

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**EXPRESSÃO DOS TRANSCRITOS DO RECEPTOR DE LH EM
CÉLULAS DA GRANULOSA DE FÊMEAS NELORE
SUBMETIDAS OU NÃO À SUPERESTIMULAÇÃO OVARIANA**

PAULO FERNANDES

**Botucatu - SP
2008**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**EXPRESSÃO DOS TRANSCRITOS DO RECEPTOR DE LH EM
CÉLULAS DA GRANULOSA DE FÊMEAS NELORE
SUBMETIDAS OU NÃO À SUPERESTIMULAÇÃO OVARIANA**

PAULO FERNANDES

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

Orientador: Prof. Dr. Ciro Moraes Barros

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

Fernandes, Paulo.

Expressão dos transcritos do receptor de LH em células da granulosa de fêmeas Nelore submetidas ou não à superestimulação ovariana/. Paulo Fernandes. – Botucatu: [s.n.], 2008.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2008.

Orientador: Ciro Moraes Barros

Capes: 50504002

1. Bovino – Reprodução.

CDD 636.20824

Palavras-chave: Nelore; Expressão gênica; Folículo pré-ovulatório; Receptor do hormônio luteinizante; RT-PCR.

Nome do Autor: **PAULO FERNANDES**

Título: **EXPRESSÃO DOS TRANSCRITOS DO RECEPTOR DE LH EM CÉLULAS DA GRANULOSA DE FÊMEAS NELORE SUBMETIDAS OU NÃO À SUPERESTIMULAÇÃO OVARIANA.**

COMISSÃO EXAMINADORA

Professor Dr. Ciro Moraes Barros
Presidente e Orientador
Departamento de Farmacologia Veterinária
IB – UNESP - Botucatu

Professor Dr. José Buratini Junior
Membro
Departamento de Fisiologia
IB – UNESP - Botucatu

Dr. Marcelo Fábio Gouveia Nogueira
Membro
Departamento de Ciências Biológicas
UNESP - Assis

Dr. Andrey Borges Teixeira
Membro
Faculdade de Medicina Veterinária
Faculdade Integrada de Ourinhos (FIO) - Ourinhos

Dra. Mayra Elena Ortiz D' Avila Assumpção
Membro
Departamento de Reprodução Animal
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

Data da Defesa: 07/08/2008.

À minha esposa Maria Célia da Silva Fernandes, e aos meus filhos Lucas de Andrade Fernandes, Paula Lima Fernandes e Vitória Lima Fernandes, pela fonte constante de alegria, amor, aprendizagem e prazer;

Aos meus pais José Frederico Fernandes e Lourdes Helena da Cruz Fernandes, pela formação moral, e pelo apoio dado à etapa experimental feita em sua fazenda. Acima de tudo pelo ilimitado amor, apoio, respeito e educação com o qual me criaram;

Ao meu orientador Prof. Dr. Ciro Moraes Barros, pela orientação e apoio incondicional. Não por acaso, escolhi continuar o doutorado sob a sua orientação;

Ao Prof. Dr. José Buratini Júnior, colaborador deste trabalho, pela acolhida em seu laboratório e disposição em propiciar as condições para a realização do experimento;

À Andrey Borges Teixeira, amigo e parceiro nas jornadas de pós-graduação (mestrado e doutorado), pelo apoio prestado durante o doutorado, sempre solícito em ajudar nos RIA;

Ao colega Marcelo Fábio Gouveia Nogueira, que iniciou os trabalhos de expressão de LHR na UNESP – Botucatu, por estar sempre de prontidão para nos ajudar nos momentos de dúvidas.

DEDICO

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

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

Aos professores do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu, pela amizade;

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

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal (FMVZ-UNESP - Botucatu) pela amizade;

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

Aos amigos Mariana Fernandes Machado, Rafael Augusto Satrapa, Ana Cláudia Zanotto Barcelos, Ronaldo Luiz Ereno (colaboradores deste projeto), Marcelo Pegorer, Vinícius Pinheiro, Evandro Sartorelli, Anthony Cesar Souza Castilho, Renato Simões, Paula Ripamonte Figueiredo, Taís Nabhan e aos que aqui não foram mencionados;

À Professora Mayra Elena Ortiz D' Avila Assumpção, pela colaboração na correção deste trabalho e participação da banca examinadora;

À Professora Luzia Aparecida Trinca pela realização da análise estatística;

À Dra. Gilmara Bruschi Santos pelo apoio na interpretação da análise estatística; e

À toda equipe da biblioteca, pela assessoria e correção das referências bibliográficas e pelos serviços prestados.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do GAPDH, M1, M2, M3, M4 e da CYP17.	43
Tabela 2-	Identificação dos animais, grupo experimental, diâmetro folicular, razão E_2/P_4 , e abundância das isoformas do mRNA (M1, M2, M3 e M4) e do gene constitutivo (GAPDH).	47
Tabela 3-	Identificação dos animais, grupo experimental, diâmetro folicular (animais A a E) e médias ($\pm$ EPM) para diâmetro folicular (animais 1, 3 e 4), razão E_2/P_4 (animais A a E, 2 e 5, e médias para os animais 1, 3 e 4), e abundância de mRNA (LHR/GAPDH) das isoformas para os animais do grupo VSE.	48
Tabela 4-	Médias re-transformadas ($\pm$ EPM) da expressão do gene para o LHR em novilhas cíclicas (grupo NC) ou em vacas submetidas à superestimulação ovariana (grupo VSE). EPM = erro padrão da média.	49
Tabela 5-	Médias re-transformadas ($\pm$ EPM) da expressão das isoformas do gene para o LHR (M1, M2, M3 e M4) em novilhas cíclicas (grupo NC) ou em vacas submetidas à superestimulação ovariana (grupo VSE). EPM = erro padrão da média.	49
Tabela 6-	Médias re-transformadas ($\pm$ EPM) dos transcritos do LHR (M1, M2, M3 e M4), analisando conjuntamente os dados dos grupos NC e VSE. EPM = erro padrão da média.	51
Tabela 7-	Diâmetro folicular médio (mm) e médias re-transformadas ($\pm$ EPM) da expressão do gene para o LHR em novilhas cíclicas (grupo NC) abatidas nos dias 3 (d3) ou 5 (d5) após a ovulação. EPM = erro padrão da média.	51

Tabela 8 -	Níveis intrafoliculares médios para estradiol e progesterona, e razão E_2/P_4 , para os grupos de novilhas cíclicas (grupo NC) e de vacas superestimuladas (grupo VSE).	52
------------	---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Protocolo de sincronização da ovulação (PSO) utilizado em vacas da raça Nelore.	35
Figura 2-	Protocolo de tratamento superestimulatório com pFSH utilizado em vacas da raça Nelore, 8 dias após o protocolo de sincronização da ovulação (PSO).	36
Figura 3-	Estrutura e disposição dos éxons no gene codificador do LHR.	43
Figura 4-	Expressão das isoformas (M1, M2, M3 e M4) do gene para o LHR nas células da granulosa de folículos obtidos de novilhas cíclicas.	50
Figura 5-	Expressão das isoformas (M1, M2, M3 e M4) do gene para o LHR nas células da granulosa de folículos obtidos de vacas submetidas à superestimulação ovariana.	50

ABREVIATURAS

µg	- micrograma
µL	- microlitro
µm	- micrômetro
A	- antisense
ACNB	- Associação dos Criadores de Nelore do Brasil
AM	- período da manhã – 07h00min
AMPc	- monofosfato de adenosina cíclico
BE	- benzoato de estradiol
BMP-15	- proteína morfogenética óssea-15
cDNA	- ácido desoxirribonucléico complementar
CIDR-B	- controle interno de liberação de droga (progesterona)
COC	- complexo cumulus-oócito
DEPC	- dietilpirocarbonato
DIB	- dispositivo intravaginal bovino (progesterona)
DNA	- ácido desoxirribonucléico
DNase	- enzima que degrada o ácido desoxirribonucléico
e	- espécie eqüina (p.ex., eCG)
E ₂	- estradiol
EDTA	- ácido etilenodiaminotetracético
EGFs	- fatores de crescimento epidermais
FGFs	- fatores de crescimento fibroblásticos
FSH	- hormônio folículo estimulante
FSHR	- receptor do hormônio folículo estimulante
pFSH	- hormônio folículo estimulante de origem suína
g	- força G
GAPDH	- gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GnRH	- hormônio liberador das gonadotrofinas
h	- espécie humana (p.ex., hCG,); ou horas
hCG	- gonadotrofina coriônica humana
IATF	- inseminação artificial com tempo fixo
IGF	- fator de crescimento semelhante à insulina
IGFBP	- proteína específica de ligação ao fator de crescimento semelhante

	à insulina
IM	- intramuscular
KI	- kit-ligante
LH	- hormônio luteinizante
LHR	- receptor do hormônio luteinizante
LRBP	- proteína específica de ligação ao receptor do LH
M	- molar
M1	- isoforma “full-length” do LHR
M2	- isoforma com deleção do éxon 10
M3	- isoforma com deleção parcial do éxon 11
M4	- isoforma com deleção total do éxon 10 e parcial do éxon 11
mg	- miligrama
MgCl ₂	- cloreto de magnésio
mL	- mililitro
mM	- milimolar
mm	- milímetro
MVK	- mevalonato quinase
NC	- novilhas ciclando (grupo)
ng	- nanograma
°C	- grau Celsius
P ₄	- progesterona
pb	- pares de base
PBS	- tampão de fosfato e salina
PCR	- reação em cadeia da polimerase
pg	- picograma
PGF _{2α}	- prostaglandina tipo F dois alpha
PM	- período da tarde – 19h00min
PO	- puro de origem
PSO	- protocolo de sincronização da ovulação
RIA	- radioimunoensaio
RNA	- ácido ribonucléico
mRNA	- ácido ribonucléico mensageiro
RNase	- enzima que degrada o ácido ribonucléico

RT-PCR	- reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
S	- sense
SCF	- fator de células tronco
TBE	- Tris, Ácido bórico e EDTA
TGF- β	- fatores de crescimento transformantes- β
TE	- transferência de embriões
TSH	- hormônio estimulante da tireóide
U	- unidades
UI	- unidade internacional
UV	- ultravioleta
V	- volts
VSE	- vacas superestimuladas (grupo)

SUMÁRIO

	Página
Resumo.....	14
Abstract.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Desenvolvimento folicular.....	18
2.2 Estrutura, ativação e mutações do LHR.....	19
2.3 Isoformas do LHR (“splicing” alternativo).....	20
2.4 Expressão gênica do LHR no folículo ovariano.....	22
2.5 Expressão do LHR e desenvolvimento folicular.....	23
2.6 Expressão do LHR e aquisição de capacidade ovulatória pelo folículo.....	25
2.7 Modulação das isoformas do LHR.....	26
2.8 Atividade biológica das isoformas do LHR.....	28
2.9 “Down-regulation” do LHR.....	30
2.10 Concentração dos hormônios esteróides e de fatores de crescimento no fluido folicular.....	31
2.11 Superestimulação ovariana.....	32
3 OBJETIVOS.....	34
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 Animais e grupos experimentais.....	35
4.2 Dissecção dos folículos.....	38
4.3 Obtenção do fluido folicular.....	39
4.4 Isolamento das células da granulosa.....	39
4.5 Extração do RNA total.....	40
4.6 Reação de transcrição reversa (RT-PCR)	40
4.7 Eletroforese em gel de agarose.....	43
4.8 Dosagem de E ₂ e P ₄ no fluido folicular.....	44
4.9 Dosagem de P ₄ no plasma.....	44
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
6 RESULTADOS.....	46
7 DISCUSSÃO.....	53

8	RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO.....	59
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
10	TRABALHO CIENTÍFICO.....	72

FERNANDES, P. **Expressão dos transcritos do receptor de LH em células da granulosa de fêmeas Nelore submetidas ou não à superestimulação ovariana.** Botucatu, 2008. 56p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campos de Botucatu.

Resumo

Objetivou-se com o presente trabalho avaliar a expressão das isoformas (M1 a M4) do receptor de LH (LHR) em células da granulosa de folículos $\geq 8,5$ mm de diâmetro obtidos de novilhas cíclicas (grupo NC) ou de vacas superestimuladas (grupo VSE), na raça Nelore. As novilhas cíclicas (n=4) foram submetidas à sincronização da ovulação e em seguida monitoradas por ultra-sonografia transretal, até serem abatidas no terceiro ou quinto dia após a ovulação. As vacas do grupo VSE (n=5) foram submetidas à superestimulação ovariana (protocolo P-36 modificado) e ovariectomizadas 36 horas após a remoção da fonte de progesterona. A expressão das isoformas do LHR (M1 a M4) foram calculadas como valores relativos à expressão do GAPDH. Verificou-se menor expressão do gene do LHR no grupo VSE quando comparado ao grupo NC ($6,5 \pm 0,35$ e $28,96 \pm 0,4$, respectivamente; Bonferroni, $p < 0,02$). Quando os dados dos grupos NC e VSE foram analisados conjuntamente, obteve-se maior expressão das isoformas M1 ($27,22 \pm 0,19$) e M3 ($28,37 \pm 0,22$) quando comparadas com as isoformas M2 ($6,46 \pm 0,38$) e M4 ($5,05 \pm 0,43$, Bonferroni, $p < 0,02$). No grupo NC, a expressão do LHR foi mais intensa nos folículos coletados no quinto dia (12 mm de diâmetro, $38,1 \pm 0,03$) quando comparados aos obtidos no terceiro dia (8,75 mm, $22,6 \pm 0,03$, Bonferroni, $p < 0,01$) após a ovulação. Estes resultados são indicativos de que o tratamento superestimulatório com Folltropin[®] em vacas Nelore diminuiu a expressão do LHR nas células da granulosa, aumentou as concentrações intrafoliculares de progesterona, reduziu a razão E_2/P_4 , e que a expressão das isoformas M1 e M3 foi mais abundante do que as M2 e M4 tanto nas novilhas cíclicas quanto nas vacas superestimuladas.

Palavras chave: folículos, Nelore, LHR, superovulação, expressão gênica, *Bos taurus indicus*.

Expression of LHR isoforms in granulosa cells of Nelore females submitted or not to ovarian superstimulation.

Abstract

The aim of the present work was to evaluate in the Nelore breed the gene expression of LH receptor isoforms (M1 to M4) in granulosa cells of follicles ≥ 8.5 mm diameter from cycling heifers (CH) and superstimulated cows (SC). The cycling heifers (n=4) were submitted to synchronization of ovulation and afterwards evaluated by transrectal ultrasonography until the third and fifth days after ovulation, when the animals were slaughtered to obtain the ovaries and follicles. The SC group (n=5) were submitted to ovarian superstimulation (modified Protocol P-36) and ovariectomized 36 hours after removal of progesterone source. The results of the isoforms expression (M1 to M4) were calculated as GAPDH expression. There was a lower expression of LH receptor gene in SC group as compared to CH group (6.50 ± 0.35 and 28.96 ± 0.40 , respectively, Bonferroni, $p < 0.02$). When data of both groups were analyzed together, there was a higher expression of M1 (27.22 ± 0.19) and M3 (28.37 ± 0.22) isoforms when compared to M2 (6.46 ± 0.38) and M4 (5.05 ± 0.43 , Bonferroni, $p < 0.02$). In CH group, LHR expression was more intense in follicles obtained in the fifth day (12 mm diameter, 38.1 ± 0.03) when compared to those obtained on third day (8.75 mm, 22.6 ± 0.03 , Bonferroni, $p < 0.01$) after ovulation. The results indicated that superstimulatory treatment with FSH in Nelore cows decreased LH receptor expression in granulosa cells, it increased the concentrations progesterone intrafolliculares, it reduced the reason E_2/P_4 , and that M1 and M3 isoforms expression were more abundant than M2 and M4 in both cycling and superstimulated animals.

Key words: follicles, Nelore, LHR, superovulation, gene expression, *Bos taurus indicus*.

1 INTRODUÇÃO

Animais de raças zebuínas (*Bos taurus indicus*) constituem a maior parte do rebanho bovino de corte criado em regiões tropicais, devido a sua melhor adaptabilidade, maior tolerância ao estresse calórico e resistência à parasitas quando comparados aos animais de raças européias (*Bos taurus taurus*, MEIRELLES et al., 1999). No Brasil, entre as raças de corte, a Nelore é a que possui maior contingente (mais de 100 milhões de cabeças; Associação dos Criadores de Nelore do Brasil, 2008), sendo considerada o alicerce da cadeia produtiva da pecuária de corte. Pesquisas na área de fisiologia da reprodução poderão gerar informações importantes para as biotécnicas reprodutivas, promovendo incremento na produtividade e no ganho genético desta raça bovina.

Na dinâmica folicular de espécies monovulatórias, ocorre desvio de diâmetro e seleção de apenas um folículo que continua crescendo (dominante) enquanto os demais (subordinados) sofrem atresia. Estudos têm demonstrado que o desvio folicular ocorre quando o folículo atinge diâmetro de 5,4 a 5,7 mm em novilhas Nelore (SARTORELLI et al., 2005; CASTILHO et al., 2007; ERENO, 2008), 6,1 mm em vacas Nelore (SARTORELLI et al., 2005) ou 8,5 mm em novilhas Holandesas (GINTHER et al., 1996 e 2003). A expressão do LHR (receptor do hormônio luteinizante), em novilhas da raça Holandesa, foi detectada nas células da granulosa de folículos ≥ 8 mm (BAO et al., 1997; BEG et al., 2001), cerca de 8 horas antes do desvio folicular (BEG et al., 2001). Estes achados proporcionaram a Beg et al. (2001) e Ginther et al. (2001), sugerirem que o início da expressão do LHR nas células da granulosa seria a causa para a seleção e consequentemente para a aquisição da dominância folicular. Entretanto, Fortune et al. (2001), utilizando hibridização *in situ*, e Ereno (2008) utilizando RT-PCR semi-quantitativo, não detectaram a expressão do LHR no folículo dominante, imediatamente antes da seleção folicular. Recentemente, Nogueira et al. (2007), e Ereno (2008), verificaram que a expressão do LHR em células da granulosa ocorre entre 7 e 8 mm de diâmetro folicular em fêmeas da raça Nelore. Portanto, estes autores não corroboram com a hipótese de que a expressão do LHR em células da granulosa ocorra antes do desvio folicular e sim depois.

O hormônio luteinizante (LH), ao fazer a ligação com o LHR, influencia várias atividades como a esteroidogênese, o crescimento folicular, a maturação oocitária, a ovulação e a formação do corpo lúteo, essenciais para a função reprodutiva das fêmeas (HYTTEL et al., 1997). Portanto, a expressão do LHR é essencial para a foliculogênese entre as fases de aquisição de dominância folicular e a ovulação (BEG et al., 2001; GINTHER et al., 2001; SARTORI et al., 2001).

A inseminação artificial, a indução de ovulações múltiplas para a produção e transferência de embriões (TE) e a produção de embriões *in vitro* são biotécnicas da reprodução que atualmente têm proporcionado à pecuária de corte Nacional, ganhos expressivos no melhoramento genético do gado zebuino. Entretanto, a variabilidade de resposta das doadoras de embriões aos tratamentos superovulatórios com gonadotrofinas, continua sendo um dos grandes problemas nos protocolos comerciais da TE (BARROS & NOGUEIRA, 2001), apesar das diversas pesquisas envolvendo esta biotécnica (DEL CAMPO et al., 1990; STOCK et al., 1996; NOGUEIRA et al., 2002). Mediante novos conhecimentos sobre o papel biológico do LHR, pode-se aventar utilizações dos transcritos do LHR para maximizar a ação dos fármacos indutores da ovulação e do desenvolvimento final do folículo ovariano. A melhor compreensão sobre a expressão das isoformas do LHR nas células da granulosa durante o desenvolvimento folicular ovariano, tanto sob condições fisiológicas quanto sob tratamentos com hormônios gonado-estimulantes, poderá permitir o progresso da biotecnologia reprodutiva e melhorar a exploração do material genético de fêmeas zebuínas.

Neste contexto, objetiva-se com a presente pesquisa avaliar a hipótese de que a superestimulação ovariana com hormônios gonadotróficos (FSH/LH) reduz a expressão dos receptores de LH.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Desenvolvimento folicular

No início da vida fetal das fêmeas mamíferas, as células germinativas primordiais se originam do saco vitelínico, migram para a crista genital, povoam a gônada indiferenciada, e recebem a denominação de oogônias que se multiplicam por mitose. Em seguida, as oogônias iniciam a divisão meiótica que é interrompida no diplóteno da prófase I. Os oócitos são rodeados por uma camada de células da granulosa, constituindo os folículos primordiais (HIRSHFIELD, 1991; VAN DEN HURK et al., 1997). Assim que a população de folículos primordiais foi estabelecida, alguns deixam o grupo dos quiescentes e de forma gradual e contínua começam a se desenvolver, assumindo, seqüencialmente, os estágios de folículos primários e secundários, até atingirem o período antral do desenvolvimento folicular (VAN DEN HURK et al., 1997).

