMENEZ-KRASSEL F., IRELAND, J.L., KNIGHT P.G., IRELAND, J.J. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals,

and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. **Biol. Reprod.** v.73, p.54–62. 2005.

Da SILVA P., AITKEN R.P., RHIND S.M., RACEY P.A., WALLACE J.M. Impact of maternal nutrition during pregnancy on pituitary gonadotrophin gene expression and ovarian development in growth-restricted and normally grown late gestation sheep fetuses. **Reproduction**. v.123, Suppl.6, p.769-777. 2002.

ERICKSON B.H. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. **J. Reprod. Fertil.**, v.11, p.97–105. 1966.

EVANS A.C.O., MOSSA F., WALSH S.W, SCHEETZ D., JIMENEZ-KRASSEL F., IRELAND J.L.H., SMITH G.W., IRELAND J.J. Effects of maternal environment during gestation on ovarian folliculogenesis and consequences for fertility in bovine offspring. **Reprod. Domest. Anim.**, v.47, p.31–37. 2012.

FLEMING T.P., VELAZQUEZ M.A., ECKERT J.J., LUCAS E.S., WATKINS A.J. Nutrition of females during the peri-conceptual period and effects on foetal programming and health of offspring. **Anim. Reprod. Scie.**, v.130, p. 193–197. 2012.

GARVERICK H.A., SMITH M.F., ELMORE R.G., MOREHOUSE G.L., AGUDO L.S., ZAHLER W.L. Changes and interrelationships among luteal LH receptors, adenylate cyclase activity and phosphodiesterase activity during the bovine estrous cycle. **J. Anim. Scie.**, 61:216-223. 1985.

IRELAND J.J., SCHEETZ D., JIMENEZ-KRASSEL F., FOLGER J.K., SMITH G.W., MOSSA F., EVANS A.C.O. Evidence that mammary gland infection/injury during pregnancy in dairy cows may have a negative impact on

size of the ovarian reserve in their daughters. **Biol Reprod**, 83:277. (abstract). 2010.

IRELAND J.J., ZIELAK-STECIWKO, A.E., JIMENEZ-KRASSEL F., FOLGER J., BETTEGOWDA A., SCHEETZ D., WALSH S., MOSSA F., KNIGHT P.G., SMITH G.W., LONERGAN P., EVANS A.C.O. Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular estradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. **Biol. Reprod.** v.80, p.954-964. 2009.

IRELAND J.L.H., SCHEETZ D., JIMENEZ-KRASSEL F., THEMME A.P.N., WARD F., LONERGAN P., SMITH G.W., PEREZ G.I., EVANS A.C.O., IRELAND J.J. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. **Biol. Reprod.** v.79, p.1219-1225. 2008.

JIMENEZ-KRASSEL F., FOLGER J.K., IRELAND J.L.H., SMITH G.W., HOU X., DAVIS J.S., LONERGAN P., EVANS A.C.O., IRELAND J.J. Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. **Biol. Reprod.** , v.80, p.1272-1281. 2009.

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

JUENGEL J.L., SAWYER H.R., SMITH P.R., QUIRKE L.D., HEATH D.A., LUN S., WAKEFIELD S.J., McNATTY K.P. Origins of follicular cells and ontogeny of

steroidogenesis in ovine fetal ovaries. **Mol. Cell Endocrinology** v.191, p.1-10. 2002.

LEA R.G., ANDRADE L.P., RAE M.T., HANNAH L.T., KYLE C.E., MURRAY J.F., RHIND S.M., MILLER D.W. Effects of maternal undernutrition during early pregnancy on apoptosis regulators in the ovine fetal ovary. **Reproduction** v.131, p. 113–124. 2006.

LUCY M.C., DE LA SOTA R.L., STAPLES C.R., THATCHER W.W. Ovarian follicular populations in lactating dairy cows treated with recombinant bovine somatotropin (sometribove) or saline and fed diets differing in fat content and energy. **J Dairy Sci**, v.76, Suppl.4, p.1014-1027. 1993

MAO J., TREACY B.K., ALMEIDA F.R., NOVAK S., DIXON W.T., FOXCROFT G.R. Feed restriction and insulin treatment affect subsequent luteal function in the immediate postovulatory period in pigs: progesterone production in vitro and messenger ribonucleic acid expression for key steroidogenic enzymes. **Biol Reprod**, v.64, Suppl.1, p.359-367. 2001.

MARTIN J.L., VONNAHME K.A., ADAMS D.C., LARDY G.P., FUNSTON R.N. Effects of dam nutrition on growth and reproductive performance of heifer calves. **J. Anim. Scie.** v.85, p.841–847. 2007.

MILVAE R.A., HINCKLEY S.T., CARLSON J.C. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**, v.45, p.1327-1349. 1996.

MOSSA F., CARTER F., WALSH S.W., KENNY D.A., SMITH G.W., IRELAND J.L., HILDEBRANDT T.B., LONERGAN P., IRELAND J.J., EVANS A.C.O.

Maternal undernutrition in cows impairs ovarian and cardiovascular systems in their offspring. **Biol. Reprod.**, p.88 - 92. 2013.

MURDOCH W.J., EDWARD A.V.K., VONNAHME A.K., FORD S.P. Ovarian responses to undernutrition in pregnant ewes, USA. **Reprod. Biol. Endocri.** v.I, Suppl. 6, p.1-8. 2003.

PEÑAGARICANO F., SOUZA A.H., CARVALHO P.D., DRIVER A.M., GAMBRA R., KROPP J., HACKBART K.S., LUCHINI D., SHAVER R.D., WILTBANK M.C., KHATIB H. Effect of maternal methionine supplementation on the transcriptome of bovine preimplantation embryos. *PLoS ONE* 8(8): e72302. 2013.

PEPLING M.E. From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. **Genesis** v.44, p.622–632. 2006.

RAE M.T., PALASSIO S., KYLE C.E., BROOKS A.N., LEA R.G., MILLER D.W., RHIND S.M. Effects of maternal undernutrition during pregnancy retards early ovarian development and subsequent follicular development in fetal sheep. **Reproduction** v.122, p.915–922. 2001.

RAE M.T., KYLE C.E., MILLER D.W., HAMMOND A.J., BROOKS A.N., RHIND S.M. The effects of undernutrition, in utero, on reproductive function in adult male and female sheep. **Anim. Reprod. Sci.** v.72, p.63–71. 2002.

SELVARAJU S., AGARWAL S.K., KARCHE S.D., MAJUMDAR A.C. Ovarian response, embryo production and hormonal profile in superovulated goats treated with insulin. **Theriogenology**, v.59, Suppl.5-6, p.1459- 1468. 2003.

