

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 24/02/2019.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Impactos da superestimulação ovariana sobre a diferenciação das
células da granulosa bovina**

PRISCILA HELENA DOS SANTOS

Botucatu – SP

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Impactos da superestimulação ovariana sobre a diferenciação das
células da granulosa bovina**

PRISCILA HELENA DOS SANTOS

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação do Instituto de Bociências de
Botucatu, Universidade Estadual Paulista –
UNESP, para a obtenção do título de Mestre
em Farmacologia e Biotecnologia**

Orientador: Prof. Dr. Anthony César de Souza Castilho

Botucatu – SP

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Santos, Priscila Helena dos.

Impactos da superestimulação ovariana sobre a
diferenciação das células da granulosa bovina / Priscila
Helena dos Santos. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Anthony César de Souza Castilho
Capes: 50504002

1. Bovino - Reprodução. 2. Colesterol. 3. Estradiol. 4.
Hormônio liberador de gonadotropina. 5. MicroRNAs. 6.
Indução da Ovulação.

Palavras-chave: Colesterol; Estradiol; LHCGR; mir-222;
superestimulação .

Nome da Autora: Priscila Helena dos Santos

Título: Impactos da superestimulação ovariana sobre a diferenciação das células da granulosa bovina

Banca Examinadora

Prof. Dr. Anthony César de Souza Castilho

Presidente e Orientador

Programa de Pós-graduação em Ciências Animal

Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE – Presidente Prudente – SP

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Membro Titular

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ – UNESP – Botucatu – SP

Prof. Dr. Ronaldo Luiz Ereno

Membro Titular

Universidade Estácio de Sá – Ourinhos - SP

Data da Defesa: 24/02/2017

Local da Defesa: Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, Botucatu - SP

*Dedico este trabalho aos meus pais,
José Roberto e Joelma, pelo incentivo,
suporte e carinho de sempre.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Anthony Castilho, pelo aprendizado, pela confiança, oportunidade de crescimento profissional e pessoal. Profissional dedicado, solícito e competente. Fazer parte da sua equipe foi, sem sombra de dúvidas, uma experiência engrandecedora e pôde mostrar que em um ambiente de trabalho é possível ter amigos. Obrigada.

Aos membros da banca pela disponibilidade e tempo dedicado ao enriquecimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi, Prof. Dr. Marcelo Fábio Gouveia Nogueira e Prof. Ciro Moraes de Barros por cederem equipamentos e espaço (Laboratório Multiusuário de Fitomedicamentos, Farmacologia e Biotecnologia e Laboratório de Micromanipulação Embrionária) para a realização deste trabalho.

Aos colegas e aos amigos do Laboratório Multiusuário Fitomedicamentos, Farmacologia e Biotecnologia, pelas conversas produtivas, trocas de experiências e risadas garantidas. Obrigada pela receptividade durante o período que me mantive em Botucatu.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Micromanipulação Embrionária, obrigada também pela receptividade, em especial a Vitória pelo companheirismo e divisão das cargas diárias.

A Elisa, Eduardo, Ramon, Mariana, Marina, Alan, Patrícia e Fernanda por manterem um ambiente agradável de trabalho, por todas as dúvidas sanadas, pelas sugestões e companheirismo.

Aos colegas do Departamento de Fisiologia: Carol, Lorena e Rodrigo pela ajuda e colaboração nos momentos de necessários.

A minha família, tão importante em minha vida, por aguentarem as constantes alterações de humor, por todo o incentivo e apoio. Em toda minha vida não houve um momento em que não me senti amparada e amada por vocês. Obrigada por acreditarem em mim.

Ao meu noivo, Guilherme por não me desamparar e me incentivar a cada momento de desespero, a cada momento de fraqueza e cansaço. Por suportar a longa distância e poucos finais de semana que conseguimos estar juntos. Todos os dias difíceis terminaram com uma palavra de consolo e estímulo que sem dúvida alguma, facilitaram a trajetória. Sou imensamente grata a você.

A Patrícia e Jaqueline, por abrirem as portas de casa e pela receptividade em Botucatu. Sentir-me confortável foi essencial para me manter sã. E a Luisa, pessoa tão doce e delicada pelo convívio diário.

Aos meus amigos do coração e amigos de verdade Talita, Ketlin, Anderson, Patrícia e Fernanda que aguentaram choros, lamentações, mas principalmente participaram de todas as histórias extra laboratoriais e conheceram mais do que o lado profissional, e mesmo assim, permaneceram ao meu lado. Amigos conquistados em uma fase da vida que serão levados para as próximas.

Em especial, a Patrícia e Fernanda por todo o aprendizado laboratorial. Pessoas as quais confio e me espelho profissionalmente. Agradeço pela cumplicidade, amizade e pela disponibilidade em todos os momentos que precisei.