Alguns estudos têm indicado que o desenvolvimento folicular pré-antral independe de estímulo gonadotrófico agudo e que mecanismos parácrinos de controle desempenham um papel primordial nessa fase (GONG et al., 1996; MONNIAUX et al., 1997ab). Entretanto, receptores de FSH foram detectados em folículos primários de bovinos e de camundongos. Após adição de FSH ao meio de cultivo próprio para folículos pré-antrais foi observado aumento na taxa de crescimento e de sobrevivência folicular, sugerindo que o FSH também atua na regulação do crescimento dos folículos pré-antrais a partir do estágio primário (GUTIERREZ et al., 2000; WEBB et al., 2003; ADRIAENS et al., 2004). Vários peptídeos intraovarianos, como a ativina, inibina, fatores de crescimento epidermais (EGF), fatores de crescimento fibroblásticos (FGF), fator de células tronco (SCF ou kit-ligante: KL), membros da família dos fatores de crescimento transformantes- β (TGF- β), como a proteína morfogenética óssea-15 (BMP-15 ou GDF-9B), e fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) têm sido apontados como reguladores locais do desenvolvimento folicular na fase pré-antral e início da fase antral (VAN DEN HURK et al., 1997; MONNIAUX et al., 1997ab; MIHM et al., 2000; JUENGEL et al., 2004).

O desenvolvimento dos folículos ovarianos na espécie bovina, desde o aparecimento do antro folicular até a ovulação é essencialmente regulado pela ação das gonadotrofinas (FSH e LH, MIHM & BLEACH, 2003), pelos hormônios esteróides ovarianos (estradiol e progesterona) e por fatores ovarianos de ação endócrina e parácrina (FORTUNE, 1994; GONG et al., 1996). A elevação nas concentrações plasmáticas de FSH constitui o estímulo necessário para o recrutamento e emergência da onda folicular (duas ou três por ciclo estral em bovinos; ADAMS et al., 1992; FORTUNE, 1994). Na espécie bovina, de forma predominante, apenas um folículo é selecionado e passa a exercer dominância sobre os demais que compõem a onda folicular. Devido a secreção de estradiol e inibina, os folículos em crescimento causam redução dos níveis circulantes de FSH, que se tornam insuficientes para a manutenção do crescimento dos folículos subordinados (GINTHER et al., 1996). No período próximo ao desvio folicular, a expressão de LHR, aliada à liberação pulsátil de LH e à ação sinérgica de outros fatores (estradiol, IGF₁) garante a sobrevivência e a seleção do folículo que irá se tornar dominante.

2.2 Estrutura, ativação e mutações do LHR

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

Na região extracelular, a sequência de aminoácidos codificada pelo éxon 10 do gene é essencial à ativação do LHR pelo LH (ALVAREZ et al., 1999). Transcritos de mRNA que não contém o éxon 10 são traduzidos em receptores com capacidade de serem ativados pela gonadotrofina coriônica humana (hCG), mas não pelo LH (GROMOLL et al., 2003; MÜLLER et al., 2003),

caracterizando a importância desta região na ativação do LHR pelo LH. Galet & Ascoli (2005), observaram distintas afinidades de ligação entre o hCG e o LH de origem bovina ou humana com os receptores de LH humano e de rato. Neste estudo, as diferenças de ligação observadas foram relacionadas aos resíduos de aminoácidos presentes no domínio extracelular do LHR, que diferem entre as espécies estudadas.

A proteína G heterotrimérica (subunidades α , β , e γ), acoplada à região intracelular do LHR (região carboxil-terminal) é ativada quando ocorre uma alteração conformacional do receptor após a ligação do LH ou da hCG (LEWIN, 2004). A ativação do LHR pode desencadear diferentes respostas celulares via fosfolipase C ou adenilciclase, intermediadas por diferentes proteínas G ($G_{s\alpha}$, $G_{q\alpha}$ e $G_{i\alpha}$) na ativação do LHR. A $G_{i\alpha}$ e/ou $G_{q\alpha}$ participam na via da ativação da fosfolipase C, enquanto que a $G_{s\alpha}$ na ativação da adenilciclase (HERRLICH et al., 1996; SHEMESH, 2001).

O LHR pode apresentar mutações de ativação ou inativação. Nas mutações de ativação, mesmo na ausência de LH, ocorre a ativação crônica do LHR. Esta mutação é causada por alterações localizadas na terceira alça intracelular ou no sexto segmento transmembrânico do LHR (LAUE et al., 1995; ZHANG et al., 1998). A mutação de ativação do LHR é a causa da síndrome denominada “puberdade precoce familiar limitada ao sexo masculino”, que ocorre em seres humanos. Na mutação de inativação, mesmo quando o LH está disponível, não há a ativação do LHR (HUHTANIEMI, 2000). A provável causa do hipogonadismo masculino é a ausência do éxon 10 no gene que expressa o LHR. O tratamento com a hCG foi eficaz em restaurar os caracteres sexuais secundários do paciente com a síndrome, demonstrando o papel do éxon 10 na discriminação entre as ações do LH e hCG (GROMOLL et al., 2000).

2.3 Isoformas de LHR (“splicing” alternativo)

A montagem do transcrito primário de um gene interrompido (pré-mRNA), com a remoção do material genético que não codifica aminoácidos presentes na proteína madura (introns) e o alinhamento das regiões codificadoras (éxons) é necessária para a formação do mRNA. A transcrição

gênica poderá gerar mRNA contendo todos os éxons do gene (forma completa ou “full-length”) ou algumas formas de mRNA com deleções totais e/ou parciais de um ou mais éxons. O “splicing” alternativo surge quando se produz, a partir da transcrição de um mesmo gene, mais de uma sequência de mRNA (transcritos alternativos ou isoformas; LEWIN, 2004).

Segundo Lareau et al. (2004), não é completamente conhecido o porquê alguns genes são mais intensamente transcritos sob o evento do “splicing” alternativo do que outros genes. Foi aventado que os mamíferos poderiam usar este processo para amplificar a síntese de proteínas, mantendo o tamanho do genoma em níveis adequados, pois um único gene poderia codificar mais de uma proteína funcional.

O “splicing” alternativo pode participar de um mecanismo de autocontrole da expressão gênica mediante a formação de microRNA. Estes microRNAs são partes do RNA intrônico não-codificante ou do RNA exônico processado e pode desempenhar papel regulador direto, interagindo com outras moléculas de RNAs, DNA ou proteínas, e assim sobrepor instruções genéticas adicionais em uma célula, modificando a produção de proteína em diferentes níveis (MATTICK, 2004; CHU & RANA, 2007). O microRNA reconhece a região 3'UTR do mRNA alvo, e suprime a tradução da proteína após promover uma rápida degradação do mRNA, além de seqüestrar o mRNA para compartimentos de armazenamento (CHU & RANA, 2007). Muitos desses microRNAs controlam o ritmo de processos como a manutenção de células tronco, a proliferação de células e a apoptose, influenciando de várias maneiras a programação genética de uma célula (MATTICK, 2004).

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

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

al., 2003; KAWATE, 2004). Recentemente, a presença de quatro transcritos do LHR foi confirmada nas células da granulosa de folículos obtidos de novilhas Nelore (ERENO, 2008) ou nas células foliculares da granulosa e da teca de vacas aneloradas (NOGUEIRA et al., 2007). Os estudos revelaram a ocorrência de deleção facultativa do éxon 3 (NOGUEIRA et al., 2007), além das deleções completas do éxon 10 e/ou parcial do éxon 11 do LHR (NOGUEIRA et al., 2007; ERENO, 2008). Na literatura não há informações sobre a implicação funcional da deleção do éxon 3 em bovinos.

2.4 Expressão gênica do LHR no folículo ovariano

As células do folículo ovariano possuem mRNA que traduz o LHR em fases distintas do desenvolvimento folicular, isto é, desde antes do aparecimento do antro até a fase pré-ovulatória nas células da teca (XU et al., 1995; BAO & GARVERICK, 1998; BERISHA et al., 2000; BRAW-TAL & ROTH, 2005), ou apenas a partir da seleção folicular até a fase pré-ovulatória nas células da granulosa (XU et al., 1995; BAO & GARVERICK, 1998; BEG et al., 2001; GINTHER et al., 2001 e 2003). Corroborando com os resultados de Bao & Garverick (1998), Berisha et al., (2000) e Braw-Tal & Roth (2005), Nogueira et al. (2007) demonstraram que não houve diferença significativa na expressão do LHR nas células da teca, quando diferentes classes de diâmetro folicular foram comparadas.

A expressão de LHR em células da granulosa, estudadas por hibridação *in situ*, ocorreu em folículos maiores que 8 mm de diâmetro e a quantidade do mRNA para o LHR aumentou com o tamanho do folículo (XU et al., 1995; BAO et al., 1997), atingindo valores máximos quando o folículo dominante está próximo do seu maior diâmetro (BAO & GARVERICK, 1998). Beg et al. (2001), detectaram expressão de LHR nas células da granulosa de folículo saudável ≥ 8 mm de diâmetro, 36 horas após o início da onda folicular. A expressão do LHR, avaliada por PCR quantitativo, precedeu a divergência do diâmetro folicular em 0,5 mm em novilhas de raça européia (± 8 mm de diâmetro). Por outro lado, Fortune et al. (2001), não detectaram expressão de LHR por hibridização *in situ*, em células granulosas do folículo dominante nos dias 1,5 e 2,5 da primeira onda folicular.

Recentemente, trabalhos utilizando RT-PCR semi-quantitativo, relataram que a expressão do LHR em células da granulosa de folículos de vacas aneloradas (NOGUEIRA et al., 2007) ou de novilhas Nelore (ERENO, 2008), somente ocorreu em folículos maiores ou iguais a 7 mm de diâmetro, nos dias 2,5 e 3 após a ovulação (ERENO, 2008). Nogueira et al. (2007), verificaram que apenas uma amostra (16,7%, 1/6) dos folículos com diâmetro de 7 mm expressou LHR. Porém, em folículos com diâmetro igual ou maior a 8 mm houve expressão de LHR em mais de 87,5% das amostras avaliadas. Ereno (2008), verificou 50 (2/4) e 63,6% (7/11) de expressão de LHR em células da granulosa de folículos dominantes coletados nos dias 2,5 e 3 após a ovulação, respectivamente.

No trabalho de Bao et al. (1997), a expressão de receptores para gonadotrofinas (FSHR e LHR) foi maior em folículos esteroidogênicos quando comparados aos folículos atrésicos. De forma similar, Evans et al. (2004), utilizando PCR quantitativo (tempo real), verificaram maior expressão gênica do LHR em células da granulosa de folículos dominantes quando comparados aos subordinados.

2.5 Expressão do LHR e desenvolvimento folicular

Na onda de crescimento folicular em espécie monovulatória, ocorre desvio de diâmetro e seleção de um folículo que continua crescendo (dominante) enquanto os demais (subordinados) sofrem atresia. No bovino, o sistema IGF, estradiol e receptores de LH estão envolvidos nos eventos intra-foliculares que iniciam o desvio (GINTHER et al., 2001). Beg et al. (2001) e Ginther et al. (2001) demonstraram que a expressão do LHR em células da granulosa de folículos bovinos (novilhas Holandesas) ocorreu 8 horas (em média) antes do desvio morfológico folicular, o que levou estes autores a sugerirem que a expressão precoce do LHR seria a causa para a seleção e consequentemente para a aquisição da dominância folicular.

Entretanto, Austin et al. (2001) e Fortune et al. (2001), aventaram que a expressão do LHR nas células da granulosa seria apenas um evento decorrente da dominância já instalada. Fortune et al. (2001), utilizando hibridização *in situ*, e posteriormente Ereno (2008), utilizando RT-PCR semi-quantitativo, não detectaram a expressão do LHR no futuro folículo dominante,

imediatamente antes da seleção morfológica folicular. A primeira diferença observada por Fortune et al. (2001), entre o futuro folículo dominante e os subordinados foi a maior síntese da protease das IGFBP-4 e 5 (PAPP-A, proteína plasmática associada à prenhez, proteína ligadora de IGF) induzida pelo FSH, com subsequente diminuição das concentrações das IGFBP-4 e 5 por degradação proteolítica que ocorre desde o recrutamento até o tamanho pré-ovulatório (MAZERBOURG et al., 2001; RIVERA et al., 2001; RIVERA & FORTUNE, 2001; FORTUNE et al., 2004). A baixa concentração de IGFBP-4 e 5 permite que maior quantidade de IGF-1 esteja disponível para promover o crescimento folicular, amplificando os efeitos do FSH e a síntese de estradiol (FORTUNE et al., 2001). De forma semelhante, Austin et al. (2001), propuseram que as primeiras mudanças intra-foliculares que distinguem o folículo destinado a tornar-se dominante, dos outros folículos em crescimento, seria a capacidade aumentada em produzir estradiol e a manutenção de baixos níveis de IGFBPs. Portanto, neste modelo de seleção bioquímica proposto por Fortune et al. (2004), o sistema IGF desempenha papel crítico na seleção e na aquisição de dominância pelo folículo.

A concentração de IGF-1 livre foi maior no fluido folicular do maior folículo comparado ao segundo maior da mesma onda, antes mesmo que as diferenças observadas na concentração de estradiol ou no diâmetro (BEG et al., 2002). Este achado sugere a existência de um sistema modulador da disponibilidade de IGF intrafolicular, diferentemente regulado em folículos dominante e subordinado.

Apesar da expressão do LHR nas células da granulosa iniciar em folículos de bovinos com 8 a 8,4 mm de diâmetro (GINTHER et al., 2001), a ausência do LH pulsátil não impediu o folículo de crescer até o diâmetro de 9 mm (GINTHER et al., 2003). Assim sendo, estes autores aventaram a possibilidade de que a expressão do LHR neste momento não seja fundamental para o crescimento folicular.

O diâmetro do desvio morfológico folicular foi determinado em novilhas da raça Nelore, como sendo ao redor de 5,7 mm por Sartorelli et al., (2005). Posteriormente Ereno (2008), verificou que o desvio folicular em novilhas da raça Nelore ocorreu quando os diâmetros foliculares apresentavam 5,3 e 4,9 mm para o folículo dominante e subordinado, respectivamente. Estes dados

são semelhantes aos descritos por Castilho et al. (2007), e por Gimenes et al. (2008), também em fêmeas zebuínas. Os dados de Sartorelli et al. (2005), Castilho et al. (2007), Gimenes et al. (2008) e Ereno (2008), combinados com os dados publicados por Nogueira et al. (2007), demonstram que a expressão do LHR em fêmeas Nelore ocorreu somente após o desvio folicular, o que difere dos estudos de Beg et al. (2001) e Ginther et al., (2003). Portanto, pode-se inferir que a expressão das isoformas do LHR em células da granulosa de folículos $\geq$ a 7 mm de diâmetro é posterior à instalação do desvio folicular em fêmeas zebuínas (*Bos taurus indicus*).

2.6 Expressão do LHR e aquisição de capacidade ovulatória pelo folículo

Após a administração de 40 mg de LH, nenhuma vaca da raça Holandesa com folículo de 7 (0/9) ou 8,5 mm (0/9) ovulou, comparadas com 80% (8/10) de ovulações em vacas com folículos de 10 mm. Portanto, a capacidade ovulatória em *Bos taurus taurus* foi verificada em folículos a partir de 10 mm de diâmetro (um dia após o desvio folicular, SARTORI et al., 2001). Segundo estes pesquisadores, a aquisição de capacidade ovulatória requer uma maior expressão de LHR em células da granulosa do folículo dominante, e esta mudança parece ser importante para o crescimento deste folículo após a seleção.

Gimenes et al. (2008), realizaram um experimento com novilhas Nelore, Gir e cruzadas (Nelore x Gir) a fim de verificar o diâmetro nos quais os folículos adquirem capacidade ovulatória. As fêmeas foram tratadas com 25 mg de LH quando o folículo dominante atingiu diâmetro entre 7,0 e 8,4 mm; 8,5 e 10,0 mm e acima de 10,0 mm, e apresentaram taxas ovulatórias de 33, 80 e 90%, respectivamente. Em vacas da raça Nelore, a administração de LH induziu ovulação em 90% dos animais com folículos entre 9 e 10 mm e apenas 20% nas vacas com folículos entre 7,5 e 8 mm de diâmetro (SIMÕES et al., 2008). Esses dados são sugestivos de que a capacidade ovulatória em *Bos taurus indicus* é adquirida com diâmetros inferiores aos observados em *Bos taurus taurus*. Embora um aumento na expressão do LHR das células da granulosa, seja necessário para a aquisição de dominância folicular, somente esse aumento parece não ser suficiente para a instalação plena da capacidade ovulatória. Tal mecanismo, ainda não elucidado, parece ser decorrente de um

aumento, ainda maior, na quantidade de LHR, associada às alterações nas vias de sinalização intracelular que o LHR possui na fase pós-divergência e à expressão de angiotensina e de cox-2.

2.7 Modulação das isoformas do LHR

Há muitas evidências de um controle diferenciado da expressão das isoformas do LHR em células-alvo presentes nos ovários de mamíferos (MENON et al., 2004).

Em ovinos, a modulação da expressão do LHR está diretamente relacionada à condição fisiológica ovariana no decorrer do ano (ABDENNEBI et al., 2002). Estes autores relataram predominância na expressão do transcrito completo do LHR nas células da teca de folículos antrais durante a estação ovulatória. Por outro lado, durante o anestro estacional, o transcrito do LHR mais expresso em folículos pré-ovulatórios foi aquele com deleção total do éxon 10 e parcial do éxon 11. Assim, as alterações do LHR nas células da teca não impediram a aquisição e manutenção da dominância folicular. Porém, impediu a ovulação, conduzindo as ovelhas ao anestro. Portanto, a modulação da expressão do LHR nas células da teca pode estar parcialmente associada com a regulação do anestro estacional em ovinos.

Ao contrário das diferenças observadas nas estações do ano, durante o ciclo estral ovino não foi observada a modulação dos transcritos do LHR (BACICH et al., 1999). Nesse estudo, os autores detectaram uma predominância do transcrito de LHR com deleção parcial do éxon 11 tanto nos folículos quanto nos corpos lúteos, e também demonstraram a tradução *in vivo* desse transcrito, mediante a detecção da proteína correspondente ao mRNA. Desta forma, Bacich et al. (1999), sugeriram que a abundância deste transcrito alternativo do LHR pode representar parte do mecanismo pelo qual o LH regula a função ovariana.

De forma similar aos resultados observados na espécie ovina, Manikkam et al. (2001) verificaram que não houve diferença na expressão do LHR nas células da teca e da granulosa de bovinos entre a primeira e a segunda onda de crescimento folicular.

A expressão do LHR em células da granulosa bovina foi maior nos folículos com concentração de estradiol no fluido folicular acima de 20 ng/mL,

comparados ao folículos com menores concentrações de estradiol (BERISHA et al., 2000).

A modulação também pode ocorrer na mobilidade do complexo hormônio-receptor formado na membrana citoplasmática. Aparentemente, o tipo de ligante (LH, hCG ou hCG deglicosilado) ou de receptor (funcional ou dessensibilizado), induzem diferenças estruturais entre os complexos hormônio/receptor formados (ROESS et al., 2000a). Horvat et al. (1999), acoplaram uma proteína fluorescente (GFP) ao LHR do rato formando um complexo intrínseco fluorescente, e demonstraram que o LHR não ocupado ficou distribuído na membrana plasmática de maneira dispersa e com difusão lateral, enquanto que os LHR ligados ao LH ou à hCG formaram agrupamentos com restrita difusão lateral. A dessensibilização ao agonista, observada com o LHR em células da granulosa em cultivo e nas células foliculares após o pico pré-ovulatório de LH, parece ser mediada por auto-associações entre dois ou mais LHR, a proteína β -arrestina e regiões da membrana citoplasmática, denominadas “raft” (ROESS et al., 2000b; HUNZICKER-DUNN et al., 2003; ROESS & SMITH, 2003). Nesta série de estudos, foi demonstrado que o padrão dos agrupamentos de LHR na membrana citoplasmática (tamanho e mobilidade lateral) difere quanto ao ligante (LH ou hCG) e ao estado funcional (dessensibilizado ou funcional).