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

SULLIVAN T.M., MICKE G.C., GREER R.M., IRVING-RODGERS H.F., RODGERS R.J., PERRY V.E. Dietary manipulation of Bos indicus x heifers during gestation affects the reproductive development of their heifer calves. **Reprod. Fertil. Dev.** v..21, p.773-784. 2009.

TANAKA Y., NAKADA K., MORIYOSHI M., SAWAMUKAI Y. Appearance and number of follicles and change in the concentration of serum FSH in female bovine fetuses. **Reproduction**. v.121, p.777-782. 2001.

THIBAUT C., LEVASSEUR M.C. La reproduction chez les mammifères et l'homme. In: Du corps jaune cyclique au corps jaune gestatif. Paris: **INRA Editions**, 2001. p.479-504.

VONNAHME K.A., REYNOLDS L.P., NIJLAND M.J. FORD S.P. Impacts of undernutrition during early to mid gestation on basal vascular tone of the cotyledonary and caruncular arterial beds in bovine placentomes. **J. Soc. Gynecol. Investig**, v.11, p.222-224. 2004.

WALLACE J.M., BOURKE D.A., AITKEN R.P. Nutrition and fetal growth: paradoxical effects in the overnourished adolescent sheep. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** v.54, p.385-399. 1999.

ZHU M.J., FORD S.P., MEANS W.J., HESS B.W., NATHANIELSZ P.W., DU E.M. Maternal nutrient restriction affects properties of skeletal muscle in offspring. **J. Physiol.** v.575, p.241-250. 2006.

Capítulo III - MUDANÇAS NUTRICIONAIS NO INÍCIO DA GESTAÇÃO ALTERAM O PERFIL TRANSCRIPTÔMICO OVARIANO FETAL EM NELORE

Resumo - Influências ambientais, como a nutrição, durante a fase inicial da gestação de fêmeas bovinas podem ter impacto no desenvolvimento fetal e consequentemente na vida adulta. O desenvolvimento dos ovários dos fetos é estabelecido durante o início da gestação. Testamos a hipótese de que a restrição e/ou excesso de nutrientes ingeridos por vacas durante o terço inicial da gestação interfere no transcriptoma ovariano fetal. Cinquenta vacas Nelore uníparas (Peso Corporal = 488 ± 24 kg; Escore de Condição Corporal = $3.1 \pm 0,1$) foram submetidas a inseminação artificial com sêmen sexado (fêmea) de um único touro e alocadas individualmente em diferentes dietas. A dieta do grupo controle atendeu as exigências de manutenção para a categoria animal (100%), e a dos grupos de alta e baixa ingestão a 180% e 60% dos requerimentos de manutenção respectivamente. O peso vivo e o escore de condição corporal foram avaliados semanalmente a fim de ajustar a dieta de acordo com % de peso individual de cada animal. Aos 60 dias de gestação oito fetos foram removidos por colpotomia (acesso via vaginal), pesados, os ovários dissecados e pesados. Os ovários (um de cada par) foram submetidos à técnica de RNA-Seq. Observou-se que o status nutricional materno durante os primeiros 60 dias de gestação acarretou diferenças no padrão de expressão gênica entre os grupos controle, alta ou baixa ingestão. Um total de 79 genes mostraram expressão diferencial entre os tratamentos (FDR 0,05), sendo que alguns eram relacionados ao desenvolvimento embrionário e ovariano. Assim, podemos concluir que mudanças na nutrição materna durante os primeiros 60 dias de gestação podem alterar o perfil transcriptômico dos ovários fetais. Este período de exposição é crítico para o desenvolvimento ovariano fetal, uma vez que células germinativas estão em plena meiose e precisam escapar de processos degenerativos para permanecerem nos ovários. Logo, o

desenvolvimento prejudicado no início da meiose poderia reduzir o número de oócitos no ovário da fêmea.

Palavras-chave: Bovinos, expressão gênica, nutrição, ovários

Introdução

Estudos em humanos e animais têm demonstrado que a nutrição materna durante diferentes estágios da gestação podem induzir a mudanças fisiológicas e epigenéticas permanentes no desenvolvimento e metabolismo da prole na fase adulta (BURDGE et al., 2010; LAN et al., 2013; GAO et al., 2014).

Estudos em ovinos (LEA et al., 2006; RAE et al., 2001) e bovinos (MOSSA et al., 2013; EVANS et al., 2012; MARTIN et al., 2007) tem demonstrado que a prole de animais submetidos a restrição nutricional durante a gestação, manifestavam alterações reprodutivas, incluindo baixas taxas de ovulação e concepção e deficiente sobrevivência embrionária. A causa das oscilações em características reprodutivas ainda não está clara, e tem sido associada a prováveis perturbações sofridas durante o desenvolvimento das células germinativas afetando a meiose das mesmas. Murdoch et al. (2003) reportaram elevada expressão do fator anti-apoptótico, BCL-2, próximo ao momento da morte de células germinativas. Em taurinos, ovários de bezerras nascidas de gestação que passaram por desafio nutricional apresentavam baixa contagem de folículos antrais e baixa concentração de AMH (MOSSA et al., 2013), comprometendo assim, a longevidade da vida reprodutiva em animais adultos. Resultados similares foram reportados em ratas BERNAL et al., 2010). Alterações nutricionais maternas no período periconcepcional acarretaram modificações já no início do desenvolvimento embrionário (PEÑAGARICANO et al., 2013; FLEMING et al., 2012), tais como mudanças no padrão de metilação.

A formação da reserva folicular ovariana de bovinos e outros mamíferos é determinada no início da gestação. Acredita-se que os animais nascem com um número finito e não renovável de oócitos (PEÑAGARICANO et al., 2013; PEPLING, 2006). Em fetos bovinos o número de folículos pré-antrais vai reduzindo do início da gestação até o nascimento (TANAKA et al., 2001). O número de folículos varia entre indivíduos [16] e trata-se de característica herdável (IRELAND et al., 2009; JIMENEZ-KRASSEL et al., 2009; IRELAND et al., 2008). Logo, um comprometimento do desenvolvimento ovariano pode comprometer o desempenho reprodutivo da cria e ser transmitidas para gerações subseqüentes.

O entendimento de fatores que influenciam a formação da reserva folicular ovariana pode favorecer a otimização das biotécnicas reprodutivas com o objetivo de aumentar a disponibilidade de oócitos e prolongar a vida reprodutiva do animal aumentando a produção de carne e leite. Além de contribuir para pesquisas sobre casos de baixa fertilidade feminina na espécie humana, uma vez que a cronologia de desenvolvimento ovariano fetal em ruminantes é muito semelhante à de humanos (MIHM; EVANS, 2008).