A minha grande e eterna amiga Natália, que sempre esteve ao meu lado e acredito que continuará assim. Você foi um grande exemplo de força, coragem e persistência. Eu te amo.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia Janete, Cristina, Luis, Paulo e Hélio pela dedicação e atenção.

A seção técnica de pós-graduação do Instituto de Biociências de Botucatu.

A CAPES e a FAPESP pela concessão de bolsa de mestrado e pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

RESUMO

A superestimulação ovariana é uma biotecnologia amplamente empregada na espécie bovina para a obtenção de múltiplas ovulações. Com este objetivo diversos protocolos superestimulatórios surgiram, dentre eles o protocolo P-36 e sua variação, o protocolo P-36/eCG. Ambos os tratamentos utilizam o hormônio folículo estimulante (FSH) na indução do crescimento folicular. Como é acreditado que no último dia do tratamento, as células da granulosa folicular possuam receptores do hormônio luteinizante (LH; LHR), duas últimas doses de FSH foram substituídas pela administração de gonadotrofina coriônica equina (eCG; P-36/eCG). A molécula de eCG possui atividade tanto LH quanto FSH por se ligar a ambos receptores, aumentando a resposta ovulatória. Os dois tratamentos têm demonstrado eficácia quanto ao desenvolvimento de oócitos competentes para a produção embrionária, no entanto pouco se sabe sobre seus efeitos na diferenciação celular no folículo ovariano. Por isso, o presente estudo investigou os efeitos da superestimulação ovariana com FSH (P-36) ou FSH combinado com eCG (P-36/eCG) sobre aspectos bioquímicos e a produção de hormônios esteroides. Adicionalmente, quantificou-se a abundância de miRNAs reguladores da expressão do mRNA do LHR e outros miRNAs relacionados com o desenvolvimento folicular ovariano. Os resultados obtidos mostram que os tratamentos superestimulatórios alteram o perfil bioquímico intrafolicular e a concentração de estradiol no plasma. Aliado a isso, também alteram a expressão do *LHR* e dos miRNAs reguladores da expressão do mRNA de LHR, possivelmente modulando a capacidade ovulatória em folículos ovarianos superestimulados.

ABSTRACT

Ovarian overstimulation is a biotechnology widely used in the bovine species to obtain multiple ovulations. With this objective, several protocols were introduced, including the P-36 protocol and its variation, the P-36/eCG protocol. Both treatments use follicle stimulating hormone (FSH) to induce the follicular growth. As it is believed that on the last day of treatment, follicular granulosa cells have luteinizing hormone (LHR) receptors, two last doses of FSH have been replaced by administration of equine chorionic gonadotrophin (eCG; P-36/eCG). The eCG molecule has LH and FSH activity by binding to both receptors, increasing the ovulatory response. Both treatments has demonstrated efficacy in the development of oocytes competent for embryo production, however little is known about their effects on cell differentiation in the ovarian follicle. Therefore, the present study investigated the effects of ovarian superstimulation using FSH (P-36) or FSH combined with eCG (P-36/eCG) on biochemical aspects and production of steroid hormones. In addition, the abundance of miRNAs regulating the expression of LHR mRNA and other miRNAs related to ovarian follicular development. Results demonstrated that superstimulatory treatments alter the intrafollicular biochemical profile and the plasma estradiol concentration. In addition, they also alter the expression of LHR and miRNAs regulating LHR mRNA expression, possibly modulating ovulatory capacity in superstimulated ovarian follicles.

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. Experimental design to investigate the effects of ovarian superstimulation in Nelore cows on plasma concentration of estradiol, intrafollicular cholesterol and abundance of target genes and microRNAs in granulosa cells from 10 cows submitted to P-36 or P-36/eCG superstimulatory treatments or 10 non-superstimulated cows.
.....39

Figura 2. Figure 2. (A) Effects of ovarian superstimulation (P-36 or P-36/eCG) on the intrafollicular cholesterol and plasmatic estradiol (mean±S.E.M.) and (B) impacts on relative abundance (mean±S.E.M.) of *STAR*, *FSHR*, *CYP19A1*, *VEGF*, *FLK1* and *FLT1* mRNA in granulosa cells. Messenger RNA abundance was measured by real-time PCR and expression values are relative to a calibrator sample and were calculated with the $\Delta\Delta C_t$ method with efficiency correction. Data are obtained of 10 follicles/experimental group and presented as mean (\pm S.E.M.) Bars with different letters (A and B) are significantly different ($P < 0.05$).
.....46

Figura 3 Figure 3. Effects of ovarian superstimulation (P-36 or P-36/eCG) on the relative abundance (mean±S.E.M.) of *LHCGR*, *LRBP* mRNA and bta-mir-222 in granulosa cells. Messenger RNA and microRNA abundance was measured by real-time PCR and expression values are relative to a calibrator sample and were calculated with the $\Delta\Delta C_t$ method with efficiency correction. Data are obtained of 10 follicles/experimental group and presented as mean (\pm S.E.M.). Bars with different letters (A and B) are significantly different ($P < 0.05$).
.....47