Evans et al. (2004), verificaram que a expressão dos genes da aromatase e para o LHR foram positivamente correlacionadas com a dominância folicular quando comparados aos seus subordinados. O fato dos autores não detectarem diferenças entre os folículos dominante e subordinado na expressão do FSHR nas células da granulosa, e do LHR nas células da teca, reforça a hipótese do crescimento do folículo dominante mediante a ação do LH basal (GINTHER et al., 2001).

Complexos cumulus-oócitos (COCs) aspirados de vacas Holandesas superestimuladas foram submetidos aos procedimentos de produção *in vitro* de embriões para avaliar se a presença de LHR nas células da granulosa, identificada por RT-PCR, teria correlação com o potencial de desenvolvimento do oócito até a fase embrionária de blastocisto. Apesar da expressão do LHR não servir de marcador para prever a competência de oócitos em atingir a fase de blastocisto houve maior proporção de oócitos que atingiram a fase de

blastocisto nos folículos que expressaram LHR nas células da granulosa (ROBERT et al., 2003). De forma similar, Calder et al. (2003 e 2005) verificaram que houve uma relação positiva entre a qualidade do COC, a expressão do LHR nas células do *cumulus oophorus*, e a competência do oócito, sugerindo que os transcritos do LHR podem ser em parte, marcadores da maturação oocitária *in vitro*.

A comunicação bidirecional entre oócito e células da granulosa (cumulus ou mural) que ocorre durante a foliculogênese é essencial tanto para a diferenciação folicular (ADASHI, 1994) quanto para a aquisição de competência oocitária, ou seja, para que o oócito complete a maturação, seja fertilizado com sucesso e desenvolva até o estágio de blastocisto (WEBB et al., 2002; SIRARD et al., 2006). Portanto, a qualidade do embrião depende da maturação final do folículo que conduz à um oócito com a habilidade para gerar uma gravidez próspera. Hamel et al. (2008), identificaram potenciais marcadores originários de células da granulosa mural (FDX1, CYP19A1, cdc42, SERPINE2 e 3bHSD1) que estão associados à embriões de qualidade e que resultaram em gestação em mulheres. Segundo estes autores, estes marcadores podem ser utilizados na seleção de embriões com o objetivo de melhorar a taxa de concepção em mulheres submetidas à fertilização *in vitro*. O FDX1, CYP19A1 e o 3bHSD1 estão envolvidos na esteroidogênese. O FDX1 e o 3bHSD1 participam da síntese de progesterona, enquanto que o CYP19A1 metaboliza andrógeno em 17 β -estradiol nas células da granulosa. Nesta condição, a expressão gênica para FSHR e LHR durante a foliculogênese antral aliada aos estímulos dos respectivos hormônios (FSH e LH), são importantes na expressão destes genes utilizados como marcadores da competência do oócito, conforme propõe Hamel et al. (2008).

2.8 Atividade biológica das isoformas do LHR

Kawate et al. (2002) demonstraram que houve transporte e posicionamento na superfície celular da isoforma do LHR traduzida por mRNA com deleção do éxon 10. A deleção do éxon 10 resultou num LHR com afinidade diminuída ao LH em relação a hCG (GROMOLL et al., 2000; MÜLLER et al., 2003).

O transcrito alternativo com deleção do éxon 11 traduziu um receptor truncado pela introdução de um códon de parada precoce (ROBERT et al., 2003; KAWATE, 2004). Esse LHR truncado não foi transportado até a superfície celular, ficando aprisionado no citoplasma, apesar de conservar sua capacidade de ligação. Nesta condição, o LH não ativa a proteína G, portanto, é um transcrito afuncional quanto aos ligantes LH e hCG (KAWATE et al., 2002; KAWATE, 2004). Entretanto, hipóteses de cooperação de dímeros, trímeros ou oligômeros de receptores, na obtenção de funcionalidade de receptores acoplados à proteína G (mediando o transporte e posicionamento da isoforma completa ou o controle da biodisponibilidade do ligante), poderiam ser levantadas no sentido de incluir uma função para as isoformas truncadas (ROESS et al., 2000a; PIERCE et al., 2002; ROBERT et al., 2003; NAKAMURA et al., 2004).

A variação biológica, na expressão do LHR, inclui até uma linhagem de primatas (*Platyrrhini*) em que o éxon 10 é naturalmente perdido durante a transcrição. Não havendo o transcrito completo, e sendo a espécie dessa subclasse sexualmente normal, a evolução desses animais produziu um sistema único em mamíferos, em que um hormônio estruturalmente semelhante à hCG é produzido na hipófise em detrimento do LH. Esta gonadotrofina é responsável pela ativação do LHR dessa subclasse de animais (LHR tipo II, GROMOLL et al., 2003).

Nogueira et al. (2005), utilizaram dois ligantes (LH e hCG) de alta afinidade e especificidade com intuito de promover a ativação das isoformas de LHR presentes na superfície celular (forma completa e isoforma com deleção do éxon 10). Quando doadoras superestimuladas foram induzidas a ovular com LH (controle) ou LH e hCG (tratado), não houve diferença significativa na produção total de estruturas ou de embriões viáveis, assim como nas taxas de viabilidade embrionária e de concepção após inovulação. Portanto, os dados deste experimento não permitiram aos autores inferir qualquer função para a isoforma com deleção do éxon 10 em relação à forma completa do LHR.

2.9 “Down-regulation” do LHR

A “down-regulation” da isoforma completa do mRNA do LHR pode ser mediada pelos próprios transcritos alternativos do LHR que promovem diminuição da expressão da forma completa (ROESS et al., 2000a; ABDENNEBI et al., 2002; PIERCE et al., 2002; LICHT et al., 2003; NAKAMURA et al., 2004).

Menon et al. (2004) verificaram que uma proteína ligadora do mRNA que traduz o LHR (LRBP) foi sintetizada no citoplasma de células ovarianas de rato em resposta ao pico pré-ovulatório de LH ou à administração de doses terapêuticas de hCG. A ligação da LRBP com a região codificante do mRNA forma um complexo ribonucleoprotéico que inibe a tradução do LHR (NAIR & MENON, 2005).

Após o pico pré-ovulatório de LH ou o uso de doses terapêuticas da hCG há aumento intracelular de AMPc que ativa a esteroidogênese e causa depleção de colesterol intra-celular. Isto é seguido por uma transcrição aumentada de genes associados à síntese e transporte de colesterol do plasma para o interior da célula (MENON et al., 2006) até que o colesterol intracelular esteja em excesso, e haja regulação da esteroidogênese. A mevalonato quinase (MVK) é a enzima previamente descrita como LRBP por Menon et al. (2004) e por Nair & Menon (2005), e participa da biosíntese do colesterol. Esta enzima se liga ao mRNA que iria traduzir o LHR e acelera sua degradação promovendo a “down-regulation” do receptor em resposta ao pico de LH ou ao tratamento com hCG (MENON et al., 2006, WANG et al., 2007). Segundo este modelo, esta “down-regulation” é realizada muito mais pela degradação rápida do mRNA do LHR do que pela inibição da tradução do mRNA em LHR. Wang et al. (2007) verificaram que houve uma participação direta da MVK na regulação da expressão do LHR e com isto os autores sugeriram uma haver uma relação entre o metabolismo do colesterol e a regulação da expressão do LHR no ovário.

2.10 Concentração dos hormônios esteróides e de fatores de crescimento no fluido folicular

A viabilidade e o grau de capacitação atingido por um folículo são, em grande parte, refletidos pela composição bioquímica do fluido presente em sua cavidade antral. Os produtos resultantes do metabolismo das células do “*cumulus oophorus*”, da granulosa mural, e mesmo da teca são difundidos pelo fluido folicular, fornecendo um panorama da atividade esteroidogênica e da biodisponibilidade de fatores de crescimento (como o fator semelhante a insulina do tipo I, IGF-I; e a proteína ligadora do IGF-I do tipo 4, e 5). Estudos em folículos bovinos demonstraram que existe uma alta correlação entre as concentrações de IGF-I livre e de estradiol presentes no fluido folicular, e a capacidade desses folículos atingirem a dominância e a capacitação final pré-ovulação (MIHM et al., 2000; AUSTIN et al., 2001; BEG et al., 2001; RIVERA et al., 2001; RIVERA & FORTUNE, 2001; GINTHER et al., 2001).

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

Hamptom et al. (2004) verificaram níveis intra-foliculares de estradiol e de progesterona iguais a 402,6 e 54 ng/mL, respectivamente, em folículos ≥ 10 mm de diâmetro obtidos de vacas holandesas, no quinto dia após o estro sincronizado (n=5, grupo controle). O segundo grupo de vacas (n=9) recebeu GnRH durante 28 dias e em seguida tratadas com FSH por 96 horas (n=5) ou com FSH e LH (n=4) nas últimas 48 horas do tratamento com FSH. Após o tratamento com FSH e/ou LH, as vacas foram ovariectomizadas para a

obtenção de folículos > 10 mm de diâmetro. As vacas tratadas com FSH apresentaram 260 e 41 ng/mL de estradiol e de progesterona no fluido folicular, respectivamente. No fluido folicular de vacas tratadas com FSH e LH houve aumento significativo nos níveis de estradiol (790,7 ng/mL) e de progesterona (64,8 ng/mL). Portanto o tratamento com FSH suprimiu a secreção de estradiol em 36% em relação ao grupo controle, enquanto que o FSH associado ao LH promoveu incremento na atividade esteroidogênica das células da granulosa. Estes autores verificaram que a expressão do LHR pelas células da teca e da granulosa, avaliado por hibridização *in situ*, não foi afetada pelos tratamentos com FSH e/ou LH.

2.11 Superestimulação ovariana

Os hormônios utilizados para induzir ovulações são a gonadotrofina coriônica eqüina - eCG administrada isoladamente (BOLAND et al., 1978) ou associada a soro anti-eCG (DIELEMAN et al., 1987, 1993; GONZALEZ et al., 1994) e o hormônio folículo estimulante (FSH) proveniente de extrato de pituitárias de suínos, ovinos e eqüinos (DONALDSON, 1989) ou o FSH recombinante bovino (BELLOWS et al., 1991; WILSON et al., 1993).

A utilização do FSH como agente indutor de superovulação tem sido extensivamente estudada. Foi testado o uso de diferentes concentrações (GONZALEZ et al., 1990; SAUNDERS et al., 1990), vias de administração (HOCKLEY et al., 1992; TRIBULO et al., 1993), eficiência de produtos comerciais das mais variadas marcas e procedências (DEL CAMPO et al., 1990; TRIBULO et al., 1993; DONALDSON, 1995) e variações na relação FSH:LH entre preparados comerciais (DONALDSON, 1990). Os resultados inconstantes têm sido associados com ovulações prematuras durante o tratamento com FSH, com a conseqüente formação precoce de corpo lúteo que secreta níveis sub-luteais de progesterona no período esperado do estro e, por fim, com a inibição do pico pré-ovulatório de LH e de ovulações (STOCK et al., 1996).

Baseando-se em experimentos realizados por pesquisadores holandeses (VOS et al., 1995, VAN DE LEEMPUT et al., 2001), Barros e Nogueira (2001), testaram um protocolo de superovulação, que permite a realização da IATF (protocolo P36). Neste protocolo, a fonte de progesterona

(CIDR-B[®] ou DIB[®]) é mantida por até 36 horas após a aplicação da PGF_{2α} e a ovulação induzida com LH endógeno, administrado 12 horas mais tarde. A administração de LH sincroniza o momento da ovulação, que ocorre entre 24 e 36 horas após a injeção de LH (NOGUEIRA & BARROS, 2003; NOGUEIRA et al., 2006). Conseqüentemente, a IATF pode ser realizada 12 e 24 horas após a aplicação do LH, dispensando a detecção do estro em doadoras de embriões.

Soumano et al. (1998), avaliaram a expressão de FSHR e LHR (RT-PCR semi-quantitativo) em novilhas da raça Holandesa ($\pm$ 18 meses de idade), após uso de protocolo de superestimulação com eCG (n=10, Folligon[®], 2.500 UI no d9 do ciclo estral + PGF no d12) ou FSH (n=10, FolltropinV[®], 225 mg de FSH entre d9 e d12 + PGF no d12). Os autores verificaram que a utilização da eCG na superestimulação ovariana de novilhas, resultou em menores níveis foliculares de mRNA do LHR e do FSHR se comparado à utilização do FSH, porém não afetou os níveis de mRNA do LHR luteal. Os autores aventaram a hipótese de que o eCG possa ter provocado uma “down-regulation” na expressão do FSHR e do LHR nas células foliculares, devido ao fato da preparação comercial do eCG ter maior atividade de LH quando comparado ao FolltropinV[®].

3 OBJETIVOS

A presente pesquisa foi realizada com objetivo de:

- a) avaliar a expressão das isoformas do LHR (M1, M2, M3 e M4) analisando-se os grupos experimentais em conjunto;
- b) avaliar a expressão das isoformas do receptor de LH (LHR) em células da granulosa de folículos $\geq 8,5$ mm obtidos de novilhas cíclicas (grupo NC) ou de vacas superestimuladas (grupo VSE); e
- c) avaliar a correlação entre o grau de desenvolvimento folicular e expressão do LHR, no grupo de novilhas cíclicas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e grupos experimentais

O experimento foi, primeiramente, realizado no município de Paraguaçu Paulista (São Paulo). Vacas da raça Nelore (4 a 5 anos) foram avaliadas quanto à ocorrência de atividade ovariana por meio de ultra-sonografia transretal (Aloka SSD 900, transdutor de 7,5 MHz). As vacas ciclando (n = 20) foram aleatoriamente distribuídas em dois grupos experimentais (grupo controle, n=12 e grupo de vacas superestimuladas - VSE, n=8), e mantidas em regime de pasto (*Panicum maximum* cultivar Tanzânia) com suplementação de sal mineralizado *ad libitum* e acesso irrestrito a água.

As vacas (n=20) foram previamente submetidas a um protocolo de sincronização da ovulação (Figura 1) oito dias antes dos tratamentos previstos para o grupo controle e para o grupo VSE, para que, todos os animais apresentassem corpo lúteo em um dos ovários no dia zero do protocolo de cada grupo experimental. No dia zero (d0) do protocolo de sincronização da ovulação as vacas receberam um dispositivo intravaginal contendo progesterona (1,0 g, DIB[®], Syntex, Argentina) e 2,5 mg de benzoato de estradiol (via IM, BE, RIC-BE[®], Tecnopec, São Paulo, Brasil). No d8 foi administrado um análogo da PGF_{2α} (150 mg de d-cloprostenol, Prolise[®], Tecnopec, São Paulo, Brasil, via IM, 07h00min), e o DIB[®] removido 12 horas após a aplicação da PGF_{2α}. No dia 9 foi administrado 1,0 mg de benzoato de estradiol (via IM, BE, RIC-BE[®], Tecnopec, São Paulo, Brasil).

BE (2,5 mg)								PGF _{2α} (AM)	BE (1 mg)
d0	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9
AM↓	Progesterona (DIB)							PM↑	AM

Figura 1. Protocolo de sincronização da ovulação (PSO) utilizado em vacas da raça Nelore. BE - benzoato de estradiol, PGF_{2α} - prostaglandina F 2 alpha, DIB – Dispositivo Intravaginal Bovino, AM - 07h00min, PM – 19h00min.

As vacas do grupo controle (n=12) foram submetidas a um protocolo de tratamento hormonal similar ao da figura 1, porém, não receberam a segunda dose de BE e a ovariectomia bilateral realizada no dia 10, 36 horas após a remoção da fonte de progesterona (DIB®).

As vacas do grupo VSE (n=8) foram submetidas ao protocolo superestimulatório sumarizado na Figura 2. Oito dias após o término do PSO, no dia zero (d0), as vacas receberam um dispositivo intravaginal contendo progesterona (1,0 g, DIB®, Syntex, Argentina) e 2,5 mg de benzoato de estradiol (via IM, BE, RIC-BE®, Tecnopec, São Paulo, Brasil). No d5 foi iniciada a administração de pFSH (dose total de 130 mg, Folltropin®, Leivas Leite, Brasil) em doses decrescentes: 40, 30, 20 e 10% da dose total ao dia, divididos em duas vezes ao dia, durante 4 dias seguidos. No d7 foi administrado um análogo da PGF₂ α (150 mg de d-cloprostenol, Prolise®, Tecnopec, São Paulo, Brasil, via IM, 07h00min), e o DIB® removido 36 horas após a aplicação da PGF₂ α . As vacas foram submetidas à ovariectomia bilateral no d10, 36 horas após a remoção do DIB®, para dissecação dos folículos ≥ 10 mm de diâmetro e obtenção de amostras de células da granulosa.

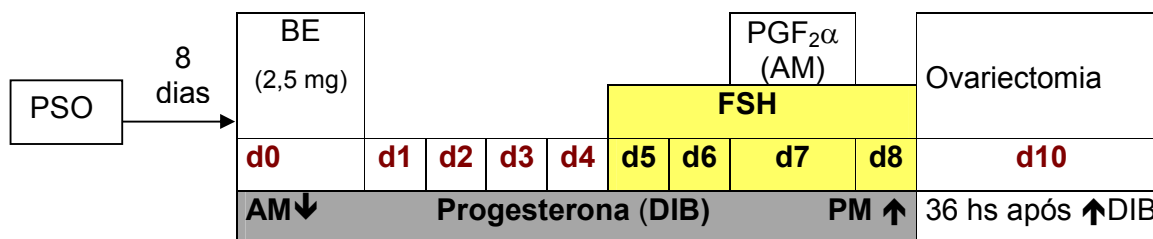


Figura 2. Protocolo de tratamento superestimulatório com pFSH utilizado em vacas da raça Nelore, 8 dias após o protocolo de sincronização da ovulação (PSO). BE - benzoato de estradiol, FSH – Hormônio Folículo Estimulante, PGF₂ α - prostaglandina F 2 alpha, DIB – Dispositivo Intravaginal Bovino, AM - 07h00min, PM – 19h00min.

As colheitas de sangue, em ambos os grupos experimentais foram realizadas por venopunção da jugular (tubos Vacutainer® com heparina) no d0 do protocolo de sincronização da ovulação ou de superestimulação ovariana. Após a colheita, as amostras (10 mL) foram imediatamente centrifugadas a 900g por 20 minutos e o plasma armazenado a -20°C, até o momento da análise de progesterona por meio da técnica de radioimunoensaio.

A vaca número 8 do grupo VSE não respondeu à superestimulação ovariana e foi excluída do experimento.

As ovariectomias das 19 vacas foram realizadas de acordo com as seguintes etapas: sedação do animal com acepromazina (0,05 mg/kg, via IM, Acepran®, Univet, Brasil); tricotomia da região da fossa paralombar esquerda; bloqueio anestésico infiltrativo (cloridrato de lidocaína a 2%, Anestésico Pearson®, Eurofarma, Brasil) em camadas superficial e profunda descrevendo um “L invertido” envolvendo o local de incisão; incisão da pele, musculatura abdominal e peritôneo; localização do ovário na cavidade pélvica, ligadura da artéria ovárica; excisão do ovário; sutura: peritôneo, músculos abdominais, fáscia e pele; curativo local e antibióticoterapia (20.000 UI de penicilina benzatina/kg de peso em dose única, via IM, Multibiótico Reforçado®, Vitalfarma, Brasil).

Após a ovariectomia e dissecação dos folículos, as amostras de células da granulosa obtidas deste experimento (grupos: controle - n=12, e VSE - n=7), foram homogeneizadas em Trizol®, congeladas e encaminhadas ao laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu-SP, para avaliar a expressão do LHR. Na etapa de investigação da expressão da 17 α hidroxilase - enzima característica das células da teca, verificou-se que 75% (9/12) das amostras de células da granulosa dos folículos oriundos das vacas do grupo controle, apresentaram contaminação por células da teca e 8,3% (1/12) não expressaram o gene utilizado como controle no RT-PCR (GAPDH), restando apenas 16,67% (2/12) dos folículos dominantes obtidos do grupo controle.

Devido a este fato, realizou-se outro experimento no município de Ribeirão do Sul (São Paulo), e novilhas Nelore foram avaliadas quanto à ocorrência de atividade ovariana por meio de ultra-sonografia transretal (Aloka

SSD 900, transdutor de 7,5 MHz). Nesta segunda etapa, foram utilizadas novilhas cíclicas (grupo NC) da raça Nelore puras de origem (PO; n=5) com ± 24 meses de idade, mantidas em regime de pasto (*coast-cross*) e suplementadas com ração concentrada contendo 16% de proteína bruta e 60% de energia (nutrientes digestíveis totais), fornecida duas vezes ao dia, sal mineralizado *ad libitum* e com acesso irrestrito a água.