Sendo assim, hipotetizamos que a restrição ou o excesso de ingestão de nutrientes por vacas Nelore durante os primeiros 60 dias de gestação alteraria o padrão de expressão gênica dos ovários fetais da prole.

Material e métodos

O procedimento envolvendo animais foi aprovado pela Comissão de Experimentação para Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária FMVA – UNESP.

Cinquenta vacas uníparas Nelore (*Bos indicus*) (Peso corporal= 488 ± 24 kg, Escore de condição corporal= 3 ± 0.1 ; 48 meses de idade) foram submetidas à IATF com sêmen (de um único touro) sexado para fêmea, alocadas em baias individuais e alimentadas diariamente com uma de três dietas; o grupo controle

(Controle, n=17) foi alimentado com os requerimentos de manutenção (100 %), grupo alta ingestão (ALTA, n=17; 180%) e grupo baixa ingestão (BAIXA, n=16; 60%) ingestão do respectivo percentil necessários para manutenção. Os tratamentos corresponderam a 1,37%, 0,82% e 2,47% de ingestão de matéria-seca por peso vivo para o grupo controle, baixa ingestão e alta ingestão, respectivamente. Os tratamentos foram iniciados no dia da inseminação artificial e terminaram após completos 60 dias de gestação. As vacas foram igualmente distribuídas nos grupos de acordo com a contagem de folículos antrais (CFA: número de folículos antrais ≥ 3 mm). Os animais passaram por acompanhamento ultrassonográfico transretal prévio ao início do experimento por um período mínimo de seis meses para que fosse estabelecida a contagem folicular antral, a qual foi posteriormente confirmada pela quantificação do hormônio anti-mulleriano (AMH) sérico (Bovine AMH ELISA, AnshLabs, AL-114) (IRELAND et al., 2008).

A dieta das vacas durante os 60 dias de experimento era composta de 48,2% de bagaço de cana, 16,53% de milho moído, 29,42% de polpa cítrica, 3,23% de farelo de soja, 1,24% de uréia, 0,58% de sal mineral, 0,36% de cloreto de potássio e 0,44% de calcário calcítico, totalizando 72% de matéria-seca na dieta total. O peso e o escore de condição corporal dos animais foram mensurados semanalmente para ajuste individual das dietas.

Obtenção dos ovários fetais e extração de RNA

Um total 21 vacas, das 50 inseminadas, mantiveram a gestação por 30 dias e dessas 21, 11 mantiveram a gestação até o 60º dia e foram então, submetidas à colpotomia para remoção fetal. Para a colpotomia os animais foram contidos em estação e após anestesia epidural realizou-se uma incisão dorsal à cérvix no fórnix vaginal, entre 11 e 2 h, com auxílio do Bisturi Q® para ter acesso ao corno gestante. Outra incisão (± 4 cm) foi realizada no corno uterino gestante com lâmina de bisturi (nº 24) protegida pela mão enluvada, a ponto de permitir a remoção do feto pós-ruptura do cordão umbilical. As incisões, por serem pequenas, cicatrizaram por segunda intenção. Em virtude

das dificuldades da técnica, foi possível a remoção de somente oito fetos (sendo alta ingestão n=3, baixa ingestão n=3 e controle n=2). Os fetos foram transferidos para uma placa de Petri estéril, transportados até o laboratório e imediatamente pesados, mensurados (*crown-rump*) e os ovários removidos, pesados, armazenados individualmente, embebidos em *RNA later Tissue Collection*[®] (AM7020/Ambion) e estocados a -80°C.

Foi realizada a extração do RNA total de um dos ovários de cada feto utilizando-se o kit *RNeasy Plus Mini Kit 50*[®] (#74134) *Qiagen*, de acordo com as recomendações do fabricante.

RNA-Seq

Para realização do RNA-Seq, utilizamos o protocolo *TruSeq RNA Sample Prep Guide*, como descrito pelo fabricante Illumina (SULTAN et al., 2012). Após a extração do RNA total, as amostras dos ovários fetais foram purificadas em tampão para atingirem de 0,1 a 4 µg de RNA total. As bibliotecas foram purificadas e amplificadas (200pb ±30 pb) por meio de PCR com primers específicos para os adaptadores e sua qualidade foi determinada no *Agilent 2100 Bioanalyser* (*Agilent Technologies*) com o auxílio de um chip DNA 1000. O sequenciamento do RNAm foi realizado pelo aparelho o *HiScan 500* (*Illumina, Inc., San Diego, CA, EUA*), de acordo com as instruções do fabricante, utilizando o protocolo de *pair-end reads*.

Análise estatística

Pré-processamento e montagem

Os dados obtidos pelo *HiScan 500* foram analisados em quatro etapas principais. Na etapa de obtenção dos dados brutos foi utilizado o *software* CASAVA 1.8.2 para transformação dos dados brutos em *reads* no formato fastq acompanhados dos *scores* de qualidade phred. A filtragem das *reads* de baixa qualidade, sequências de adaptadores e vetores foi realizada pelo programa Seqclean, utilizando como cutoff qualidade inferior a 24QScore. Após filtragem, *reads* com comprimento inferior a 65pb foram removidas.

Mapeamento

O mapeamento das amostras foi feito contra o genoma de *Bos taurus* (UMD3.1, versão masked). Para o mapeamento foi utilizado o programa Tophat v.2.0.8 (TRAPNEL et al., 2009) / Bowtie2 v2.1.0 (LANGMEAD et al., 2012). Em seguida a qualidade do mapeamento foi checada para cada amostra utilizando o pacote Samtools v.0.1.18 (ferramenta flagstat, (LI et al., 2009). Utilizando o mesmo programa, o mapeamento foi organizado (ferrament sort) e o arquivo foi usado para a etapa de obtenção de isoformas utilizando o pacote Cufflinks 2.1.1 (TRAPNELL et al., 2010).

Análise da expressão diferencial dos genes

Os arquivos dos transcritos obtidos para cada amostra foram então comparados utilizando-se a ferramenta Cuffmerge do pacote Cufflinks, onde os transcritos e isoformas com frequência superior a 0.05 foram agrupados e após obtenção das contagens, os grupos foram analisados usando o script do programa DESeq2, pacote do R/Bioconductor (GETLEMAN et al., 2004). Os dados foram normalizados e em seguida foi realizado o teste binomial negativo de expressão e os transcritos cujas amostras tinham as contagens normalizadas médias inferiores ao valor 5 foram removidos. Sobre o teste foi aplicada a correção de FDR-Benjamini-Hochberg (1995) para múltiplos testes a fim de evitar os erros tipo I, ou seja, falso positivos.

Validação dos genes diferencialmente expressos

Três genes diferencialmente expressos foram escolhidos para validação dos resultados do RNA-Seq: *kinase insert domain receptor* (KDR), *Elongation factor 1-alpha 1* (EEF1A1), *Anti-Mullerian hormone receptor* (AMHR). O gene constitutivo *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) foi utilizado como controle interno das reações. Amostras de RNA total, as mesmas utilizadas para o RNA-Seq, foram submetidas à transcrição reversa utilizando a M-MLV Reverse Transcriptase (AM#2044 - Ambion by Life Technologies, EUA), seguindo as instruções do fabricante e o kit Power SYBR® (Qiagen) utilizado para estimar a expressão. As amostras foram corridas em triplicata no MxPro

qPCR Stratagene® real time (Agilent Technologies). Os valores de expressão relativa dos genes foram calculadas a partir dos valores quantificação relativa do gene alvo em função do valor do gene constitutivo fornecidos pelo software do MxPro QPCR Stratagene®.

Resultados

RNA-Seq

O RNA-Seq gerou um total de 104.385.408, 116.105.636 e 70.930.958 de reads para os ovários fetais dos grupos de alta ingestão (ALTA), baixa ingestão (BAIXA) e controle, respectivamente. Do total de reads sequenciadas mais de 80% foram mapeadas com o genoma de referência (*Bos taurus* UMD3.1) para os três grupos experimentais (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo das sequências de reads mapeadas e alinhadas com o genoma bovino de referência (*Bos taurus* UMD3.1)

Grupos	Total de reads	Reads mapeados	% reads mapeados	Pares de reads mapeados (%)	% alinhados
Alta	104.385.408	88.389.125	84,68	77,34	98,89
Baixa	116.105.636	96.767.263	83,34	78,60	97,77
Controle	70.930.958	58.685.645	82,74	77,14	96,96

Identificação dos genes diferencialmente expressos

Quando realizada a análise do total de genes seqüenciados foi possível identificar 57, 20 e 2 genes diferencialmente expressos entre os ovários dos grupos ALTA versus Controle, BAIXA versus Controle e ALTA versus BAIXA, respectivamente (FDR < 0,05), sendo 8 genes comuns entre as comparações Controle X Alta e Controle X Baixa Ingestão (Figura 1 e 2).

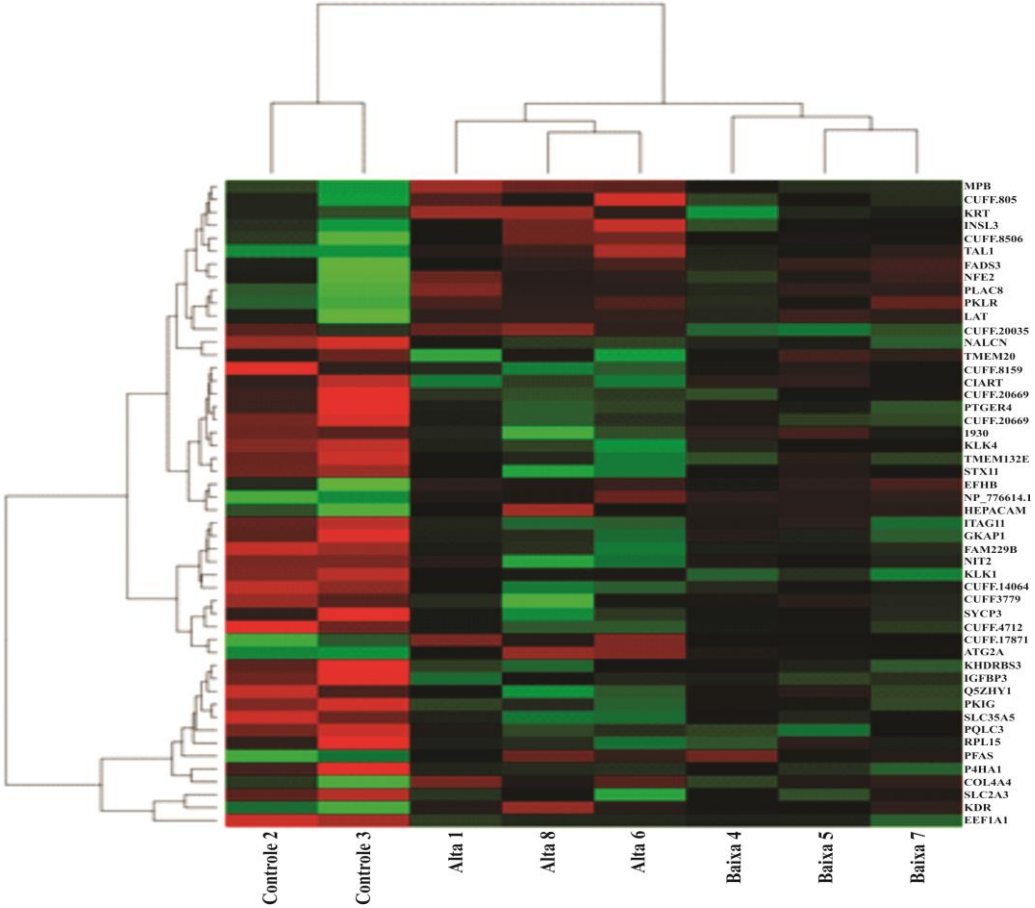


Figura 1. Clusterização dos transcritos de cada amostra pertencente ao grupo Controle, ALTA e BAIXA.

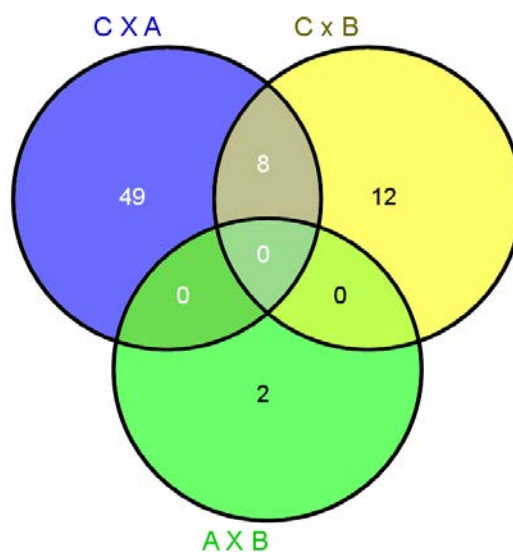


Figura 2. Diagrama dos genes diferencialmente expressos entre os ovários fetais dos grupos Controle, ALTA e BAIXA (FDR<0,05).