As novilhas foram submetidas à sincronização da ovulação com o protocolo resumido na Figura 1. Após a última aplicação de BE (1 mg, via IM, RIC-BE[®], Tecnopec, São Paulo, Brasil) o desenvolvimento dos folículos ≥ 1 mm de diâmetro foi acompanhado por ultra-sonografia transretal (Aloka SSD 900; transdutor de 7,5 MHz), a cada 12 horas, até o sexto dia após a ovulação. Considerou-se como o momento da ovulação a média entre a última vez que o folículo ovulatório foi visto e a primeira ocasião em que o mesmo não foi detectado no monitor do ultra-som.

O transdutor de ultra-som (Aloka SSD 900, transdutor de 7,5 MHz) foi movimentado sobre a superfície dos ovários e, quando necessário, a imagem do monitor foi congelada para mensuração do tamanho dos folículos (≥ 1 mm). Duas imagens diferentes de cada folículo foram congeladas e mensuradas. Quando se observou acentuada diferença entre as mensurações, obteve-se uma terceira imagem para confirmar o tamanho correto do folículo. Após cada exame foram desenhados diagramas da posição dos folículos em relação a outras estruturas ovarianas, de forma a permitir a identificação de cada folículo durante os dias sucessivos. As novilhas foram abatidas no terceiro (n=3) ou quinto (n=2) dia após a ovulação, para retirada dos ovários, dissecação e obtenção de amostras de células da granulosa dos folículos maiores ou iguais a 8,5 mm de diâmetro (medidos com paquímetro).

4.2 Dissecação dos folículos

Os ovários foram acondicionados em sacos plásticos contendo solução fisiológica resfriada (4°C), colocados dentro de uma caixa térmica e levados aos laboratórios montados nos respectivos locais onde foram realizados os experimentos com novilhas ou vacas. Em seguida foram avaliados para

verificar a presença de corpo lúteo ou de ovulações prévias. O diâmetro médio (comprimento/altura) de cada folículo foi determinado com paquímetro.

Os folículos foram dissecados com o auxílio de pinças e tesouras que foram lavadas em tubos corning de 50 mL contendo seqüencialmente: água destilada, solução contendo RNaseZap Ambion® e água destilada novamente.

4.3 Obtenção do fluido folicular

Após dissecação e retirada do estroma ovariano, nos folículos iguais ou maiores que 8,5 mm de diâmetro foram realizadas as aspirações do fluido folicular de cada folículo foi aspirado com agulha de calibre 25x10 mm acoplada a seringa de 1,0 mL. O fluido folicular foi congelado em freezer (Forma Scientific®) a -80°C para posterior análise das concentrações de estradiol e progesterona por radioimunoensaio.

4.4 Isolamento das células da granulosa

No grupo das vacas controle (n=12) e superestimuladas (n=7), as células da granulosa foram isoladas por raspagem, seguidas por centrifugação. A amostra obtida foi centrifugada a 900g por 15 segundos, com o objetivo de separar as células da granulosa dos resíduos de fluido folicular. Após eliminação do sobrenadante, restou um sedimento de células da granulosa.

No grupo das novilhas cíclicas, após aspiração do fluido folicular, uma solução fisiológica estéril foi injetada e retirada da cavidade folicular repetidamente (cerca de 8 vezes) utilizando-se uma seringa para recuperação das células granulosas. Em seguida, a solução foi centrifugada (900g por 15 segundos) a fim de concentrar as células e possibilitar a remoção da solução fisiológica.

O sedimento de células resultante (de ambos os grupos) foi imerso em 1 mL de Trizol®, homogeneizado (homogeneizador de tecidos Polytron – UltraTurrax/T-25) por 1 minuto e congelado a -80°C para posterior extração de RNA total pelo protocolo Trizol (Invitrogen®).

4.5 Extração do RNA total

Assim que as amostras foram descongeladas, adicionou-se 200 μ L de clorofórmio nos tubos contendo o RNA com 1 mL de Trizol[®]. Após 15 segundos de agitação, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 2,5 minutos e centrifugadas a 7.300g por 15 minutos a 4°C. O clorofórmio foi utilizado para separar a amostra em duas fases: uma orgânica e outra inorgânica. Um halo branco foi formado por proteínas e um rosa por DNA. O RNA total ficou solubilizado exclusivamente na fase inorgânica, representada pelo sobrenadante transparente resultante da centrifugação.

Na etapa de precipitação do RNA total, a fase aquosa (inorgânica) obtida anteriormente foi transferida para outro tubo (polipropileno de 1,5 mL – Eppendorf[®]), acrescida de 0,5 mL de álcool isopropílico e incubada à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida a solução foi centrifugada a 7.300g durante 10 minutos à 4°C, formando um sedimento. O sobrenadante foi removido e o RNA lavado com 1 mL de etanol a 75% e novamente centrifugado a 7.300g por 5 minutos a 4°C.

Após a retirada do excesso de líquido do tubo com auxílio de uma pipeta, o RNA foi dissolvido em 10 μ L de água GIBCO[®] e incubado por 10 minutos à 60°C (Bloco aquecedor – Thermolyne Type 17600[®]) para finalmente ser armazenado a -80°C. A concentração do RNA total recuperado foi mensurada por espectrofotometria (Biophotometer-Eppendorf[®]).

4.6 Reação de Transcrição Reversa (RT-PCR)

A expressão do mRNA codificador do LHR foi investigada por reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) em células da granulosa. A expressão do gene constitutivamente expresso gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizada como controle interno da RT-PCR. Antes da reação de transcrição reversa, a fim de evitar que contaminação com DNA genômico interferisse nos resultados, amostras de 1 μ g de RNA foram incubadas com DNase (Invitrogen[®]).

4.6.1 Protocolo DNase I

Seguindo as instruções do protocolo DNase I - Amplification Grade (Invitrogen®), o RNA total destinado à reação de transcrição reversa foi transferido para um microtubo estéril, ao qual foi acrescentado 1 µL de tampão (Buffer Kit DNase), 1 µL de DNase I (1 U/µL) e água destilada tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) e autoclavada na quantidade suficiente para completar 10 µL de solução. Essa solução permaneceu em temperatura ambiente durante 15 minutos e, em seguida foi acrescido 1 µL de EDTA (25 mM) e incubação a 65°C por 10 minutos. Após a incubação, as amostras foram transferidas para cuba contendo gelo e imediatamente submetidas à reação de transcrição reversa.

4.6.2 Reação de transcrição reversa (RT)

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

4.6.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do cDNA do LHR foram delineados com base na seqüência para o gene bovino disponível no GenBank (acesso U20504). O oligonucleotídeo iniciador “sense” foi posicionado no éxon 9 e o “anti-sense” no éxon 11 (Figura 3), a fim de amplificar esta região dos transcritos do receptor do LH. Portanto, as isoformas

do LHR pesquisadas foram: M1, forma completa do gene), M2, isoforma com deleção do éxon 10), M3, isoforma com deleção da porção proximal do éxon 11) e M4, isoforma com deleção do éxon 10 e parte da porção proximal do éxon 11). “Primers” para o gene GAPDH foram incluídos no RT-PCR, já que a expressão deste gene foi utilizada como referência para a semi-quantificação da expressão dos receptores do LH. A fim de detectar a contaminação das amostras de células da granulosa com células da teca, investigou-se a expressão da CYP17 (17 α hidroxilase), característica das células da teca (Tabela 1). As amostras de células da granulosa que apresentaram contaminação por células da teca foram descartadas do experimento. As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação do GAPDH, bem como para as isoformas do LHR e da CYP17, estão descritas na Tabela 2.

Para a amplificação desses genes pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizou-se o protocolo TaqDNA Polimerase (Invitrogen®). Ao produto (cDNA, 0,5 uL) foi acrescido: 2,5 μ L de tampão PCR 10X (fornecido no Kit - Invitrogen®); 0,75 μ L de MgCl₂ (50mM); 0,5 μ L de dNTP Mix (0,2mM); oligonucleotídeos iniciadores “sense” e “antisense”; 1,25uL de Platinum *Taq* DNA polimerase; água destilada autoclavada para completar 25 μ L. Na seqüência, as amostras foram desnaturadas a 94°C por 3 minutos no termociclador (MJ Research PTC 200®). As temperaturas e tempos de desnaturação, anelamento e extensão, específicas para cada gene foram descritas por Nogueira et al. (2007). O número de ciclos foi aumentado de 29 para 32.

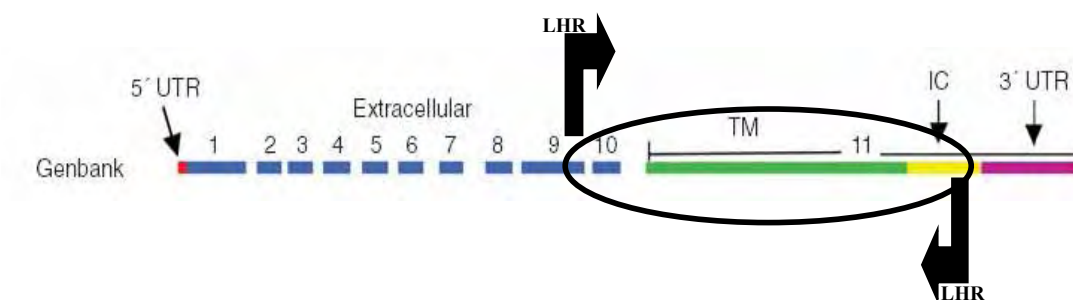


Figura 3. Estrutura e disposição dos éxons no gene codificador do LHR. Os números (1 a 11) indicam os éxons; TM = domínio transmembrânico; IC = região intracelular; UTR = região não traduzida.

Tabela 1. Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do GAPDH, M1, M2, M3, M4 e da CYP17.

Gene	Seqüência	Tamanho do fragmento amplificado
GAPDH	S 5`tgt tcc agt atg att cca ccc 3' A 5'tcc acc acc ctg ttg ctg 3'	850 pb
M1		1240 pb
M2	S 5'aaa ctt gcc aac aaa cga 3'	1159 pb
M3	A 5'ata gca agt ctt gtc cag ga 3'	975 pb
M4		894 pb
CYP17	S 5'gaa tgc ctt tgc cct gtt ca3' A 5'cgc gtt tga aca caa ccc tt3'	330 pb

S = "sense"; A = "antisense"; pb = pares de bases.

4.7 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese (100V por 4 horas) em gel de agarose a 3,0% em tampão Buffer. O gel foi corado em solução de brometo de etídio (1µg/mL) durante 30 minutos. O "DNA Ladder 100bp" (Invitrogen®) foi utilizado como referência para avaliar o tamanho dos fragmentos amplificados. As imagens dos géis foram visualizadas mediante exposição do gel à luz ultravioleta e digitalizados no equipamento ImageMaster (PharmaciaBiotech®) para posterior análise por densitometria das bandas.

4.8 Dosagem de E₂ e P₄ no fluido folicular

As concentrações de estradiol e de progesterona no fluido folicular em amostras obtidas de vacas e novilhas da raça Nelore foram determinadas por meio de radioimunoensaio.

No ensaio para dosagem de estradiol foi utilizado o Kit DSL-4400 (Diagnostic Systems Laboratories[®], Inc., Webster, Texas), além de uma curva padrão construída a partir de estradiol liofilizado Sigma[®]. O intervalo das concentrações de estradiol utilizado na curva padrão foi de 0,031 a 500 pg/tubo de 100 µL). A diluição utilizada para o fluido folicular foi de 1:1000. As concentrações de estradiol no fluido folicular foram determinadas, em único ensaio, e o coeficiente de variação intra-ensaio foi de 4,4% (RODBARD, 1974). O limite de detecção foi de 2,3 pg/mL com “binding” de 90%.

No ensaio para dosagem de progesterona foi utilizado o Kit DSL-3400 (Diagnostic Systems Laboratories[®], Inc., Webster, Texas-USA), além de uma curva padrão construída a partir de progesterona liofilizada (Sigma[®]). O intervalo das concentrações de progesterona utilizado na curva padrão foi de 3,9 a 1000 pg/tubo). A diluição utilizada para o fluido folicular foi de 1:10. As concentrações de progesterona no fluido folicular foram determinadas, em único ensaio, e o coeficiente de variação intra-ensaio foi de 8,0%. O limite de detecção foi de 144 pg/mL com “binding” de 90%.

4.9 Dosagem de P₄ no plasma

A dosagem da concentração plasmática de progesterona no grupo VSE foi baseada na técnica de radioimunoensaio descrita por Knickerbocker et al. (1986) e padronizada por Pinheiro (1996), e por Figueiredo et al., (1997). O antisoro específico contra progesterona bovina foi cedido pela Dra. Magaly Manzo, da Universidade Central da Venezuela (Maracay, Aragua). As concentrações de progesterona no plasma foram determinadas em único ensaio, e o coeficiente de variação intra-ensaio foi de 8,2% (RODBARD, 1974). O limite de detecção determinado como 90% de ligação do total foi de 0,6 ng/mL.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores relativos da expressão do gene alvo, das isoformas de LHR, e das concentrações hormonais foram transformados em logaritmos, pelo fato dos dados não apresentarem distribuição normal. Os dados foram apresentados na forma de médias re-transformadas, calculando-se o exponencial sobre o valor das médias em logaritmo, e a variabilidade na forma de erro padrão da média (EPM). Para comparar os grupos (NC vs. VSE) e as expressões das isoformas do LHR (M1, M2, M3 e M4) nos grupos de novilhas cíclicas (NC) e de vacas superestimuladas (VSE) usou-se a análise de variância para medidas repetidas no mesmo animal (PROC MIXED do SAS). Para as comparações múltiplas entre as várias médias de interesse usou-se a correção de Bonferroni no valor **p** da estatística **t**. Para avaliar o efeito de tamanho de folículos e da razão E_2/P_4 sobre as expressões das isoformas do LHR, também foi utilizado a análise de medidas repetidas incluindo tamanho folicular e razão E_2/P_4 como co-variáveis, porém a análise foi separada por grupo. As comparações entre as médias de estradiol (E_2), progesterona (P_4) e razão E_2/P_4 , entre os grupos experimentais, foram realizadas mediante o test-t.

6 RESULTADOS

As vacas (n=7) foram submetidas à coleta de amostras de sangue no d0 do protocolo de superestimulação ovariana, para dosagem de P_4 plasmática por radioimunoensaio. A concentração média de P_4 plasmática obtida foi de $7,07 \pm 1,4$ ng/mL, níveis compatíveis com a fase lútea do ciclo estral.

Na tabela 2 estão descritos os dados individualizados por folículo dentro de cada grupo experimental. Neste experimento, a expressão das isoformas (M1 a M4) foram calculados como valores relativos à expressão do GAPDH. De cada novilha cíclica (NC) foi obtido apenas um folículo ($\geq 8,5$ mm) para dissecação e obtenção de células da granulosa, enquanto que nas vacas submetidas à superestimulação obtiveram-se vários folículos pré-ovulatórios com diâmetro ≥ 10 mm. Após a superestimulação ovariana com Folltropin® de sete vacas, obteve-se 117 folículos dissecados (16,7 folículos/vaca), 8 romperam durante a ovariectomia e 12 durante a dissecação. Assim sendo, o tratamento superestimulatório resultou numa média de 19,6 folículos por vaca. Vários folículos não puderam ser utilizados em função de contaminação das células da granulosa por células da teca (82/117, 70,1%), ou da não expressão do gene constitutivo (15/117, 12,8% - GAPDH). Portanto, dos 117 folículos dissecados no grupo VSE somente 20 foram efetivamente utilizados. As amostras de folículos provenientes das vacas número 6 e 7 do grupo VSE foram excluídas do experimento por alguns dos motivos citados acima. No grupo de novilhas cíclicas, uma amostra foi excluída (novilha B) por apresentar razão E_2/P_4 muito próxima de zero (0,08, folículo em atresia).

Tabela 2. Identificação dos animais, grupo experimental, diâmetro folicular, razão E_2/P_4 , e abundância das isoformas do mRNA (M1, M2, M3 e M4) e do gene constitutivo (GAPDH).

Animais	Grupos	Folículo (mm)	Razão E_2/P_4	Abundância de mRNA (LHR/GAPDH)			
				M1	M2	M3	M4
A ^{3d}	NC	8,5	6,91	56,61	16,28	46,90	6,66
C ^{3d}	NC	9	--	35,25	17,55	26,91	12,95
D ^{5d}	NC	10	8,51	59,15	25,97	55,68	22,53
E ^{5d}	NC	14	3,08	100,64	19,13	63,61	14,06
1	VSE	19	12,80	9,85	-	6,07	-
1	VSE	19	1,21	8,17	-	10,40	-
2	VSE	18	5,99	16,17	-	42,61	-
3	VSE	10	0,93	5,47	-	10,73	-
3	VSE	11	1,25	37,04	10,92	38,63	4,98
3	VSE	14	0,92	0,48	-	9,41	-
3	VSE	15	0,92	13,41	12,22	11,72	5,19
3	VSE	17	0,50	16,51	8,96	20,99	17,94
3	VSE	18	0,74	12,64	9,44	14,09	12,38
4	VSE	10	1,04	8,60	2,74	4,21	-
4	VSE	11	1,18	6,18	-	6,72	-
4	VSE	12	0,38	7,20	-	21,51	-
4	VSE	13	0,85	1,16	-	2,12	-
4	VSE	13	1,17	6,62	-	9,83	-
4	VSE	13	0,28	3,41	-	5,99	-
4	VSE	14	2,05	3,79	-	9,23	-
4	VSE	14	0,74	4,45	-	12,56	-
4	VSE	16	2,10	5,98	-	3,36	-
4	VSE	19	1,10	2,67	-	2,56	-
5	VSE	14	1,08	25,20	12,67	31,67	15,74

NC – grupo de novilhas cíclicas; VSE – grupo de vacas superestimuladas;

^{3d}, ^{5d} Valores em sobrescrito indicam os dias após a ovulação em que as novilhas cíclicas foram abatidas para a coleta dos folículos ovarianos.

Na tabela 3, os dados são apresentados considerando-se valores médios ($\pm$ EPM) para diâmetro folicular e para as razões entre os valores de expressão das isoformas do LHR (M1, M2, M3 e M4) em relação ao GAPDH para as amostras de células da granulosa provenientes dos folículos das vacas submetidas à superestimulação ovariana (grupo VSE, vacas 1, 3, e 4), tendo-se em vista a necessidade de obter valores “estatisticamente mais homogêneos” entre as vacas que expressaram LHR em vários folículos (vacas 1, 3 e 4) quando comparado àquelas com apenas um folículo (2 e 5).

Tabela 3. Identificação dos animais, grupo experimental, diâmetro folicular (animais A a E) e médias ($\pm$ EPM) para diâmetro folicular (animais 1, 3 e 4), razão E_2/P_4 (animais A a E, 2 e 5, e médias para os animais 1, 3 e 4), e abundância de mRNA (LHR/GAPDH) das isoformas para os animais do grupo VSE.

Animais	Grupos	Folículo (mm)	Razão E_2/P_4	Abundância de mRNA (LHR/GAPDH)			
				M1	M2	M3	M4
A ^{3d}	NC	9,0	--	35,25	17,55	26,91	12,95
C ^{3d}	NC	8,5	6,91	56,61	16,28	46,90	6,66
D ^{5d}	NC	10,0	8,51	59,15	25,97	55,68	22,53
E ^{5d}	NC	14,0	3,08	100,64	19,13	63,61	14,06
1	VSE	19,0 $\pm$ 0,0	1,63	9,0 $\pm$ 0,84	-	8,2 $\pm$ 2,18	-
2	VSE	18,0	2,05	16,17	-	42,61	-
3	VSE	14,2 $\pm$ 1,3	3,44	14,3 $\pm$ 5,14	6,96 $\pm$ 2,21	17,6 $\pm$ 4,52	6,8 $\pm$ 2,9
4	VSE	13,5 $\pm$ 0,8	2,18	5,0 $\pm$ 0,72	-	7,8 $\pm$ 1,87	-
5	VSE	14,0	0,38	25,20	12,67	31,67	15,74

NC – grupo de novilhas cíclicas; VSE – grupo de vacas superestimuladas;

^{3d}, ^{5d} Valores em sobrescrito indicam os dias (após a ovulação) em que os animais do grupo NC foram abatidos para a coleta dos folículos ovarianos.

Os dados de expressão das isoformas do LHR (M1 a M4) da tabela 4, por não apresentarem distribuição normal, foram transformados em escala logarítmica ($\log_x+1$), e posteriormente convertidos em médias (re-transformadas, e^x-1).