Dos 57 genes diferencialmente expressos entre o Controle e ALTA, 24 genes tiveram expressão elevada no grupo ALTA e 33 genes elevada expressão no grupo Controle. Na comparação Controle versus BAIXA, dos 20 genes diferencialmente expressos, 13 genes tiveram elevada expressão no grupo BAIXA e 7 genes com elevada expressão no Controle. Quando comparados ALTA versus BAIXA somente dois genes foram diferencialmente expressos, sendo um altamente expresso no grupo ALTA e o outro no grupo BAIXA. Quando analisado separadamente os oito genes expressos de forma comum entre as comparações Controle X Alta e Controle X Baixa foi possível observar que a alteração na dieta materna alterou de maneira semelhante o padrão de expressão gênica no ovário fetal (Figura 3).

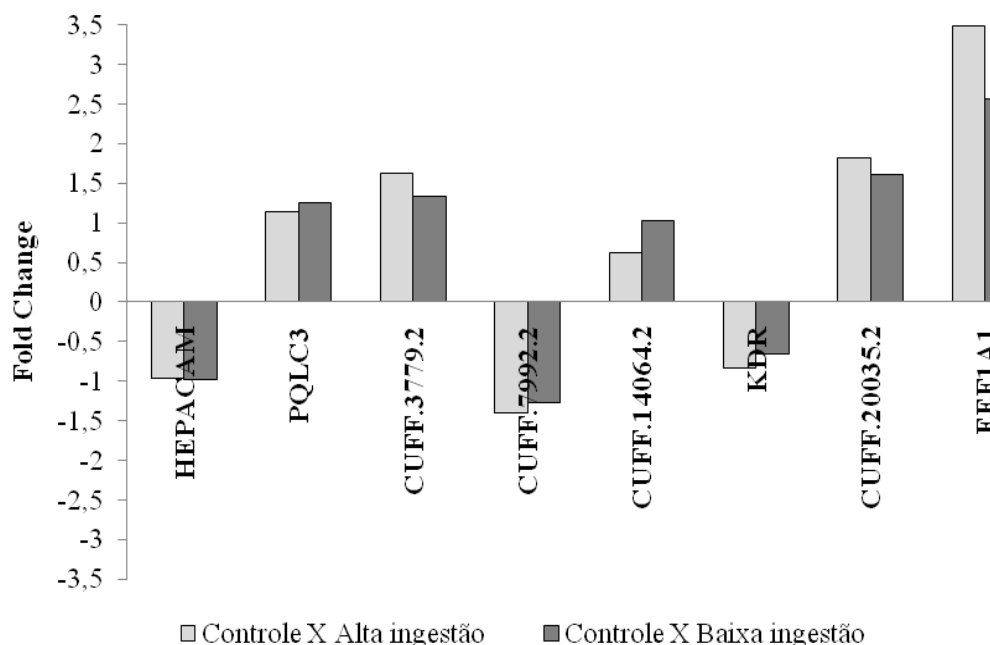


Figura 3. Padrão de expressão dos 8 genes comuns diferencialmente expressos entre as comparações Controle versus ALTA e Controle versus BAIXA.

Análise dos termos GO (Gene ontology)

Para identificação dos processos biológicos e funções moleculares da rede de genes diferencialmente expressos entre os grupos tratados e controle foi realizado a análise de enriquecimento do conjunto de genes mapeados em cada grupo.

A partir dos genes diferencialmente expressos que apresentavam $FDR < 0,05$ foram identificados 39 termos GO significativamente enriquecidos (Figura 4 A; B).

Muitas das categorias funcionais encontradas são diretamente relacionadas ao desenvolvimento fetal e gonadal, ex. *tube development* (GO:0035295). Além de vários termos GO diretamente relacionados ao desenvolvimento ovariano: *female gonad development* (GO:0008585), *ovulation cycle process* (GO:0022602), *ovulation cycle* (GO:0042698), *development of primary female sexual characteristics* (GO:0046545), *female sex differentiation* (GO:0046660).

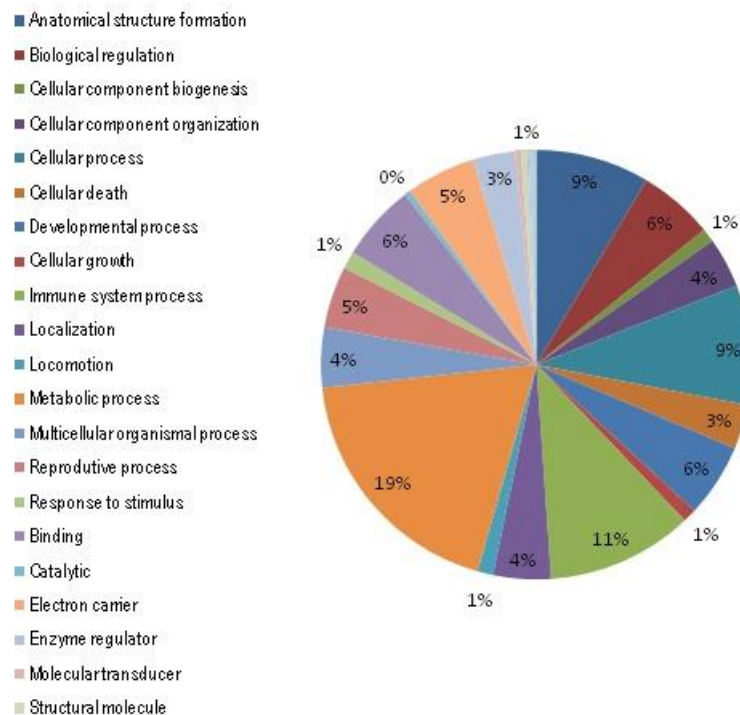


Figura 4a: Análise de enriquecimento a partir dos genes diferencialmente expressos nos ovários fetais dos grupos Controle e BAIXA.