Ao analisar a expressão do gene para o LHR entre os grupos de novilhas cíclicas e de vacas superestimuladas, verificou-se menor expressão média do LHR no grupo de vacas superestimuladas (tabela 4).

Tabela 4. Médias re-transformadas ($\pm$ EPM) da expressão do gene para o LHR em novilhas cíclicas (grupo NC) ou em vacas submetidas à superestimulação ovariana (grupo VSE). EPM = erro padrão da média.

Grupos	Expressão média do LHR
NC (n=4)	28,96 $\pm$ 0,40
VSE (n=5)	6,50 $\pm$ 0,35*

* $p < 0,02$ (Bonferroni).

Tanto o diâmetro folicular como a razão E_2/P_4 não influenciaram significativamente na expressão das isoformas do LHR nos grupos NC e VSE ($p > 0,20$).

Houve menor expressão da isoforma M1 no grupo VSE quando comparado ao NC e a expressão da isoforma M2 tendeu a ser menor no grupo VSE. Apesar da expressão das isoformas M3 e M4 não terem sido significativamente diferentes ($p > 0,05$) entre os grupos NC e VSE, houve diminuição numérica nas médias da expressão destas isoformas no grupo VSE quando comparado ao grupo NC (Tabela 5).

Tabela 5. Médias re-transformadas ($\pm$ EPM) da expressão das isoformas do gene para o LHR (M1, M2, M3 e M4) em novilhas cíclicas (grupo NC) ou em vacas submetidas à superestimulação ovariana (grupo VSE). EPM = erro padrão da média.

Grupos	Isoformas do LHR			
	M1	M2	M3	M4
NC (n=4)	58,74 $\pm$ 0,28	19,5 $\pm$ 0,62	46,0 $\pm$ 0,35	13,01 $\pm$ 0,72
VSE (n=5)	12,33 $\pm$ 0,26	1,72 $\pm$ 0,54	17,54 $\pm$ 0,31	1,56 $\pm$ 0,62
p (Bonferroni)	0,012	0,064	0,208	0,217

Ao avaliar a expressão do LHR dentro do grupo NC verificou-se que houve diferença significativa entre as isoformas M1 e M4 ($p < 0,05$, Figura 4), enquanto que dentro do grupo VSE houve maior expressão das isoformas M1 e M3 quando comparado com as isoformas M2 e M4 ($p < 0,02$, Figura 5).

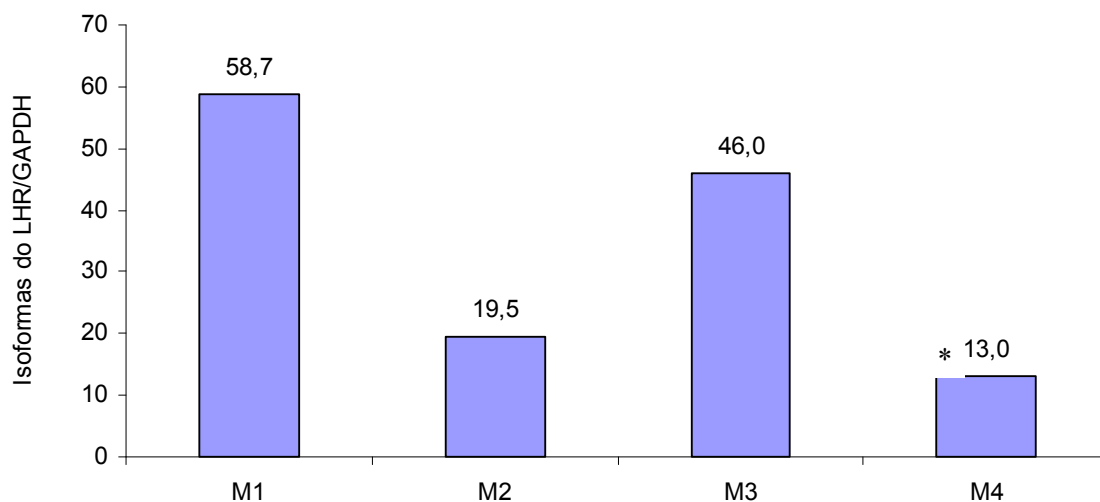


Figura 4. Expressão das isoformas (M1, M2, M3 e M4) do gene para o LHR nas células da granulosa de folículos obtidos de novilhas cíclicas, *M1 $\neq$ M4, $p < 0,05$, Bonferroni.

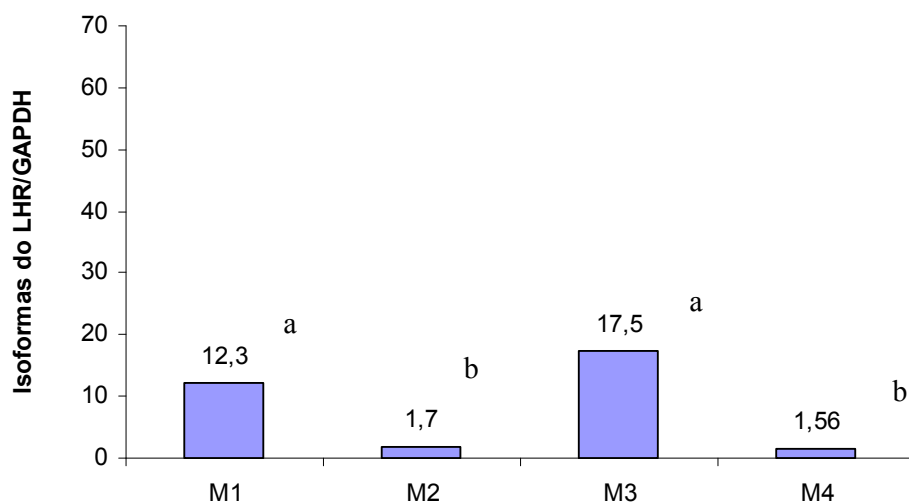


Figura 5. Expressão das isoformas (M1, M2, M3 e M4) do gene para o LHR nas células da granulosa de folículos obtidos de vacas submetidas à superestimulação ovariana. ^{a, b} Valores em sobrescrito indicam que houve diferença significativa entre as isoformas de LHR ($p < 0,02$, Bonferroni).

Analisando a expressão do LHR nos grupos VSE e NC em conjunto, verificou-se que a expressão das isoformas M1 (forma completa - “full-length”) e M3 (deleção parcial do éxon 11) foi mais intensa que as isoformas M2 (deleção completa do éxon 10) e M4 (deleção conjunta observada em M2 e M3, Tabela 6).

Tabela 6. Médias re-transformadas ($\pm$ EPM) dos transcritos do LHR (M1, M2, M3 e M4), analisando conjuntamente os dados dos grupos NC e VSE. EPM = erro padrão da média.

Isoformas do LHR	Médias $\pm$ EPM
M1 (n=10)	27,22 $\pm$ 0,19 ^a
M2 (n=8)	6,46 $\pm$ 0,38 ^b
M3 (n=10)	28,37 $\pm$ 0,22 ^a
M4 (n=7)	5,05 $\pm$ 0,43 ^b

^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,02$, Bonferroni)

No grupo NC, as novilhas abatidas no dia 5 após a ovulação apresentaram maior intensidade média na expressão das isoformas do LHR em folículos com diâmetro médio de 12,0 mm quando comparado à expressão média do LHR pelas fêmeas abatidas no dia 3 quando o diâmetro folicular médio era de 8,75 mm (Tabela 7). Neste grupo de animais não houve interação entre os dias de abate e a expressão das isoformas do LHR (M1, M2, M3 e M4), portanto os dados foram apresentados na tabela 7 como uma média geral de todas as isoformas.

Tabela 7. Diâmetro folicular médio (mm) e médias re-transformadas ($\pm$ EPM) da expressão do gene para o LHR em novilhas cíclicas (grupo NC) abatidas nos dias 3 (d3) ou 5 (d5) após a ovulação. EPM = erro padrão da média.

Abate	Diâmetro folicular médio (mm)	Expressão do LHR
d3 (n=2)	8,75	22,57 $\pm$ 0,03
d5 (n=2)	12,0	38,09 $\pm$ 0,03*

(* $p < 0,01$, Bonferroni).

As concentrações de E_2 e de P_4 no fluido folicular foram determinadas por meio de radioimunoensaio, para a obtenção da razão E_2/P_4 , exceto numa amostra do grupo NC, por não haver fluido folicular em quantidade suficiente para o RIA. Os folículos dos grupos VSE e NC apresentaram concentrações intrafoliculares médias de E_2 iguais a $176,7 \pm 82,9$ e $134,8 \pm 33,9$, respectivamente ($p > 0,3$, teste-t). A concentração média de progesterona foi significativamente maior no grupo VSE quando comparado ao NC ($108,6 \pm 35,35$ vs. $26,72 \pm 11,2$ ng/mL, respectivamente, $p < 0,04$, teste-t). A média da razão E_2/P_4 foi maior no grupo NC quando comparado ao VSE ($6,17 \pm 1,6$ vs. $1,94 \pm 0,49$, respectivamente, $p < 0,03$, teste-t, tabelas 8).

Tabela 8. Níveis intrafoliculares médios para estradiol e progesterona, e razão E_2/P_4 , para os grupos de novilhas cíclicas (grupo NC) e de vacas superestimuladas (grupo VSE).

	Estradiol (ng/mL)	Progesterona (ng/mL)	Razão E_2/P_4
Grupo NC	$134,8 \pm 33,9^a$	$26,72 \pm 11,2^a$	$6,17 \pm 1,6^a$
Grupo VSE	$176,7 \pm 82,9^a$	$108,6 \pm 35,3^b$	$1,94 \pm 0,49^b$

^{a, b} letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (Test-t, $p < 0,04$).

7 DISCUSSÃO

Analizando a expressão do LHR nos grupos de vacas e novilhas em conjunto, verificou-se que a expressão das isoformas M1 (forma “full-length”) e M3 (deleção parcial do éxon 11) foi mais intensa que as isoformas M2 (deleção completa do éxon 10) e M4 (deleção conjunta observada em M2 e M3). Em células da granulosa, provenientes de folículos $\geq 8,5$ mm de diâmetro houve menor expressão do gene para o LHR em vacas superestimuladas do que em novilhas cíclicas. Além disso, nas novilhas cíclicas, a expressão do LHR foi mais intensa nos folículos coletados no quinto dia (12 mm de diâmetro) quando comparados àqueles obtidos no terceiro dia (8,75 mm) após a ovulação.

Na análise dos resultados provenientes de novilhas e vacas em conjunto, observou-se maior expressão das isoformas M1 e M3 em relação a M2 e M4, assim como no grupo VSE, corroborando com os resultados obtidos por Nogueira et al. (2007), em vacas aneloradas. O significado biológico do predomínio na expressão das isoformas M1 e M3, em relação às isoformas M2 e M4, ainda não é conhecido.

Ao analisar a expressão do gene para o LHR entre os grupos NC e VSE, verificou-se menor expressão média do gene do LHR no grupo de vacas superestimuladas com Folltropin®. Além disso, 100% das amostras de folículos dominantes ($\geq 8,5$ mm) expressaram as quatro isoformas do LHR no grupo de novilhas cíclicas. Entretanto, no grupo VSE, 100% das amostras expressaram as isoformas M1 e M3 enquanto que apenas 30% e 25% expressaram M2 e M4, respectivamente, caracterizando um padrão distinto de expressão do LHR nos grupos NC e VSE.

Nas novilhas cíclicas, apenas um folículo dominante cresceu sob condições fisiológicas e sem interferência de tratamentos hormonais (folículo da primeira onda folicular). Por outro lado, nas vacas superestimuladas com Folltropin® os folículos cresceram em co-dominância, portanto, sob diferentes padrões hormonais e fisiológicos, o que poderia explicar, em parte, as diferenças na expressão do LHR entre os folículos superestimulados e o folículo dominante. No protocolo superestimulatório, ao ser utilizado a dose total de 130 mg de FSH (Folltropin®), também foi administrado ± 25 mg de LH, pelo fato deste produto comercial ter uma razão FSH:LH de 5,25:1

Hipoteticamente, este LH pode ter ativado a via de sinalização que induz à síntese de mevalonato quinase (MVK), promovendo uma “down regulation” parcial na expressão do LHR, de acordo com o modelo proposto por Menon et al., (2006) e Wang et al., (2007). Além disso, os folículos foram obtidos 36 horas após o tratamento superestimulatório, período em que já poderia ter ocorrido o pico endógeno de LH (cerca de 12 horas antes da ovariectomia), o que pode ter incrementado a “down regulation”, provocada pelo LH exógeno. É importante destacar que esta supressão na expressão do LHR não compromete a ovulação (no protocolo utilizado) na superestimulação ovariana, como tem sido verificado por vários autores.

Soumano et al. (1998), avaliaram a expressão de FSHR e LHR em folículos obtidos de novilhas da raça Holandesa, após superestimulação com eCG (Folligon®) ou FSH (Folltropin®). De forma similar, os autores aventaram a hipótese de que o eCG possa ter provocado uma “down-regulation” na expressão do FSHR e do LHR nas células foliculares, tendo-se em vista a maior atividade de LH do Folligon®, comparado à do Folltropin®, como forma de explicar a menor expressão do FSHR e do LHR nas células foliculares do grupo superestimulado com eCG.

Ao investigar-se a região compreendida entre os finais dos éxons 9 e 11 do LHR, em células da granulosa de folículos obtidos de novilhas ($\geq 8,5$ mm de diâmetro) ou de vacas Nelore (≥ 10 mm), detectou-se no presente estudo quatro isoformas do LHR (forma completa, e as isoformas com deleção do éxon 10 e/ou parcial do éxon 11), corroborando com os dados descritos por Abdennebi et al. (2002) em ovinos, por Robert et al. (2003) em taurinos, e por Nogueira et al. (2007) em vacas aneloradas. De forma similar aos resultados obtidos neste experimento, Nogueira et al. (2007), identificaram quatro isoformas do LHR (LHRB3 – forma completa, LHRB4 - deleção do éxon 10, LHRB5 - deleção parcial do éxon 11 e LHRB6 - deleção do éxon 10 e parcial do 11) utilizando oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) específicos para amplificar o fragmento entre o final da região extracelular e o final da intracelular do LHR (“primers” posicionados nos éxons 9 e 11).

As funções das isoformas M2, M3 e M4 ainda não são totalmente conhecidas. Kawate et al. (2002) demonstraram que houve transporte e posicionamento na superfície celular das isoformas do LHR traduzida por

mRNA com deleção do éxon 10. Apesar desta isoforma ser transportada e posicionada na membrana celular, Gromoll et al. (2000) e Müller et al. (2003), verificaram que a deleção do éxon 10 resultou num LHR com afinidade diminuída ao LH em relação à hCG. Em humanos a deleção do éxon 10 resulta em hipogonadismo, mesmo em indivíduos com níveis normais de LH. Somente o tratamento com a hCG é capaz de restaurar os caracteres sexuais secundários do paciente com esta síndrome, demonstrando o papel do éxon 10 na discriminação entre as ações do LH e hCG. Nogueira et al. (2005), utilizaram LH e hCG com o intuito de promover a ativação das isoformas de LHR presentes na superfície celular (forma completa e/ou isoforma com deleção do éxon 10). Entretanto, os autores não observaram diferença significativa na produção total de embriões viáveis após a indução de ovulação com LH (controle) ou LH+hCG (tratado) em doadoras de embriões superovuladas, o que não permitiu aos autores inferir qualquer função para a isoforma com deleção do éxon 10.

A isoforma com deleção parcial do éxon 11 (M3), juntamente com a forma completa (M1), foi uma das mais expressas pelas células da granulosa dos folículos $\geq 8,5$ mm, de forma similar aos resultados obtidos em vacas aneloras por Nogueira et al., (2007). No grupo VSE, a isoforma M3 foi numericamente mais expressa que a isoforma M1, apresentando um padrão similar de expressão ao descrito por Nogueira et al. (2007), quando células da granulosa foram cultivadas sob FSH (1 ou 10 ng).

Em bovinos, Kawate et al. (2002), demonstraram que houve um transporte anômalo para as isoformas com deleção parcial do éxon 11 do LHR (M3 e M4, isoformas sem a região transmembrânica e intracelular), de maneira a não atingirem a superfície celular e ficarem aprisionadas no citoplasma. Desta forma, estas isoformas seriam afuncionais para os ligantes LH e hCG. Segundo Robert et al. (2003), e Kawate (2004), a função da isoforma M3 aprisionada no citosol ainda é desconhecida. Entretanto, uma função de coadjuvante, na oligomerização dos complexos de LHR observados na membrana citoplasmática após a ligação com o hormônio (ROESS et al., 2000a, b; ROESS & SMITH, 2003; HUNZICKER-DUNN et al., 2003), pode contribuir, mesmo que parcialmente, para explicar a abundância de mRNA para a isoforma M3 do LHR.

Nas novilhas cíclicas, a expressão do LHR foi mais intensa nos folículos coletados no quinto dia (12 mm) quando comparados àqueles obtidos no terceiro dia (8,75 mm) após a ovulação, corroborando com vários autores (XU et al., 1995; BAO et al., 1997; BAO & GARVERICK, 1998) que verificaram que a expressão desses receptores em células da granulosa de novilhas da raça Holandesa iniciou-se nos folículos com diâmetro superior a 8 mm, e aumentou com o tamanho do folículo, atingindo valores máximos de expressão quando o folículo dominante está próximo do seu maior diâmetro. De forma semelhante, Nogueira et al. (2007), relataram que a aquisição de LHR, pelas células da granulosa, ocorre entre 7 e 8 mm de diâmetro folicular em vacas aneloradas e que a expressão aumentou com o diâmetro folicular, atingindo 88,9% de expressão nos folículos da classe de 9 a 14 mm de diâmetro. Recentemente, Ereno (2008), utilizando novilhas da raça Nelore, também verificou que a expressão de LHR em células da granulosa aumentou com o diâmetro folicular, iniciando em folículos com 7 mm de diâmetro.

No presente experimento foram utilizados apenas folículos com diâmetro $\geq 8,5$ mm (grupo de novilhas cíclicas) ou ≥ 10 mm (grupo de vacas superestimuladas). De acordo com Gimenes et al. (2008), 33, 80 e 90% das novilhas zebuínas (Nelore e Gir) ovularam após administração de LH, quando o folículo dominante atingiu diâmetro entre 7,0 e 8,4; 8,5 e 10,0 e acima de 10,0 mm, respectivamente. De forma similar, o LH induziu ovulação em 90% das vacas Nelore com folículos entre 9 e 10 mm e apenas 20% nas vacas com folículos entre 7,5 e 8 mm de diâmetro (SIMÕES et al., 2008). Em outro experimento, realizado com vacas da raça Holandesa, a administração de 40 mg de LH em vacas induziu 80% de ovulação nos animais com folículos ≥ 10 mm, enquanto que no grupo de vacas com folículos de 7 e 8,5 mm não houve ovulação (SARTORI et al., 2001). Neste segundo grupo, a ausência de taxa de ovulação é corroborada por Beg et al., (2001) e Ginther et al., (2001) que relataram em seus trabalhos que a expressão de LHR em células da granulosa somente inicia-se em folículos a partir de 8 mm de diâmetro. Portanto, os resultados de Sartori et al., (2001) e de Gimenes et al. (2008) são indicativos de que a capacidade ovulatória em *Bos taurus indicus* é adquirida por folículos com diâmetros inferiores aos observados em *Bos taurus taurus*, e que os folículos utilizados no presente experimento ($\geq 8,5$ mm) deveriam ter

capacidade ovulatória, caso fossem submetidos a tratamento com LH, conforme protocolo p36 descrito por Barros & Nogueira (2001). O progressivo aumento de transcritos do LHR, culminando nos folículos com diâmetros pré-ovulatórios, pode ser um mecanismo para a instalação plena da capacidade ovulatória do folículo (HERRLICH et al., 1996; SARTORI et al., 2001; GIMENES et al., 2008). Embora um aumento na expressão do LHR das células da granulosa, seja necessário para a aquisição de dominância folicular, somente esse aumento parece não ser suficiente para a instalação plena da capacidade ovulatória. Tal mecanismo, ainda não elucidado, pode ser decorrente de um aumento, ainda maior, na quantidade de LHR, associada às alterações nas vias de sinalização intracelular que o LHR possui na fase pós-divergência e à expressão de angiotensina e de cox-2.

No grupo VSE foram utilizados folículos co-dominantes com razão E_2/P_4 variando de 0,28 a 12,8, enquanto que no grupo NC somente foram utilizados folículos com razão E_2/P_4 maior que 1 (folículos não atrésicos). Vários estudos realizados com folículos bovinos têm demonstrado que durante o desenvolvimento folicular existe uma alta correlação entre a concentração de estradiol intrafolicular, a capacidade de esses folículos atingirem a dominância, a expressão de LHR e a capacitação final pré-ovulação (MIHM et al., 2000; AUSTIN et al., 2001; BEG et al., 2001; RIVERA et al., 2001; RIVERA & FORTUNE, 2001; GINTHER et al., 2001). Ao entrar em atresia, os folículos apresentam progressivamente maiores concentrações intrafoliculares de progesterona. Desse modo, uma alta concentração de 17β -estradiol aliada a baixos níveis de progesterona no fluido folicular seria uma das formas de identificar folículos estradiol-ativos, antes de entrar em atresia, o que está de acordo com a metodologia utilizada para a seleção dos folículos $\geq 8,5$ mm no grupo de novilhas cíclicas.

No grupo VSE, os folículos que expressaram LHR foram obtidos 36 horas após a superestimulação ovariana com Folltropin[®], e apresentaram uma razão E_2/P_4 de apenas $1,94 \pm 0,49$, demonstrando que a superestimulação ovariana alterou a esteroidogênese folicular, promovendo aumento significativo nos níveis médios de progesterona ($108,6 \pm 35,3$ ng/mL no grupo VSE vs. $26,72 \pm 11,2$ ng/mL no grupo NC), sem alteração da síntese de estradiol de

forma significativa. A partir destes dados, pode-se inferir que o tratamento superestimulatório promoveu uma redução nos valores para a razão E_2/P_4 , devido a um aumento na síntese de progesterona pelos folículos superestimulados com Folltropin[®]. Por outro lado, Hamptom et al. (2004) verificaram que o tratamento de vacas holandesas com FSH em doses basais reduziu os níveis intrafoliculares de estradiol em 36% (em folículos ≥ 10 mm de diâmetro) em relação ao grupo controle (folículos obtidos no quinto dia após o estro sincronizado). O tratamento de FSH associado ao LH promoveu incremento na atividade esteroidogênica das células da granulosa, tanto para o estradiol quanto para progesterona, o que difere dos resultados obtidos neste experimento na qual a associação do FSH (130 mg) com o LH (25 mg, Folltropin[®]) aumentou significativamente somente os níveis intrafoliculares de progesterona. Hipoteticamente, o LH presente no Folltropin[®] pode ter induzido os folículos pré-ovulatórios à uma luteinização precoce, o que pode explicar, em parte, o aumento expressivo nos níveis de progesterona no fluido folicular no grupo VSE.

Apesar do estradiol ser um indutor da expressão do LHR nas células da granulosa bovina (GINTHER et al., 2003), no presente experimento, em ambos os grupos experimentais, não foi observado efeito da razão E_2/P_4 sobre a expressão das isoformas do LHR. De forma similar Nogueira et al. (2007), não observaram correlação entre a expressão das isoformas do LHR nas células da granulosa e a concentração de estradiol no fluido folicular de folículos provenientes de fases não conhecidas do ciclo estral (ovários de vacas aneloradas provenientes de matadouro). Por outro lado, em novilhas da raça Holandesa, a expressão de receptores para LHR foi maior em folículos esteroidogênicos quando comparados aos folículos atrésicos (BAO et al., 1997; GINTHER et al., 2003). De forma similar, Berisha et al. (2000) e Evans et al. (2004) observaram maior expressão do LHR em células da granulosa de folículos com maiores concentrações intrafoliculares de estradiol. Portanto, os dados citados pelos autores acima, exceto os de Nogueira et al. (2007), corroboram a hipótese de que há uma correlação positiva entre níveis de estradiol intrafolicular e a expressão de LHR.

8 RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO

A expressão das isoformas M1 e M3 nas células da granulosa foi mais intensa que as isoformas M2 e M4, quando os resultados dos grupos experimentais (NC e VSE) foram analisados conjuntamente, assim como no grupo VSE.

Em células da granulosa provenientes de folículos $\geq 8,5$ mm de diâmetro houve diminuição na expressão do gene para o LHR em vacas superestimuladas com Folltropin[®], quando comparado com as novilhas cíclicas.

A detecção da expressão das isoformas M1 e M3 foi de 100% nas amostras dos dois grupos, enquanto que as isoformas M2 e M4 diferiram entre as amostras dos grupos NC (100% de expressão) e VSE (30% e 25%, respectivamente).

Nas novilhas cíclicas, a expressão do LHR foi mais intensa nos folículos coletados no quinto dia (12 mm) quando comparados àqueles obtidos no terceiro dia (8,75 mm) após a ovulação.

Estes resultados são indicativos de que o tratamento superestimulatório com Folltropin[®] associado ao momento de obtenção dos folículos (36 h após a retirada após tratamento), diminuiu a expressão do receptor de LH nas células da granulosa, aumentou as concentrações intrafoliculares de progesterona, reduziu a razão E_2/P_4 e que a expressão das isoformas M1 e M3 foi mais freqüente do que as isoformas M2 e M4, tanto em novilhas cíclicas quanto nas vacas superestimuladas.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- AATSINKI, J.T., PIETILÄ, E.M., LAKKAKORPI, J.T., RAJANIEMI, H.J.
Expression of the LH/CG receptor gene in rat ovarian tissue is regulated by an extensive alternative splicing of the primary transcript. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v.84, p.127-35, 1992.
- ABDENNEBI, L., LESPORT, A.S., REMY, J.J., GREBERT, D., PISSELET, C., MONNIAUX, D., SALESSE, R. Differences in splicing of mRNA encoding LH receptor in theca cells according to breeding season in ewes. *Reproduction*, v.123, p.819-26, 2002.
- ADAMS, G.P., MATTERI, R.L., KASTELIC, J.P., KO, J.C.H., GINTHER, O.J.
Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J. Reprod. Fertil.*, v.94, p.177-88, 1992.
- ADASHI, E.Y. Endocrinology of the ovary. *Hum Reprod.* V.9, p.815-827, 1994.
- ADRIAENS, I., CORTVRINDT, R., SMITZ, J. Differential FSH exposure in preantral follicle culture has marked effects on folliculogenesis and oocyte development competence. *Human Reproduction*, v.19, p.398-408, 2004.
- ALVAREZ, C.A., NARAYAN, P., HUANG, J., PUETT, D. Characterization of a region of the lutropin receptor extracellular domain near transmembrane helix 1 that is important in ligand-mediated signaling. *Endocrinology*, v.140, p.1775-82, 1999.
- ASCOLI, M., FANELLI, F., SEGALOFF, D. The lutropin/choriogonadotropin receptor, a perspective. *Endocrinol. Rev.*, p.141-174. 2002
- ASSOCIAÇÃO DOS CRIADORES DE NELORE DO BRASIL - ACNB,
<http://www.nelore.org.br>. 2008.
- AUSTIN, E.J., MIHM, M., EVANS, A.C.O., KNIGHT, P.G., IRELAND, J.L.H., IRELAND, J.J., ROCHE, J.F. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. *Biol. Reprod.*, v.64, p.839-48, 2001.

¹ UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. **Normas para publicações da UNESP. São Paulo: Editora UNESP, 1994, v.2: Referências Bibliográficas.**

- BACICH, D.J., EARL, C.R., O'KEEFE, D.S., NORMAN, R.J., RODGERS, R.J. Characterization of the translated products of the alternatively spliced luteinizing hormone receptor in the ovine ovary throughout the oestrous cycle. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v.147, p.113-24, 1999.
- BAO, B., GARVERICK, H.A., SMITH, G.W., SMITH, M.F., SALFEN, B.E., YOUNGQUIST R.S. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biol Reprod.*, v.56, p.1158-1168, 1997.
- BAO, B., GARVERICK, H.A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J. Anim. Sci.*, v.76, p.1903-21, 1998.
- BARROS, C.M., NOGUEIRA, M.F.G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, 56, p.1483-96, 2001.
- BARROS, C.M., NOGUEIRA, M.F.G. Superovulação em zebuínos de corte. In: 1º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada. Londrina. p.212-22, 2004.
- BEG, M.A., BERGFELT, D.R., KOT, K., WILTBANK, M.C., GINTHER, O.J. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biol. Reprod.*, v.64, p.432-41, 2001.
- BELLOWS, R.A., STAIGMILLER, R.B., WILSON, J.M., PHELPS, D.A., DARLING, A. Use of bovine FSH for superovulation and embryo production in beef heifers. *Theriogenology*, v.35, p.1069-82, 1991.
- BERISHA, B., SCHAMS, D., KOSMANN, M., AMSELGRUBER, W., EINSPANIER, R. Expression and localization of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. *J. Endocrinol.*, v.167, p.371-82, 2000.
- BOLAND, M.P., CROSBY, T.F., GORDON, I. Morphological normality of cattle embryos following superovulation using PMSG. *Theriogenology*, v.10, p.175, 1978.

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

CALDER, M.D., CAVENEY, A.N., SMITH, L.C., WATSON, A.J. Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation in vitro. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, v.1, p.1-12, 2003.

CALDER, M.D., CAVENEY, A.N., SIRARD, M.A., WATSON, A.J. Effect of serum and cumulus cell expansion on marker gene transcripts in bovine cumulus-oocyte complexes during maturation in vitro. *Fertil. Steril.*, v.83, p.1077-85, 2005.

CASTILHO, C., GARCIA, J.M., RENESTO, A., NOGUEIRA, G.P., BRITO, L.F.C. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Anim Reprod Sci.*, v98, p.189-196, 2007.

CHU, C-Y., RANA, T.M. Small RNAs: Regulators and Guardians of the Genome. *J Cell Physiol.* v.213, p.412-9, 2007.

DEL CAMPO, M.R., BECERRA, F., GONZALEZ, M., MURPHY, B.D., MAPLETOFT, R.J. Superovulation with three different commercial pituitary extracts in the cow. *Theriogenology*, v.33, p.208, 1990.

DIELEMAN, S.J., BEVERS, M.M., GIELEN, J.T.H. Increase of the number of ovulations in PMSG/PG-treated cows by administration of monoclonal anti-PMSG shortly after the endogenous LH peak. *Theriogenology*, v.27, p.222, 1987.

DONALDSON, L.E., WARD, D.N., GLENN, S.D. Use of porcine follicle stimulating hormone after chromatographic purification in superovulation of cattle. *Theriogenology*, v.25, p.747-57, 1989.

DONALDSON, L.E. Embryo production by SUPER-OV and FSH-P. *Theriogenology*, v.33, p.214, 1990.

DONALDSON, L.E. A comparison of FSH products. In: INTERNATIONAL WORKSHOPS OF EMBRYO TRANSFER, BIOTECHNOLOGY AND ADVANCED TECHNOLOGIES, 1, 1995, Montevideo. **Anais...** Montevideo: Universidad de la Republica, 1995. v.1, p.1-8.

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

EVANS, A.C.O., IRELAND, J.L.H., WINN, M.E., LONERGAN, P., SMITH, G.W., COUSSENS, P.M., IRELAND, J.J. Identification of genes involved in apoptosis and dominant follicle development during follicular waves in cattle. *Biol. Reprod.*, v.70, p.1475-84, 2004.

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. Reprod.*, v.50, p.225-32, 1994.

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

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

GALET, C., ASCOLI, M. The differential binding affinities of the luteinizing hormone (LH) / choriogonadotropin receptor for LH and choriogonadotropin are dictated by different extracellular domain residues. *Mol. Endocrinol.*, v.19, p.1263-76, 2005.

GIMENES, L.U., SÁ FILHO, M.F., CARVALHO, N.A.T., TORRES-JUNIOR, J.R.S., SOUZA, A.H., MADUREIRA, E.H., TRINCA, L.A., SARTORELLI, E.S., BARROS, C.M., CARVALHO, J.B.P., MAPLETOFT, R.J., BARUSELLI, P.S. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*, In Press, 2008 (disponível on line).

GINTHER, O.J., BEG, M.A., DONADEU, F.X., BERGFELT, D.R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim. Reprod. Sci.*, v.78, p.239-57, 2003.

GINTHER, O.J., BERGFELT, D.R., BEG, M.A., KOT, K. Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. *Biol. Reprod.*, v.64, p.197-205, 2001.

GINTHER, O.J., WILTBANK, M.C., FRICKE, P.M., GIBBONS, J.R., KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.*, v.55, p.1187-94, 1996.

GONG, J.G., CAMPBELL, B.K., BRAMLEY, T.A., GUTIERREZ, C.G., PETERS, A.R., WEBB, R. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biol. Reprod.*, v.55, p.68-74, 1996.

GONZALEZ, A., LUSSIER, J.G., CARRUTHERS, T.D., MURPHY, B.D., MAPLETOFT, R.J. Superovulation of beef heifers with Folltropin-V: A new FSH preparation containing reduced LH activity. *Theriogenology*, v.33, p.519, 1990.

GONZALEZ, A., WANG, H., CARRUTHERS, T.D., MURPHY, B.D., MAPLETOFT, R.J. Superovulation in the cow with pregnant mare serum gonadotrophin: effect of dose and antipregnant mare serum gonadotrophin serum. *Can. Vet. J.*, v.35, p.158-62, 1994.

GROMOLL, J., EIHOLZER, U., NIESCHLAG, E., SIMONI, M. Male hypogonadism caused by homozygous deletion of exon 10 of the luteinizing hormone (LH) receptor: differential action of human chorionic gonadotropin and LH. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.86, p.2281-2286, 2000.

GROMOLL, J., WISTUBA, J., TERWORT, N., GODMANN, M., MÜLLER, T., SIMONI, M. A new subclass of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor lacking exon 10 messenger RNA in the New World monkey (*platyrrhini*) lineage. *Biol. Reprod.*, v.69, p.75-80, 2003.

GUTIERREZ, C.G., RALPH, J.H., TELFER, E.E., WILMUT, I., WEBB, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture. *Biol Reprod*, v.62, p.1322-1328, 2000.

- HAMEL, M., DUFORT, I., ROBERT, C., GRAVEL, C., LEVEILLE, M.C., LEADER, A., SIRARD, M. A. Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. *Human Reproduction.*, p.1–10, 2008.
- HAMPTON, J.H., BADER, J.F., LAMBERSON, W.R., SMITH, M.F., YOUNGQUIST, R.S., GARVERICK, H.A. Gonadotropin requirements for dominant follicle selection in GnRH agonist-treated cows. *Reproduction*, v.127, p.695–703, 2004.
- HERRLICH, A., KÜHN, B., GROSSE, R., SCHMID, A., SCHULTZ, G., GUDERMANN, T. Involvement of G_s and G_i proteins in dual coupling of the luteinizing hormone receptor to adenyl cyclase and phospholipase C. *J. Biol. Chem.*, v.271, p.16764-72, 1996.
- HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int. Rev. Citol.*, v.124, p.43-101, 1991.
- HOCKLEY, D.K., BO, G.A., PALASZ, A.T., DEL CAMPO, M.R., MAPLETOFT, R.J. Superovulation with a single subcutaneous injection of Folltropin in the cow: effect of dose and site of injection. *Theriogenology*, v.37, p.224, 1992.
- HORVAT, R.D., NELSON, S., CLAY, C.M., BARISAS, B.G., ROESS, D.A. Intrinsically fluorescent luteinizing hormone receptor demonstrates hormone-driven aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.255, p.382-5, 1999.
- HUHTANIEMI, I. Mutations of gonadotrophin and gonadotrophin receptor genes: what do they teach us about reproductive physiology? *J. Reprod. Fertil.*, v.119, p.173-86, 2000.
- HUNZICKER-DUNN, M., BARISAS, G., SONG, J., ROESS, D.A. Membrane organization of luteinizing hormone receptors differs between actively signaling and desensitized receptors. *J. Biol. Chem.*, v.278, p.42744-9, 2003.
- HYTTEL, P., FAIR, T., CALLESEN, H., GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, v.47, p.23-32, 1997.
- JUENGEL, J.L., BONDENSTEINER, D.A., HEATH, N.L., HUDSON, N.L., MOELLER, C.L., SMITH, P., GALLOWAY, S.M., DAVIS, G.H., SAWYER, H.R.,

- MACNATTY, K.P. Physiology of GDF9 and BMP15 signaling molecules. *Anim Reprod Sci*, v.82-83, p.447-460, 2004.
- KAWATE, N., TAMADA, H., INABA, T., SAWADA, T. Expression of a cloned full-length cDNA encoding bovine luteinizing hormone receptor in COS-7 cells. *J. Reprod. Dev.*, v.48, p.531-8, 2002.
- KAWATE, N. Studies on the regulation of expression of luteinizing hormone receptor in the ovary and the mechanism of follicular cyst formation in ruminants. *J. Reprod. Dev.*, v.50, p.1-8, 2004.
- LAREAU, L.F., GREEN, R.E., BHATNAGAR, R.S., BRENNER, S.E. The evolving roles of alternative splicing. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, v.14, p.273-82, 2004.
- LAUE, L., CHAN, W-Y., HSUEH, A.J.W., KUDO, M., HSU, S.Y., WU, S.M., BLOMBERG, L., CUTLER JR., G.B. Genetic heterogeneity of constitutively activating mutations of the human luteinizing hormone receptor in familial male-limited precocious puberty. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.92, p.1906-10, 1995.
- LEWIN, B. Genes VIII. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall, Pearson Education, Inc., 2004. chap.2; chap.28.
- LICHT, P., VON WOLFF, M., BERKHOLZ, A., WILDT, L. Evidence for cycle-dependent expression of full-length human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor mRNA in human endometrium and deciduas. *Fertil. Steril.*, v.79, p.718-23, 2003.
- MANIKKAM, M., CALDER, M.D., SALFEN, B.E., YOUNGQUIST, R.S., KEISLER, D.H., GARVERICK, H.A. Concentrations of steroids and expression of messenger RNA for steroidogenic enzymes and gonadotropin receptors in bovine ovarian follicles of first and second waves and changes in second wave follicles after pulsatile LH infusion. *Anim. Reprod. Sci.*, v.67, p.189-203, 2001.
- MATTICK, J.S. Páginas ocultas no livro da vida. *Sci. Am. Bras.*, v.30, p.55-61, 2004.

- MAZERBOURG, S., ZAPF, J., BAR, R.S., BRIGSTOCK, D.R., MONGET, P. Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 proteolytic degradation in bovine, equine, and porcine preovulatory follicles: Regulation by IGFs and heparin-binding domain-containing peptides. *Biol. Reprod.*, v.63, p.390-400, 2000.
- MAZERBOURG, S., OVERGAARD, T.M., OXVIG, C., CHRISTIAMSEN, M., CONOVER, A.C., LAURENDEAU, I., VIDAND, M., TOSSER-KLOPP, G., ZAPF, J., MONGET, P. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) in ovine, bovine, porcine and equine ovarian follicles: involvement in IGF binding protein-4 proteolytic degradation and mRNA expression during follicular development. *Endocrinology*, v.142, p.5243-53, 2001.
- MEIRELLES, F.V. ROSA, A.J.M., LOBO, B.R. Is the American Zebu really *Bos indicus*? *Genetics and Molecular Biology*, v.22, p.543-547, 1999.
- MENON, K.M.J., MUNSHI, U.M., CLOUSER, C.L., NAIR, A.K. Regulation of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor expression: a perspective. *Biol. Reprod.*, v.70, p.861-6, 2004.
- MENON, K.M.J., NAIR, A.K., WANG, L. A novel post-transcriptional mechanism of regulation of luteinizing hormone receptor expression by an RNA binding protein from the ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.246, p.135-141, 2006.
- MIHM, M., AUSTIN, E.J., GOOD, T.E.M., IRELAND, J.L.H., KNIGHT, P.G., ROCHE, J.F., IRELAND, J.J. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. *Biol. Reprod.*, v.63, p.811-19, 2000.
- MIHM, M., BLEACH, E.C.L. Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.78, p.217-37, 2003.
- MONNIAUX, D., HUET, C., BESNARD, N., CLÉMENT, F., BOSC, M., PISSELET, C., MONGET, P., MARIANA, J.C. Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. *J. Reprod. Fertil.*, Suppl.51, p.3-23, 1997a.
- MONNIAUX, D., MONGET, P., BESNARD, N., HUET, C., PISSELET, C. Growth factors and antral follicular development in domestic ruminants. *Theriogenology*. v.47, p.3-12, 1997b.