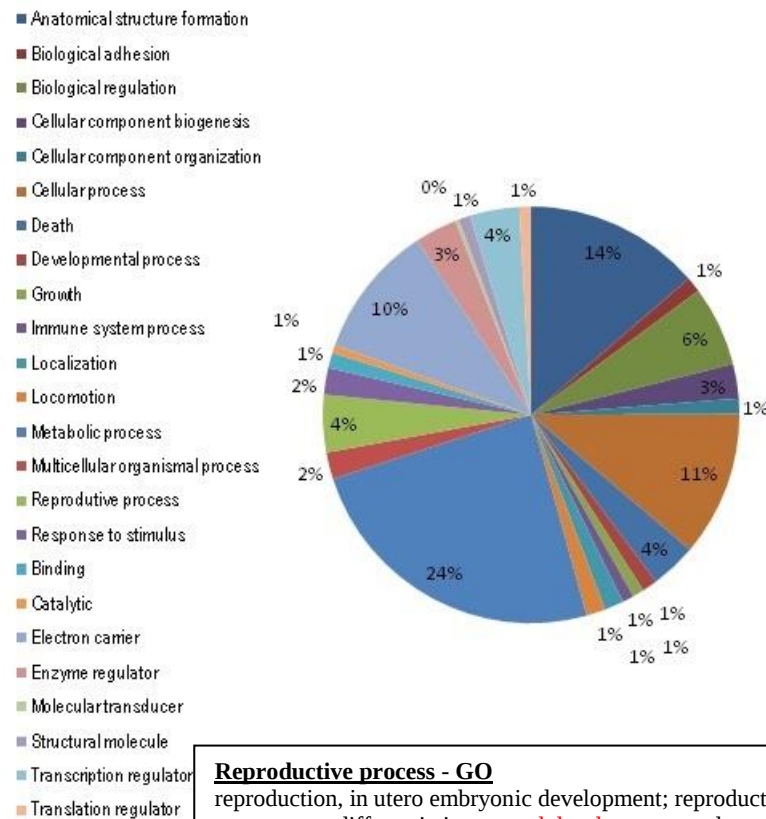


Figura 4b: Análise de enriquecimento a partir dos genes diferencialmente expressos nos ovários fetais dos grupos Controle e ALTA.

Para validação dos genes identificados pelo seqüenciamento, três genes foram selecionados e suas expressões foram avaliadas usando o qRT-PCR. A figura 5 demonstra a expressão relativa dos três genes dentre os três grupos experimentais. Tais genes mostraram padrão de expressão semelhante entre os dois métodos (PCR e RNA-Seq).

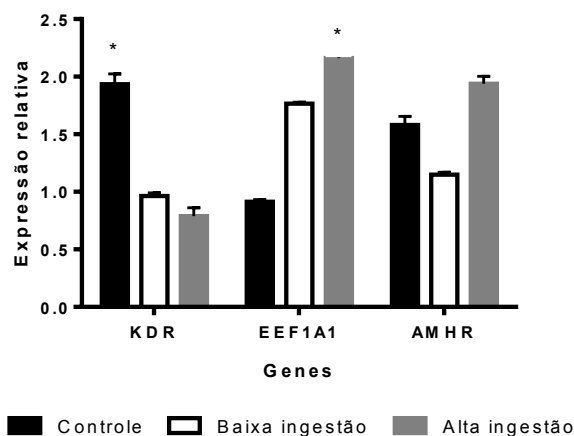


Figura 5. qRT-PCR confirmatório da expressão diferencial de três genes identificados pelo RNA-Seq. * $p < 0,05$

Discussão

Já é bem estabelecido que alterações nutricionais durante o período periconceptual podem modificar o desenvolvimento fetal durante a gestação e, por sua vez afetar a saúde e o metabolismo fisiológico do animal na fase adulta (FLEMING et al., 2012; BARKER, 2007; McMILLEN; ROBINSON, 2005). De particular interesse para esta pesquisa, estudo prévio mostrou que a restrição nutricional no terço inicial da gestação de vacas taurinas foi capaz de influenciar a formação da reserva folicular ovariana da prole além de comprometer o desenvolvimento de outros órgãos (MOSSA et al., 2013). Nosso estudo foi especificamente delineado para determinar se vacas Nelore superalimentadas ou subalimentadas durante os primeiros 60 dias de gestação teriam fetos com a expressão gênica alterada nos ovários quando comparados a um grupo controle. Notavelmente, a alteração da dieta materna causou

mudanças no transcriptoma dos ovários fetais. Nossos achados suportam a hipótese de que a formação ovariana fetal inicial ocorre durante uma janela particularmente sensível à mudanças da nutrição materna, embora a demanda de nutrientes do feto nesse período seja mínima considerando o meio interno materno como um todo.

A diferença no transcriptoma ovariano dos grupos tratados e controle foi acompanhada de alteração do peso (corporal e ovariano) e tamanho fetal (dados não publicados). Alterações no perfil de expressão gênica em virtude de modificações na dieta materna durante o período periconceptual já foram demonstradas em blastocistos taurinos (PEÑAGARICANO et al., 2013; SINCLAIR et al., 2007).

Em nosso estudo, 79 do total de genes analisados expressaram-se de forma diferencial entre os tratamentos ($FDR < 0,05$). Interessantemente, os oito genes expressos de maneira incomum entre as comparações controle X alta ingestão e controle X baixa ingestão (Figura 2) mostraram o mesmo padrão de expressão (Figura 3), ou seja, independente da modificação da dieta sofrida pela vaca durante os primeiros 60 dias de gestação, o padrão da alteração, super expressos ou pouco expressos (*up regulated* ou *down regulated*) no ovário fetal foram similares. Isso fica ainda mais evidenciado quando comparados os clusters do grupo controle com os grupos tratados (Figura 1). Essa modificação do transcriptoma em função da nutrição durante o desenvolvimento é objeto de estudo de grupos de pesquisa (CHMURZYNSKA, 2010; BURDGE et al., 2007; WU et al., 2004).

Intencionalmente o período de alteração da dieta coincidiu com o período crítico do desenvolvimento ovariano fetal (JUNGEL et al., 2002), para demonstrar que alterações nutricionais maternas podem modificar o padrão de expressão gênico gonadal do feto, e vir a comprometer a atividade dos ovários na vida adulta do animal.

De especial interesse, nós observamos que muitos dos genes diferencialmente expressos não apresentam relatos na literatura, até o momento, de participação no desenvolvimento ovariano bovino, o que nos instiga a investigar, em estudos futuros, os efeitos da deleção de alguns desses genes no desenvolvimento ovariano fetal. Um exemplo é o gene *eEF1A1*, cuja expressão foi identificada em células germinativas e estágios iniciais de desenvolvimento embrionário de sapos (ABDALLAH et al., 1991; DESCHAMPS et al., 1991; DJE et al., 1990), já em mamíferos, como ratos, sua expressão foi relatada em músculos, cérebro e coração (KHALYFA et al., 2001; LEE et al., 1999).

Além disso, várias categorias funcionais diretamente relacionadas ao desenvolvimento gonadal foram significativamente enriquecidas com os genes diferencialmente expressos, tais como *female gonad development* (GO:0008585), *ovulation cycle process* (GO:0022602), *ovulation cycle* (GO:0042698), *development of primary female sexual characteristics* (GO:0046545), *female sex differentiation* (GO:0046660).