- MÜLLER, T., GROMOLL, J., SIMONI, M. Absence of exon 10 of the human luteinizing hormone (LH) receptor impairs LH, but not human chorionic gonadotropin action. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.88, p.2242-9, 2003.
- NAIR, K.A., MENON, K.M.J. Regulation of Luteinizing Hormone Receptor Expression - evidence of translational suppression in vitro by a hormonally regulated mRNA-binding protein and its endogenous association with Luteinizing Hormone receptor mRNA in the ovary. *The Journal of Biological Chemistry*, v.280, n.52, p.42809-16, 2005.
- NAKAMURA, K., YAMASHITA, S., OMORI, Y., MINEGISHI, T. A splice variant of the human luteinizing hormone (LH) receptor modulates the expression of wild-type human LH receptor. *Mol. Endocrinol.*, v.18, p.1461-70, 2004.
- NOGUEIRA, M.F.G, BARROS, B.J.P., TEIXEIRA, A.B. TRINCA, L.A., D'OCCHIO, M.J., BARROS, C.M. Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of ovulation and fixed insemination in superstimulated beef cows. *Theriogenology*, v.57, p.1645-34, 2002.
- NOGUEIRA, M.F.G., BURATINI Jr, J., BARROS, C.M. Tratamento com hCG e LH, como indutores da ovulação em doadoras superestimuladas da raça Nelore, não altera a produção embrionária ou a taxa de prenhez. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33, p.263, 2005.
- NOGUEIRA, M.F.G., BURATINI Jr, J., PRICE, A.C.S., CASTILHO, M.G.L., BARROS, C.M. Expression of LH Receptor mRNA Splice Variants in Bovine Granulosa Cells: Changes With Follicle Size and Regulation by FSH In Vitro. *Mol. Reprod. and Development*. v.74, p.680–686, 2007.
- NOGUEIRA, M.F.G., BARROS, C.M. Timing of ovulation in Nelore cows superstimulated with P36 protocol. *Revista Acta Scientiae Veterinariae*, 2003, v.31 (supl.) p.509.
- PIERCE, K.L., PREMONT, R.T., LEFKOWITZ, R.J. Seven-transmembrane receptors. *Mol. Cell Biol.*, v.3, p.639-50, 2002.

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

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

ROBERT, C., GAGNÉ, D., LUSSIER, J.G., BOUSQUET, D., BARNES, F.L., SIRARD, M.A. Presence of LH receptor mRNA in granulosa cells as a potential marker of oocyte developmental competence and characterization of the bovine splicing isoforms. *Reproduction*, v.125, p.437-46, 2003.

RODBARD, D. Statistical Quality Control and Routine Data Processing for Radioimmunoassays and Immunoradiometric Assays. *CUN. CHEM.* V.20/10, p.1255-1270, 1974.

ROESS, D.A., BRADY, C.J., BARISAS, B.G. Biological function of the LH receptor is associated with slow receptor rotational diffusion. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1464, p.242-50, 2000a.

ROESS, D.A., HORVAT, R.D., MUNNELLY, H., BARISAS, B.G. Luteinizing hormone receptors are self-associated in the plasma membrane. *Endocrinology*, v.141, p.4518-23, 2000b.

ROESS, D.A., SMITH, S.M.L. Self-association and raft localization of functional luteinizing hormone receptors. *Biol. Reprod.*, v.69, p.1765-70, 2003.

SARTORELLI, E.S., CARVALHO, L.M., BERGFELT, D.R., GINTHER, O.J., BARROS, C.M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology*, v.63, p.2382-94, 2005.

SARTORI, R., FRICKE, P.M., FERREIRA, J.C.P., GINTHER, O.J., WILTBANK, M.C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol. Reprod.*, v.65, p.1403-9, 2001.

SAUNDERS, J., WILMOTT, N., PALASZ, A., MAPLETOFT, R.J. Dose titration of Follitropin in the cow. *Theriogenology*, v.33, p.319, 1990.

- SHEMESH, M. Actions of gonadotrophins on the uterus. *Reproduction*, v.121, p.835-42, 2001.
- SIMÕES, R.A.L., ROSA, F.S., PIAGENTINI, M., SATRAPA, R.A., ERENO, R.L., NABHAN, T., TRINCA, L.A., NOGUEIRA, M.F.G., BARROS, C.M. Correlação entre diâmetro folicular e taxa de ovulação em vacas nelore tratadas com LH. *Acta Scientiae Veterinariae*, SBTE (resumo), 2008 (*in press*).
- SIRARD, M.A., RICHARD, F., BLONDIN, P., ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, v.65, p.126-136, 2006.
- SOUMANO, K., LUSSIER, J.G., PRICE, C.A. Levels of messenger RNA encoding ovarian receptors for FSH and LH in cattle during superovulation with equine chorionic gonadotrophin versus FSH. *J. Endocrinol.*, v.156, p.373-8, 1998.
- STOCK, A.E., ELLINGTON, J.E., FORTUNE, J.E. A dominant follicle does not affect follicular recruitment by superovulatory doses of FSH in cattle but can inhibit ovulation. *Theriogenology*, v.45, p.1091-1102, 1996.
- TRIBULO, H., JOFRE, F., CARCEDO, J., ALONSO, A., TRIBULO, R., BO, G.A. Superovulation in *Bos indicus* cattle with a single subcutaneous injection of commercial pituitary extracts. *Theriogenology*, v.39, p.331, 1993.
- VAN de LEEMPUT, E.E., VOS, P.L.A., HYTTEL, P., VAN, den HURK, R., BEVERS, M.M., VEN der WEIJDEN, G.C., DIELEMAM, S.J. Effects of bried postponement of the preovulatory LH surge on ovulation rates and embryo formation in eCG/prostaglandin-treated heifers. *Theriogenology*, v.55, p.573-92, 2001.
- VAN den HURK, R., BEVERS, M.M., BECKERS, J.F. In-vivo and in-vitro development of preantral follicles. *Theriogenology*, v.47, p.73-82, 1997.
- VOS P.L.A.N., et al. Does postponement of preovulatory LH surge on ovulation rates and embryo yiel in superovulated holtein heifers? *Theriogenology*, v.43, p.344, 1995.

WANG, L., NAIR, A.K., MENON, K.M.J., Ribonucleic Acid Binding Protein-Mediated Regulation of Luteinizing Hormone Receptor Expression in Granulosa Cells: Relationship to Sterol Metabolism. *Molecular Endocrinology*, v.21, p. 2233–41, 2007.

WEBB, R.J., BAINS, H., CRUTTWELL, C., CARROLL, J. Gap-junctional communication in mouse cumulus-oocyte complexes: implications for the mechanism of meiotic maturation. *Reproduction*, v.123, p.41-52, 2002.

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

WILSON, J.M., JONES, A.L., MOORE, K., LOONEY, C.R., BONDIOLI, K.R. Superovulation of cattle with a recombinant-DNA bovine follicle stimulating hormone. *Anim. Reprod. Sci.*, v.33, p.71-82, 1993.

XU, Z., GARVERICK, H.A., SMITH, G.W., SMITH, M.F., HAMILTON, S.A., YOUNGQUIST, R.S. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol. Reprod.*, v.53, p.951-7, 1995.

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

10 TRABALHO CIENTÍFICO ENVIADO PARA A REVISTA CIÊNCIA RURAL.

Expressão dos transcritos do LHR em células da granulosa de fêmeas Nelore submetidas ou não à superestimulação ovariana.

Expression of LHR isoforms in granulosa cells of Nelore females submitted or not to ovarian superstimulation.

Paulo Fernandes², Ronaldo Luis Ereno^I, Rafael Augusto Satrapa^V, Mariana Fernandes Machado^{II}, Ana Cláudia Zanotto Barcelos^V, Andrey Borges Teixeira^{III}, José Buratini Junior^{II}, Luzia Aparecida Trinca^{IV} e Ciro Moraes Barros^V.

Resumo

Objetivou-se com o presente trabalho avaliar a expressão das isoformas (M1 a M4) do receptor de LH (LHR) em células da granulosa de folículos $\geq 8,5$ mm de diâmetro obtidos de novilhas cíclicas (grupo NC) ou de vacas superestimuladas (grupo VSE), na raça Nelore. As novilhas cíclicas (n=4) foram submetidas à sincronização da ovulação e em seguida monitoradas por ultra-sonografia transretal, até serem abatidas no terceiro ou quinto dia após a ovulação. As vacas do grupo VSE (n=5) foram submetidas à superestimulação. A expressão das isoformas do LHR (M1 a M4) foram calculados

^I Doutorando do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.

^{II} Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil.

^{III} Faculdade de Medicina Veterinária, Faculdades Integradas de Ourinhos (FIO), Ourinhos, São Paulo, Brasil.

^{IV} Departamento de Bioestatística, Instituto de biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil,

^V Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil. Endereço: Distrito de Rubião Júnior, sn, Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil, CEP: 18618-000, e-mail: cmbarras@ibb.unesp.br

como valores relativos à expressão do GAPDH. Verificou-se menor expressão do gene do LHR no grupo VSE quando comparado ao grupo NC ($6,5 \pm 0,35$ e $28,96 \pm 0,4$, respectivamente; Bonferroni, $p < 0,02$). Quando os dados dos grupos NC e VSE foram analisados conjuntamente, obteve-se maior expressão das isoformas M1 ($27,22 \pm 0,19$) e M3 ($28,37 \pm 0,22$) quando comparadas com as isoformas M2 ($6,46 \pm 0,38$) e M4 ($5,05 \pm 0,43$, Bonferroni, $p < 0,02$). No grupo NC, a expressão do LHR foi mais intensa nos folículos coletados no quinto dia (12 mm de diâmetro, $38,1 \pm 0,03$) quando comparados aos obtidos no terceiro dia (8,75 mm, $22,6 \pm 0,03$, Bonferroni, $p < 0,01$) após a ovulação. Estes resultados são indicativos de que o tratamento superestimulatório com Folltropin® em vacas Nelore diminui a expressão do LHR nas células da granulosa, aumenta as concentrações intrafolliculares de progesterona, reduz a razão E_2/P_4 , e que a expressão das isoformas M1 e M3 é mais abundante do que as M2 e M4 tanto nas novilhas cíclicas quanto nas vacas superestimuladas.

Palavras chave: folículos, Nelore, LHR, superovulação, expressão gênica, *Bos indicus*.

Abstract

The aim of the present work was to evaluate in the Nelore breed the gene expression of LH receptor isoforms (M1 to M4) in granulosa cells of follicles ≥ 8.5 mm diameter from cycling heifers (CH) and superstimulated cows (SC). The cycling heifers ($n=4$) were submitted to synchronization of ovulation and afterwards evaluated by transrectal ultrasonography until the third and fifth days after ovulation, when the animals were slaughtered to obtain the ovaries and follicles. The SC group ($n=5$) were submitted to ovarian superstimulation (modified Protocol P-36) and ovariectomized 36 hours after removal of progesterone source. There was a lower expression of LH receptor gene in SC group as compared to CH group (6.50 ± 0.35 and 28.96 ± 0.40 , respectively, Bonferroni, $p < 0.02$). When data of both groups were analyzed together, there was a higher expression of M1 (27.22 ± 0.19) and M3 (28.37 ± 0.22) isoforms when compared to M2 (6.46 ± 0.38) and M4 (5.05 ± 0.43 , Bonferroni, $p < 0.02$). In CH group, LHR expression was more intense in follicles obtained in the fifth day (12 mm diameter, 38.1 ± 0.03) when compared to those obtained on third day (8.75 mm, 22.6 ± 0.03 , Bonferroni, $p < 0.01$) after ovulation. The results indicated that superstimulatory treatment with FSH in Nelore cows decreased LH receptor expression in granulosa cells, it increased the concentrations progesterone intrafolliculares, it reduced the reason

E₂/P₄, and that M1 and M3 isoforms expression were more abundant than M2 and M4 in both cycling and superstimulated animals.

Key words: follicles, Nelore, LHR, superovulation, gene expression, *Bos indicus*

Introdução

Animais de raças zebuínas (*Bos indicus*) constituem a maior parte do rebanho bovino de corte criado em regiões tropicais, devido a sua melhor adaptabilidade, maior tolerância ao estresse calórico e resistência à parasitas quando comparados aos *Bos taurus*. No Brasil, entre as raças de corte, a Nelore é a que possui maior contingente (mais de 100 milhões de cabeças; ACNB, 2008), sendo considerada o alicerce da cadeia produtiva da pecuária de corte. Pesquisas na área de fisiologia da reprodução poderão gerar informações importantes para as biotécnicas reprodutivas, promovendo incremento na produtividade e no ganho genético desta raça bovina.

Na dinâmica folicular de espécies monovulatórias, ocorre desvio de diâmetro e seleção de apenas um folículo que continua crescendo (dominante) enquanto os demais (subordinados) sofrem atresia. Estudos têm demonstrado que o desvio folicular ocorre quando o folículo atinge diâmetro de 5,4 a 5,7 mm em novilhas Nelore (SARTORELLI et al., 2005; CASTILHO et al., 2007; ERENO, 2008), 6,1 mm em vacas Nelore (SARTORELLI et al., 2005) ou 8,5 mm em novilhas Holandesas (GINTHER et al., 1996 e 2003). A expressão do LHR (receptor do hormônio luteinizante), em novilhas da raça Holandesa, foi detectada nas células da granulosa de folículos ≥ 8 mm (BAO et al. 1997; BEG et al. 2001), cerca de 8 horas antes do desvio folicular (BEG et al. 2001). Estes achados proporcionaram a BEG et al. (2001) e GINTHER et al. (2001), sugerirem que o início da expressão do LHR nas células da granulosa seria a causa para a seleção e consequentemente para a aquisição da dominância folicular. Entretanto, FORTUNE et al. (2001), utilizando hibridização *in situ*, e ERENO (2008) utilizando RT-PCR semiquantitativo, não detectaram a expressão do LHR no folículo dominante, imediatamente antes da seleção folicular. Recentemente, NOGUEIRA et al. (2007), e ERENO (2008), verificaram que a expressão do LHR em células da granulosa ocorre entre 7 e 8 mm de diâmetro folicular em fêmeas da raça Nelore. Portanto, estes autores não corroboram com a hipótese de que a expressão do LHR em células da granulosa ocorra antes do desvio folicular e sim depois. Apesar desta controvérsia, o fato é que o hormônio luteinizante, ao fazer a ligação com o LHR, influencia várias atividades como a esteroidogênese, o crescimento folicular, a maturação oocitária, a ovulação e a

formação do corpo lúteo, essenciais para a função reprodutiva das fêmeas (HYTTEL et al., 1997). Portanto, a expressão do LHR é essencial para a foliculogênese entre as fases de aquisição de dominância folicular e ovulação (BEG et al., 2001; GINTHER et al., 2001; SARTORI et al., 2001).

A inseminação artificial, a indução de ovulações múltiplas para a produção e transferência de embriões e a produção de embriões *in vitro* são biotécnicas da reprodução que atualmente têm proporcionado à pecuária de corte Nacional, ganhos expressivos no melhoramento genético do gado zebuino. Infelizmente a variabilidade de resposta das doadoras de embriões aos tratamentos superovulatórios com gonadotrofinas, continua sendo um dos grandes problemas nos protocolos comerciais da transferência de embriões, apesar das diversas pesquisas envolvendo esta biotécnica (BARROS & NOGUEIRA, 2001). Mediante novos conhecimentos sobre o papel biológico do LHR, pode-se aventar utilizações dos transcritos do LHR para maximizar a ação dos fármacos indutores da ovulação e do desenvolvimento final do folículo ovariano. Portanto, uma melhor compreensão sobre a expressão das isoformas do LHR nas células da granulosa durante o desenvolvimento folicular ovariano, tanto sob condições fisiológicas quanto sob tratamentos com hormônios gonado-estimulantes, pode ser fundamental para o progresso da biotecnologia reprodutiva capaz de otimizar a exploração do material genético de fêmeas zebuínas. Neste contexto, a presente pesquisa avalia a hipótese de que a superestimulação ovariana com hormônios gonadotróficos (FSH+LH) reduz a expressão do LHR nas células da granulosa. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão das isoformas do LHR em células da granulosa de folículos $\geq 8,5$ mm obtidos de novilhas cíclicas ou de vacas superestimuladas.

Material e Métodos

Animais e tratamentos

O primeiro experimento foi realizado com vacas Nelore cíclicas (4 a 5 anos, n=5). As vacas foram mantidas em pastagem de *Panicum maximum* cultivar Tanzânia, com suplementação de sal mineralizado *ad libitum* e acesso irrestrito a água. As vacas foram submetidas a um protocolo de sincronização da ovulação, para que, todos os animais tivessem corpo lúteo em um de seus ovários no dia zero do protocolo de superestimulação ovariana (grupo VSE). No dia zero (d0) do protocolo de sincronização da ovulação, as vacas receberam um dispositivo intravaginal contendo progesterona (1,0

g, DIB[®], Syntex, Argentina) e 2,5 mg de benzoato de estradiol (BE, via IM, RIC-BE[®], Tecnopec, São Paulo, Brasil). No d8 foi administrado PGF₂ α (150 mg de d-cloprostenol, Prolise[®], Tecnopec, São Paulo, Brasil, via IM, 07h00min), e o DIB[®] foi removido 12 horas após a aplicação da PGF₂ α . No d9 foi aplicado 1,0 mg de BE (via IM, RIC-BE[®], Tecnopec, São Paulo, Brasil). A superestimulação ovariana foi iniciada oito dias após a segunda dose de BE, e no dia zero (d0), as vacas receberam um dispositivo intravaginal contendo progesterona (1,0 g, DIB[®], Syntex, Argentina) e 2,5 mg de benzoato de estradiol (via IM, RIC-BE[®], Tecnopec, São Paulo, Brasil). No d5 foi iniciada a administração de pFSH (dose total de 130 mg, Folltropin[®], Leivas Leite, Brasil) em doses decrescentes, duas vezes ao dia, durante 4 dias. No d7 foi administrado um análogo da PGF₂ α (150 mg de d-cloprostenol, Prolise[®], Tecnopec, São Paulo, Brasil, via IM, 07h00min), e o DIB[®] foi removido 36 horas após a aplicação da PGF₂ α . As vacas foram submetidas à ovariectomia no d10, 36 horas após a remoção do DIB[®], para obtenção de amostras de células da granulosa dos folículos ≥ 10 mm de diâmetro.

O segundo experimento foi realizado com novilhas cíclicas (grupo NC) da raça Nelore (n=4, ± 24 meses de idade), que foram mantidas em pasto de *Cynodon dactylon* cv. coast-cross e suplementadas com sal mineralizado *ad libitum* e com acesso irrestrito a água. As novilhas foram submetidas à sincronização da ovulação com o mesmo protocolo descrito para o grupo VSE. O momento da ovulação foi calculado como sendo a média entre a última vez que o folículo ovulatório foi visto e a primeira ocasião em que o mesmo não foi detectado no ultra-som. As novilhas foram abatidas no terceiro (n=2) ou quinto (n=2) dia após a ovulação, para obtenção de amostras de células da granulosa dos folículos $\geq 8,5$ mm de diâmetro.

Dissecação dos folículos e obtenção do fluido folicular

Os ovários foram acondicionados em sacos plásticos contendo solução fisiológica a 4°C, colocados em uma caixa térmica e levados aos laboratórios, onde foram avaliados para verificar a presença de corpo lúteo ou de ovulações prévias. Os folículos foram dissecados e o diâmetro (comprimento/altura) de cada folículo foi mensurado com paquímetro. O fluido folicular foi aspirado com seringa de 1 mL e congelado em freezer (Forma Scientific[®]) a -80°C para posterior análise das concentrações de estradiol e progesterona por radioimunoensaio.

Isolamento das células da granulosa e extração do RNA total

Após aspiração do fluido folicular, uma solução fisiológica estéril foi repetidamente injetada e retirada da cavidade folicular, para recuperação das células granulosas murais. A solução foi centrifugada (900 g por 15 segundos) para concentrar as células e remover a solução fisiológica. O sedimento de células resultante foi imerso em 1 mL de solução Trizol[®], homogeneizado (Polytron – UltraTurrax/T-25) por 1 minuto e congelado a -80°C para posterior extração de RNA total, que foi mensurada por espectrofotometria (Biophotometer-Eppendorf[®]). As amostras foram descongeladas, e adicionou-se 200µL de clorofórmio nos tubos contendo o RNA com 1mL de Trizol[®]. Após 15 segundos de agitação, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 2,5 minutos e centrifugadas a 7.300g por 15 minutos a 4°C. O clorofórmio foi utilizado para separar a amostra em duas fases: uma orgânica e outra inorgânica. Um halo branco foi formado por proteínas e um rosa por DNA. O RNA total ficou solubilizado na fase inorgânica. Na etapa de precipitação do RNA total, a fase inorgânica foi transferida para tubo de polipropileno (1,5 mL – Eppendorf[®]), acrescida de 0,5 mL de álcool isopropílico e incubada à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida a solução foi centrifugada a 7.300g durante 10 minutos à 4°C, formando um sedimento. O sobrenadante foi removido e o RNA foi lavado com 1 mL de etanol a 75% e novamente centrifugado a 7.300g por 5 minutos a 4°C. Após a retirada do excesso de líquido do tubo com auxílio de uma pipeta, o RNA foi dissolvido em 10 µL de água GIBCO[®] e incubado por 10 minutos à 60°C (Bloco aquecedor – Thermolyne Type 17600[®]) para finalmente ser armazenado a -80°C. A expressão LHR foi investigada nas amostras células da granulosa por reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), utilizando como controle interno, a expressão do gene constitutivamente expresso: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH - S 5`tgt tcc agt atg att cca ccc 3'; A 5'tcc acc acc ctg ttg ctg 3'; 850 pb). Antes da reação de transcrição reversa, a fim de evitar que contaminação com DNA genômico interferisse nos resultados, amostras de 1µg de RNA foram incubadas com DNase (Invitrogen[®]). O RNA total foi transferido para o microtubo estéril, onde se acrescentou 1 µL de tampão (Buffer Kit DNase), 1 µL de DNase I (1 U/µL) e água destilada tratada com DEPC e autoclavada na quantidade suficiente para completar 10 µL de solução. Essa solução permaneceu em temperatura ambiente por 15 minutos e, em seguida, foi acrescida de 1 µL de EDTA (25 mM) e incubada a 65°C por 10 minutos. Após a incubação, as

amostras foram transferidas para cuba contendo gelo e imediatamente submetidas à reação de transcrição reversa.

Reação de transcrição reversa

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

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do cDNA do LHR foram delineados com base na sequência para o gene bovino disponível no GenBank (acesso U20504). O oligonucleotídeo iniciador “sense” foi posicionado no éxon 9 e o “anti-sense” no éxon 11, a fim de amplificar estas regiões do LHR (S 5’aaa ctt gcc aac aaa cga 3’; A 5’ata gca agt ctt gtc cag ga 3’). As isoformas do LHR pesquisadas foram: M1 (forma completa do gene - “full length”, 1240 pb), M2 (deleção do éxon 10; 1159 pb), M3 (deleção do éxon 11; 975 pb) e M4 (deleção do éxon 10 e parte do éxon 11; 894 pb). A fim de detectar a contaminação das amostras de células da granulosa com células da teca, investigou-se a expressão da 17α hidroxilase (S 5’gaa tgc ctt tgc cct gtt ca3’; A 5’cgc gtt tga aca caa ccc tt3’; 330 pb), enzima característica das células da teca. As amostras contaminadas foram descartadas do experimento. Para a amplificação desses genes pela PCR utilizou-se o protocolo TaqDNA Polimerase Invitrogen®. Ao produto (cDNA) 0,5 uL foi acrescido: 2,5µL de tampão PCR 10X (fornecido no Kit - Invitrogen®); 0,75µL de MgCl₂ (50mM); 0,5µL de dNTP Mix (0,2mM); oligonucleotídeos iniciadores “sense” e “antisense”; 1,25uL de Platinum Taq DNA polimerase; água destilada autoclavada para completar 25µL. Na sequência, as amostras foram desnaturadas a 94°C por 3 minutos no termociclador (MJ Research PTC 200®). As temperaturas e tempos de desnaturação, anelamento e extensão, específicas para

cada gene foram descritas por Nogueira et al., (2007). O número de ciclos foi aumentado de 29 para 32.

Eletroforese

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese (100V por 4 horas) em gel de agarose a 3,0% em tampão Buffer. O gel foi corado por brometo de etídio (1µg/mL) por 30 minutos. O “DNA Ladder 100bp” (Invitrogen®) foi utilizado como referência para avaliar o tamanho dos fragmentos amplificados. As imagens dos géis foram visualizadas mediante exposição do gel à luz UV e digitalizados no equipamento ImageMaster (Pharmacia Biotech®) para posterior análise por densitometria das bandas.

Dosagem de estradiol (E₂) e de progesterona (P₄) no fluido folicular

No radiomunoensaio para dosagem de E₂ e P₄ foram utilizados os Kits DSL-4400 e DSL-3400, respectivamente (Diagnostic Systems Laboratories®, Inc., Webster, Texas-USA), além de uma curva padrão específica e construída a partir de E₂ ou de P₄ liofilizada (Sigma®), respectivamente. O intervalo das concentrações de E₂ utilizado na curva padrão foi de 0,031 a 500 pg/tubo de 100µL). As diluições utilizadas para o fluido folicular foi de 1:10 e de 1:1000 para as dosagens de P₄ e E₂, respectivamente. As concentrações de E₂ no fluido folicular foram determinadas, em único ensaio, e o coeficiente de variação intra-ensaio foi de 4,4%, com limite de detecção de 2,3 pg/mL com “binding” de 90%. O intervalo das concentrações de progesterona utilizado na curva padrão foi de 3,9 a 1000 pg/tubo. As concentrações de P₄ no fluido folicular foram determinadas, em único ensaio, e o coeficiente de variação intra-ensaio foi de 8,0%, com limite de detecção de 144 pg/mL com “binding” de 90%.

Estatística

Para comparar os grupos (NC vs. VSE) e as expressões das isoformas de LHR (M1, M2, M3 e M4) nos grupos de novilhas ciclando (NC) e de vacas superestimuladas (VSE) usou-se a análise de variância para medidas repetidas no mesmo animal (PROC MIXED do SAS). Para as comparações múltiplas entre as várias médias de interesse usou-se a correção de Bonferroni no valor p da estatística t. Para avaliar o efeito de tamanho de folículos e da razão E₂/P₄ sobre as expressões das isoformas do LHR, também usou-se a análise de medidas repetidas incluindo tamanho folicular e razão E₂/P₄ como co-variáveis, porém a análise foi separada por grupo. As comparações entre as médias de estradiol, progesterona e razão E₂/P₄, entre os grupos experimentais, foram realizadas através do test-t.

Resultados e Discussão

Ao analisar a expressão do gene para o LHR entre os grupos VSE e NC, verificou-se menor expressão do gene para o LHR no grupo de vacas superestimuladas com Folltropin[®] ($6,50 \pm 0,35$ vs. $28,96 \pm 0,40$, $p < 0,02$, Bonferroni). A detecção da expressão das isoformas M1 e M3 foi de 100% nas amostras dos dois grupos, enquanto que as isoformas M2 e M4 diferiram entre as amostras dos grupos NC (100% de expressão) e VSE (30% e 25%, respectivamente, caracterizando um padrão distinto de expressão do LHR nos grupos NC e VSE. No protocolo superestimulatório, ao ser utilizado a dose total de 130 mg de FSH (Folltropin[®]), também foi administrado ± 25 mg de LH, pelo fato deste produto comercial ter uma razão FSH:LH de 5,25:1. Hipoteticamente, este LH pode ter ativado a via de sinalização que induz à síntese de mevalonato quinase (MVK), promovendo uma “down regulation” parcial na expressão do LHR, de acordo com o modelo proposto por MENON et al., (2006) e WANG et al., (2007). Além disso, os folículos foram obtidos 36 horas após o tratamento superestimulatório, período em que já poderia ter ocorrido pico endógeno de LH (cerca de 12 horas antes da ovariectomia), o que pode ter incrementado a “down regulation”, provocada pelo LH exógeno. SOUMANO et al. (1998), avaliaram a expressão de FSHR e LHR em folículos obtidos de novilhas da raça Holandesa, após superestimulação com eCG (Folligon[®]) ou FSH (Folltropin[®]). De forma similar, os autores aventaram a hipótese de que o eCG possa ter provocado uma “down-regulation” na expressão do FSHR e do LHR nas células foliculares, tendo-se em vista a maior atividade de LH do Folligon[®], comparado ao do Folltropin[®]. É importante destacar que esta supressão na expressão do LHR não compromete a ovulação (no protocolo utilizado) na superestimulação ovariana, como têm sido verificado por vários autores.

Tanto o diâmetro folicular como a razão E_2/P_4 não influenciaram significativamente a expressão das isoformas do LHR nos grupos NC e VSE ($p > 0,20$). Os folículos dos grupos VSE e NC apresentaram concentrações intrafoliculares médias de E_2 iguais a $176,7 \pm 82,9$ e $134,8 \pm 33,9$, respectivamente ($p > 0,3$, teste-t). A concentração média de P_4 foi significativamente maior no grupo VSE quando comparado ao NC ($108,6 \pm 35,35$ vs. $26,72 \pm 11,2$ ng/mL, respectivamente, $p < 0,04$, teste-t), enquanto que a razão E_2/P_4 média foi maior no grupo NC comparado ao VSE ($6,17 \pm 1,6$ vs $1,94 \pm 0,49$, respectivamente, $p < 0,03$, teste-t). Ao entrar em atresia, os folículos apresentam progressivamente maiores concentrações intrafoliculares de

progesterona. Desse modo, uma alta concentração de 17β -estradiol aliada a baixos níveis de progesterona no fluido folicular seria uma das formas de identificar folículos estradiol-ativos, antes de entrar em atresia, o que está de acordo com a metodologia utilizada neste experimento para a seleção dos folículos $\geq 8,5$ mm no grupo NC, ou seja, folículos com razão $E_2/P_4 > 1$. No grupo VSE, os folículos que expressaram LHR foram obtidos 36 horas após a superestimulação ovariana com Folltropin[®], e apresentaram uma razão E_2/P_4 de apenas $1,94 \pm 0,49$, demonstrando que a superestimulação ovariana alterou a esteroidogênese folicular, promovendo aumento significativo nos níveis médios de progesterona ($108,6 \pm 35,3$ ng/mL no grupo VSE vs. $26,72 \pm 11,2$ ng/mL no grupo NC), sem alteração da síntese de estradiol de forma significativa. A partir destes dados, pode-se inferir que o tratamento superestimulatório promoveu uma redução nos valores para a razão E_2/P_4 , devido a um aumento na síntese de progesterona pelos folículos superestimulados com Folltropin[®]. Por outro lado, HAMPTON et al. (2004) verificaram que o tratamento de vacas holandesas com FSH em doses basais reduziu os níveis intrafoliculares de estradiol em 36% (em folículos ≥ 10 mm de diâmetro) em relação ao grupo controle (folículos obtidos no quinto dia após o estro sincronizado). O FSH associado ao LH promoveu incremento na atividade esteroidogênica das células da granulosa, tanto para o estradiol quanto para progesterona, o que difere dos resultados obtidos neste experimento na qual a associação do FSH (130 mg) com o LH (25 mg, Folltropin[®]) aumentou significativamente somente os níveis intrafoliculares de progesterona. Hipoteticamente o LH pode ter induzido os folículos pré-ovulatórios à uma luteinização precoce, o que pode explicar, em parte, o aumento expressivo nos níveis de progesterona no fluido folicular no grupo VSE.

Ao investigar-se a região compreendida entre os finais dos éxons 9 e 11 do LHR, em células da granulosa de folículos obtidos de novilhas ($\geq 8,5$ mm de diâmetro) ou de vacas Nelore (≥ 10 mm), detectou-se no presente estudo quatro isoformas do LHR (forma completa, e as isoformas com deleção do éxon 10 e/ou parcial do éxon 11), corroborando com os dados descritos por ABDENNEBI et al. (2002) em ovinos, por ROBERT et al. (2003) em taurinos, e por NOGUEIRA et al. (2007) em vacas aneloradas, que utilizou oligonucleotídeos iniciadores específicos para amplificar o fragmento entre o final da região extracelular e o final da intracelular do LHR.

As funções dos transcritos alternativos do LHR ainda são desconhecidos. Apesar da isoforma com deleção do éxon 10 ser transportada e posicionada na membrana

celular, GROMOLL et al. (2000) e MÜLLER et al. (2003), verificaram que a deleção do éxon 10 resultou num LHR com afinidade diminuída ao LH em relação à hCG. Posteriormente, NOGUEIRA et al. (2005), utilizaram LH e hCG com o intuito de promover a ativação das isoformas de LHR presentes na superfície celular (forma completa e/ou isoforma com deleção do éxon 10). Entretanto, os autores não observaram diferença significativa na produção total de embriões viáveis após tratamento de doadoras de embriões com LH ou LH+hCG, o que não permitiu aos autores inferir qualquer função para a isoforma com deleção do éxon 10.

Ao analisar os dados dos grupos experimentais em conjunto (NC e VSE), verificou-se maior expressão das isoformas M1 ($27,22 \pm 0,19$, $n=10$) e M3 ($28,37 \pm 0,22$, $n=10$), quando comparadas com as isoformas M2 ($6,46 \pm 0,38$, $n=8$) e M4 ($5,05 \pm 0,43$, $n=7$; $p < 0,02$, Bonferroni), corroborando os resultados obtidos por NOGUEIRA et al. (2007), em vacas aneloradas. No grupo VSE, a isoforma M3 foi numericamente mais expressa que a isoforma M1, apresentando um padrão similar de expressão ao descrito por NOGUEIRA et al. (2007), quando células da granulosa foram cultivadas sob FSH (1 ou 10 ng). Em bovinos, KAWATE et al. (2002), demonstraram que houve um transporte anômalo para as isoformas com deleção parcial do éxon 11 do LHR (M3 e M4, isoformas sem a região transmembrânica e intracelular), de maneira a não atingirem a superfície celular e ficarem aprisionadas no citoplasma. Portanto, estas isoformas seriam afuncionais para os ligantes LH e hCG. Segundo ROBERT et al. (2003), e KAWATE (2004), a função da isoforma M3 aprisionada no citosol ainda é desconhecida. Entretanto, uma função de coadjuvante, na oligomerização dos complexos de LHR observados na membrana citoplasmática após a ligação com o hormônio (ROESS et al., 2000; ROESS & SMITH, 2003; HUNZICKER-DUNN et al., 2003), pode contribuir, mesmo que parcialmente, para explicar a abundância de mRNA para a isoforma M3 do LHR.

Nas novilhas cíclicas, a expressão do LHR foi mais intensa nos folículos coletados no quinto dia (12 mm) quando comparados àqueles obtidos no terceiro dia (8,75 mm) após a ovulação, corroborando com vários autores (XU et al., 1995; BAO et al., 1997; BAO & GARVERICK) que verificaram que a expressão desses receptores em células da granulosa de novilhas da raça Holandesa iniciou-se nos folículos com diâmetro superior a 8 mm, e aumentou com o tamanho do folículo, atingindo valores máximos quando o folículo dominante está próximo do seu maior diâmetro. De forma semelhante, NOGUEIRA et al. (2007), postularam que a aquisição de LHR, pelas

células da granulosa, ocorre entre 7 e 8 mm de diâmetro folicular em vacas aneloradas e aumentou com o diâmetro folicular, atingindo 88,9% de expressão nos folículos da classe de 9 a 14 mm de diâmetro. Recentemente, ERENO (2008), utilizando novilhas da raça Nelore, verificou que a expressão de LHR em células da granulosa aumentou com o diâmetro folicular, iniciando em folículos com 7 mm de diâmetro.

Conclusão

Estes resultados são indicativos de que o tratamento superestimulatório com Folltropin[®] associado ao momento de obtenção dos folículos (36 h após a retirada após tratamento), diminui a expressão do receptor de LH nas células da granulosa, aumenta as concentrações intrafoliculares de progesterona, reduz a razão E_2/P_4 e que a expressão das isoformas M1 e M3 é mais freqüente do que as M2 e M4 tanto em novilhas cíclicas quanto nas vacas superestimuladas.

Obs. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da UNESP (Botucatu, SP) e os estudos em animais foram realizados de acordo com normas éticas.

Referências Bibliográficas

ABDENNEBI, L. et al. Differences in splicing of mRNA encoding LH receptor in theca cells according to breeding season in ewes. **Reproduction**, v.123, p.819-26, 2002.

ASSOCIAÇÃO DOS CRIADORES DE NELORE DO BRASIL, 2008. Capturado em 23 jun. 2008. Online. Disponível na internet: <http://www.nelore.org.br/hgxpp001.aspx>.

AUSTIN, E.J. et al. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. **Biol. Reprod.**, v.64, p.839-48, 2001.

BAO, B. et al. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. **Biol. Reprod.**, v.56, p.1158–1168. 1997.

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

BARROS, C.M.; NOGUEIRA, M.F.G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, 56, p.1483-96, 2001.

- BEG, M.A. et al. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. **Biol. Reprod.**, v.64, p.432-41, 2001.
- CASTILHO, C. et al. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Anim. Reprod. Sci.**, v.98, p.189-196, 2007.
- ERENO, R.L. *Expressão gênica do receptor do hormônio luteinizante (LHR), em células da granulosa de folículos de novilhas Nelore antes, durante e após a divergência folicular*. 2008. 65p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- FORTUNE, J.E. et al. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biol. Reprod.**, v.65, p.648-54, 2001.
- GINTHER, O.J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biol. Reprod.**, v.55, p.1187-94, 1996.
- GINTHER, O.J. et al. Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. **Biol. Reprod.**, v.64, p.197-205, 2001.
- GINTHER, O.J. et al. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Anim. Reprod. Sci.**, v.78, p.239-57, 2003.
- GROMOLL, J. et al. Male hypogonadism caused by homozygous deletion of exon 10 of the luteinizing hormone (LH) receptor: differential action of human chorionic gonadotropin and LH. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.86, p.2281-2286, 2000.
- HAMPTON, J.H. et al. Gonadotropin requirements for dominant follicle selection in GnRH agonist-treated cows. **Reproduction**, v.127, p.695–703, 2004.
- HUNZICKER-DUNN, M. et al. Membrane organization of luteinizing hormone receptors differs between actively signaling and desensitized receptors. **J. Biol. Chem.**, v.278, p.42744-9, 2003.
- HYTTEL, P. et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, p.23-32, 1997.
- KAWATE, N. et al. Expression of a cloned full-length cDNA encoding bovine luteinizing hormone receptor in COS-7 cells. **J. Reprod. Dev.**, v.48, p.531-8, 2002.
- KAWATE, N. Studies on the regulation of expression of luteinizing hormone receptor in the ovary and the mechanism of follicular cyst formation in ruminants. **J. Reprod. Dev.**, v.50, p.1-8, 2004.

- MENON, K.M.J. et al. A novel post-transcriptional mechanism of regulation of luteinizing hormone receptor expression by an RNA binding protein from the ovary. **Mol. and Cel. Endoc.**, v.246, p.135–141, 2006.
- MÜLLER, T. et al. Absence of exon 10 of the human luteinizing hormone (LH) receptor impairs LH, but not human chorionic gonadotropin action. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.88, p.2242-9, 2003.
- NOGUEIRA, M.F.G. et al. Expression of LH Receptor mRNA Splice Variants in Bovine Granulosa Cells: Changes with Follicle Size and Regulation by FSH in Vitro. **Mol. Reprod. Develop.**, v.74, p.680–686, 2007.
- NOGUEIRA, M.F.G. et al. Tratamento com hCG e LH, como indutores da ovulação em doadoras superestimuladas da raça Nelore, não altera a produção embrionária ou a taxa de prenhez. **Acta Sci. Vet.**, v.33, p.263, 2005.
- RIVERA, G.M.; FORTUNE, J.E. Development of co-dominant follicles in cattle is associated with a follicle-stimulating hormone –dependent insulin-like growth factor binding protein-4 protease. **Biol. Reproduction**, v.65, p.112-118, 2001.
- ROBERT, C. et al. Presence of LH receptor mRNA in granulosa cells as a potential marker of oocyte developmental competence and characterization of the bovine splicing isoforms. **Reproduction**, v.125, p.437-46, 2003.
- ROESS, D.A. et al. Biological function of the LH receptor is associated with slow receptor rotational diffusion. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1464, p.242-50, 2000.
- ROESS, D.A., SMITH, S.M.L. Self-association and raft localization of functional luteinizing hormone receptors. **Biol. Reprod.**, v.69, p.1765-70, 2003.
- SARTORELLI, E.S. et al. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v.63, p.2382-94, 2005.
- SARTORI, R. et al. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biol. Reprod.**, v.65, p.1403-9, 2001.
- SOUMANO, K. et al. Levels of messenger RNA encoding ovarian receptors for FSH and LH in cattle during superovulation with equine chorionic gonadotrophin versus FSH. **J. Endocrinol.**, v.156, p.373-8, 1998.
- WANG, L. et al. Ribonucleic Acid Binding Protein-Mediated Regulation of Luteinizing Hormone Receptor Expression in Granulosa Cells: Relationship to Sterol Metabolism. **Molecular Endocrinology**, v.21, p. 2233–41, 2007.

XU, Z. et al. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biol. Reprod.**, v.53, p.951-7, 1995.