Compreender como o mecanismo molecular, que regula o desenvolvimento ovariano fetal, pode ser afetado pela alteração da dieta

materna durante a gestação acarretará impacto na bovinocultura, uma vez que a pecuária brasileira tem uma demanda crescente de animais com alto mérito genético, impulsionando assim o uso de biotecnologias avançadas, notadamente àquelas associadas à reprodução animal, tais como a superovulação (SOV) e transferência de embrião (TE) e FIV que dependem dentre outros fatores de uma elevada reserva ovariana. Atualmente, o Brasil é um dos países que mais gera produtos utilizando essas biotecnologias. Segundo levantamento da IETS (2012), o país produziu aproximadamente 270.000 embriões *in vitro*, cerca de 80% da produção mundial.

A técnica de seqüenciamento de nova geração, RNA-Seq, apresenta a habilidade para mensurar uma maior gama de genes expressos e identificar *splicing* alternativos e transcritos ainda não anotados no genoma bovino. O seqüenciamento tem sido utilizado para obtenção de seqüência de dados para análise transcricional em diversas espécies (BALAKRISHNAN et al., 2012; DRIVER et al., 2012; SULTAN et al., 2008). Então, nós utilizamos esta tecnologia para investigarmos se o padrão de expressão gênica de ovários fetais bovinos poderia ser alterado pela manipulação da dieta materna. Até o presente momento, foi a primeira aplicação do RNA-Seq para investigação de diferenças transcriptômicas em ovários fetais bovinos causadas por influências nutricionais sofridas por vacas Nelore (*Bos indicus*) durante os primeiros 60 dias de gestação, período crítico para o desenvolvimento ovariano dos fetos.

Estudos prévios indicam alteração nutricional de vacas taurinas durante o terço inicial da gestação acarretaram redução de até 60% da reserva folicular

ovariana da prole na vida adulta (MOSSA et al., 2013; SULIVAN et al., 2009). Nossos resultados podem ajudar a elucidar tal fato, uma vez que encontramos diferenças a nível molecular, com padrão de expressão gênica diferente entre os grupos cujas mães foram submetidas à dietas de alta (180% dos requerimentos de manutenção) ou baixa ingestão (60% dos requerimentos de manutenção) comparadas ao grupo controle (100% manutenção).

Conclusão

Conclui-se que houve influência no padrão de expressão gênica ovariano fetal decorrente da alteração nutricional materna durante os primeiros 60 dias de gestação. A identificação de genes diferencialmente expressos que não apresentam papel conhecido no desenvolvimento gonadal poderão ser utilizados na tentativa de elucidar mecanismos causadores de alterações na reserva ovariana.

Referências

ABDALLAH B., HOURDRY J., KRIEG P.A., DENIS H., MAZABRAUD A. Germ cell-specific expression of a gene encoding eukaryotic translation elongation factor 1 alpha (eEF-1 alpha) and generation of eEF-1 alpha retropseudogenes in *Xenopus laevis*, **Proc Natl Acad Sci USA** v.88, p. 9277-9281. 1991.

BALAKRISHNAN C.N., LIN Y.C., LONDON S.E., CLAYTON D.F. RNAseq transcriptome analysis of male and female zebra finch cell lines. **Genomics** v.100, suppl.6, p.363–369. 2012.

BARKER D.J. The origins of the developmental origins theory. **J Intern Med.** v.261, p.412–417. 2007.

BENJAMINI Y., HOCHBERG Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing". **J. Royal Statistical Society, Series B (Methodological)** v.57, p.289–300. 1995.

BERNAL A.B., VICKERS M.H., HAMPTON M.B., POYNTON R.A., SLOBODA D.M. Maternal undernutrition significantly impacts ovarian follicle number and increases ovarian oxidative stress in adult rat offspring. **PLoS ONE** 5 e15558. 2010.

BURDGE G.C., HANSON M.A., SLATER-JEFFERIES J.L., LILLYCROP K.A. Epigenetic regulation of transcription: a mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life? **British Journal of Nutrition** v.97, p.1036–1046. 2007.

BURDGE G.C., LILLYCROP K.A. Nutrition, Epigenetics, and Developmental Plasticity: Implications for Understanding Human Disease. **In:** Cousins RJ, editor. *Annual Review of Nutrition*, 30: 315–339. 2010.

BURNS D.S., JIMENEZ-KRASSEL F., IRELAND, J.L., KNIGHT P.G., IRELAND, J.J. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals,

and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. **Biol. Reprod.**, v.73, p.54–62. 2005.

CHMURZYNSKA A. Fetal programming: link between early nutrition, DNA methylation, and complex diseases. **Nutrition Reviews** v.68, p.87–98. 2010.

DESCHAMPS S., MORALES J., MAZABRAUD A., LE MAIRE M., DENIS H, BROWN D.D. Two Forms of Elongation Factor 1 α (EF1 α O and 42Sp50), Present in Oocytes, but Absent in Somatic Cells of *Xenopus laevis*. **J. Cell Biol.**, v.114, suppl.6, p.1109-1111. 1991.

DJE M.K., MAZABRAUD A., VIEL A., LE MAIRE M., DENIS H., CRAWFORD E., BROWN D.D. Three genes under different developmental control encode elongation factor 1- α in *Xenopus laevis*, **Nucleic Acids Res** v.18, p.3489-3493. 1990.

DRIVER A.M, PENAGARICANO F., HUANG W., AHMAD K.R., HACKBART K.S., WILTBANK M.C., KHATIB H. RNA-Seq analysis uncovers transcriptomic variations between morphologically similar in vivo- and in vitro-derived bovine blastocysts. **BMC Genom** v.13, p.118. 2012.

ERICKSON B.H. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. **J. Reprod. Fert.** v.11, p.97–105. 1996.

EVANS A.C.O., MOSSA F., WALSH S.W., SCHEETZ D., JIMENEZ-KRASSEL F., IRELAND J.L.H., SMITH G.W., IRELAND J.J. Effects of maternal environment during gestation on ovarian folliculogenesis and consequences for fertility in bovine offspring. **Reprod. Domest. Anim.** v,47, p.31–37. 2012.

FLEMING T.P., VELAZQUEZ M.A., ECKERT J.J., LUCAS E.S., WATKINS A.J. Nutrition of females during the peri-conceptional period and effects on foetal programming and health of offspring. **Anim. Reprod. Scie.** 130: 193–197. 2012.

GAO F., LIU Y., LI L., LI M., ZHANG C., AO C., XIANZHI HOU Effects of maternal undernutrition during late pregnancy on the development and function of ovine fetal liver. **Anim. Reprod. Scie.** v.147, suppl.3-4, p.99-105. 2014.

GENTLEMAN R., CAREY V.J., BATES D.M., BOLSTAD B., DETTLING M., DUDOIT S., ELLIS B., GAUTIER L., GE Y. Bioconductor: Open software development for computational biology and bioinformatics R. **Genome Biology**, 5:R80. 2004.

IRELAND J.J., ZIELAK-STECIWKO A.E., JIMENEZ-KRASSEL F., FOLGER J., BETTEGOWDA A., SCHEETZ D., WALSH S., MOSSA F., KNIGHT P.G., SMITH G.W., LONERGAN P., EVANS A.C.O. Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular estradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. **Biol. Reprod.** v.80, p.954-964. 2009.

IRELAND J.L.H., SCHEETZ D., JIMENEZ-KRASSEL F., THEMME A.P.N., WARD F., LONERGAN P., SMITH G.W., PEREZ G.I., EVANS A.C.O., IRELAND J.J. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. **Biol. Reprod.** v.79, p.1219-1225. 2008.

JIMENEZ-KRASSEL F., FOLGER J.K., IRELAND J.L.H., SMITH G.W., HOU X., DAVIS J.S., LONERGAN P., EVANS A.C.O., IRELAND J.J. Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. **Biol. Reprod.**, v.80, p.1272-1281. 2009.

JUENGEL J.L., SAWYER H.R., SMITH P.R., QUIRKE L.D., HEATH D.A., LUN S., WAKEFIELD S.J., MCNATTY K.P. Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries. **Molecular Cell Endocrinology** v.191, p.1-10. 2002.

KHALYFA A., BOURBEAU D., CHEN E., PETROULAKIS E., PAN J., XU S., WANG E. Characterization of elongation factor-1A (eEF1A-1) and eEF1A-2/S1 protein expression in normal and wasted mice, **J. Biol. Chem.** v.276, p.22915-22922. 2001.

LAN X., CRETNEY E.C., KROPP J., KHATEEB K., BERG M., Maternal diet during pregnancy induces gene expression and DNA methylation changes in fetal tissues in sheep. **Frontiers in Genetics** 4: 49. 2013.

LANGMEAD B, SALZBERG S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods** v.9, p.357-359. 2012.

LEA R.G., ANDRADE L.P., RAE M.T., HANNAH L.T., KYLE C.E., MURRAY J.F., RHIND S.M., MILLER D.W. Effects of maternal undernutrition during early pregnancy on apoptosis regulators in the ovine fetal ovary. **Reproduction** v.131, p.113–124. 2006.

LEE S., WOLFRAIM L.A., WANG E. Differential expression of S1 and elongation factor-1 alpha during rat development, **J. Biol. Chem** v.268, p.24453-24459. 1993.

LI H., HANDSAKER B., WYSOKER A., FENNELL T., RUAN J., HOMER N., MARTH G., ABECASIS G., DURBIN R. 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence alignment/map (SAM) format and SAMtools. **Bioinformatics** v.25, p.2078-9. 2009.

MARTIN J.L., VONNAHME K.A., ADAMS D.C., LARDY G.P., FUNSTON R.N. Effects of dam nutrition on growth and reproductive performance of heifer calves. **J. Anim. Scie.**, v.85,p.841–847. 2007.

McMILLEN I.C., ROBINSON J.S. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. **Physiol Rev.** v.85, p.571–633. 2005.

MIHM M., EVANS A.C. Mechanisms for dominant follicle selection in monovulatory species: a comparasion of morphological, endocrine and intraovarian events in cows, mares and women. **Reprod. Domest. Anim.** v.43, suppl.2, p.48-56. 2008.

MOSSA F., CARTER F., WALSH S.W., KENNY D.A., SMITH G.W., IRELAND J.L., HILDEBRANDT T.B., LONERGAN P., IRELAND J.J., EVANS A.C.O. Maternal undernutrition in cows impairs ovarian and cardiovascular systems in their offspring. **Biol. of Reprod.**, p.88 - 92. 2013.

MURDOCH W., VAN KIRK E., VONNAHME K., FORD S. Ovarian responses to undernutrition in pregnant ewes, USA. **Reprod. Biol. Endocrinol.** v.1, p.1–8. 2003.

PEÑAGARICANO F., SOUZA A.H., CARVALHO P.D., DRIVER A.M., GAMBRA R., KROPP J., HACKBART K.S., LUCHINI D., SHAVER R.D., WILTBANK M.C., KHATIB H. Effect of maternal methionine supplementation on the transcriptome of bovine preimplantation embryos. **PLoS ONE** 8(8): e72302. 2013.

PEPLING M.E. From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. **Genesis** v.44, p.622–632. 2006.

RAE M.T., PALASSIO S., KYLE C.E., BROOKS A.N., LEA R.G., MILLER D.W., RHIND S.M. Effects of maternal undernutrition during pregnancy retards early ovarian development and subsequent follicular development in fetal sheep. **Reproduction** v.122, p.915–922. 2001.

SINCLAIR K.D., ALLEGRUCCI C., SINGH R., GARDNER D.S., SEBASTIAN S. DNA methylation, insulin resistance, and blood pressure in offspring determined by maternal periconceptional B vitamin and methionine status. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v.104, p. 19351–19356. 2007.

SULLIVAN T.M., MICKE G.C., GREER R.M., IRVING-RODGERS H.F., RODGERS R.J., PERRY V.E. Dietary manipulation of Bos indicus x heifers during gestation affects the reproductive development of their heifer calves. **Reprod. Fertil. Dev.** v.21, p.773-784. 2009.

SULTAN M., SCHULZ M.H., RICHARD H., MAGEN A., KLINGENHOFF A., SCHERF M., SEIFERT M., BORODINA T., SOLDATOV A., PARKHOMCHUK D. A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. **Science** v.321, suppl.5891, p.956–960. 2008

TANAKA Y., NAKADA K., MORIYOSHI M., SAWAMUKAI Y. Appearance and number of follicles and change in the concentration of serum FSH in female bovine fetuses. **Reproduction**. v.121, p.777-782. 2001.

TRAPNELL C., PACHTER L., SALZBERG S. L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. **Bioinformatics** (Oxford, England), v.25, suppl.9, p.1105-1111. 2009.

TRAPNELL C., WILLIAMS B.A., PERTEA G., MORTAZAVI A.M., KWAN G., VAN BAREN M.J., SALZBERG S.L., WOLD B., PACHTER L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. **Nature Biotechnology**, v.28, p.511-515. 2010.

WU G.Y., BAZER F.W., CUDD T.A., MEININGER C.J., SPENCER T.E. Maternal nutrition and fetal development. **J. Nutrition** v.134, p.2169–2172. 2004.

Capítulo IV – Implicações

A variação do aporte nutricional de vacas Nelore nos primeiros 60 dias de gestação influenciou o desenvolvimento fetal, alterando parâmetros como peso e comprimento corporal, peso e perfil transcriptômico do ovariano.