Figura 4. The relative abundance (mean±S.E.M.) of mmu-miR-202-5p; hsa-miR-873; has-miR-144 and their target mRNA *SPRED1*; *TGFBR2*; *ATG7* in bovine granulosa cells. Messenger RNA and microRNA abundance was measured by real-time PCR and expression values are relative to a calibrator sample and were calculated with the $\Delta\Delta C_t$ method with efficiency correction. Data are obtained of 10 follicles/experimental group and presented as mean (\pm S.E.M.). Bars with different letters are significantly different ($P < 0.05$).
.....48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Details of primers used in RT-qPCR.....42

Tabela 2. Details of microRNA assays used in RT-qPCR.....43

SUMÁRIO

PRÓLOGO	12
INTRODUÇÃO.....	16
Capítulo 1	19
1. ESTADO DA ARTE	20
1.1 Foliculogênese ovariana em bovinos e a diferenciação folicular.....	20
1.2 Protocolos superestimulatórios em bovinos.....	23
3. OBJETIVOS	26
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
Capítulo 2	34
ABSTRACT.....	35
1. INTRODUCTION.....	36
2. MATERIAL AND METHODS.....	38
2.1 Ovarian superstimulation	39
2.2 Follicular fluid and granulosa cells recovering	40
2.3 Intrafollicular concentration of cholesterol	40
2.4 Estradiol assay.....	41
2.5 RNA extraction and expression of target genes	41
2.6 MiRNAs expression	42
2.7 Statistical Analysis	44
RESULTS	44
DISCUSSION	49
CONCLUSION.....	54
REFERENCES	55

PRÓLOGO

Participação em eventos

2016 – XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões; Agosto, 2016, Foz do Iguaçu – SP.

2016 – VI International Symposium on Animal Biology of Reproduction; Novembro, 2016, Campos de Jordão – SP.

2015 – 1º Encontro de Epigenética e Reprogramação Nuclear, Abril, 2015 – USP – Pirassununga – SP.

2015 – XIV Workshop da Pós Graduação; Junho – UNESP – Botucatu – SP.

2015 – XV Workshop de genética; Abril, 2015 – UNESP – Botucatu – SP.

Resumos em congressos

2015 - FERNANDA FAGALI FRANCHI, PATRÍCIA KUBO FONTES, **PRISCILA HELENA DOS SANTOS**, JULIANO COELHO DA SILVEIRA, MARCELO FÁBIO GOUVEIA NOGUEIRA, CIRO MORAES BARROS, ANTHONY CÉSAR DE SOUZA CASTILHO. Efeitos moleculares e celulares de exossomos do fluido folicular de vacas Nelore submetidas à superestimulação ovariana. Em: XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Agosto 2015, Gramado – RS.

2015 - FONTES, P. K.; FRANCHI, F. F.; MILANEZI, R.; **SANTOS, P. H.**; NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, C. M.; CASTILHO, A. C. S. Effects of ovarian superstimulation on luteinizing hormone receptor (LHR) mRNA-binding protein (LRBP) mRNA and mir-222 expression in granulosa cells from Nelore cows. In: 48th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction; Junho 2015, San Juan, Puerto Rico, USA.

2016 - **SANTOS, P. H.**; FONTES, P. K.; FRANCHI, F.F.; NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, C. M.; SUDANO, M. J.; BELAZ, K. R. A.; TATA, A.; EBERLIN, M. N.; CASTILHO, A. C. S.. Effects of ovarian superstimulation on follicular microenvironment: profile of

phospholipids in follicular fluid and regulation of CPT1B mRNA abundance in granulosa cells from Nelore cows. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 2016, TOURS. 18TH INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 2016

2016 - **SANTOS, P. H.**; FONTES, P. K.; FRANCHI, F.F.; NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, C. M.; SUDANO, M. J.; CASTILHO, A. C. S. Perfil de genes relacionados ao metabolismo lipídico em células da granulosa de vacas Nelore submetidas à superestimulação ovariana. In: XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2016, Foz do Iguaçu. XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2016.

2016 - RAZZA, E. M.; SUDANO, M. J.; BELAZ, K. R. A.; FONTES, P. K.; FRANCHI, F.F.; **SANTOS, P. H** ; EBERLIN, M. N. ; MACHADO, M. F. ; NOGUEIRA, M. F. G. . Pré-maturação oocitária de duas horas com forskolin e IBMX modula os perfis lipídico e de expressão gênica em blastocistos bovinos produzidos in vitro. In: XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2016, Foz do Iguaçu. XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2016.

2016 - FRANCHI, F.F.; FONTES, P. K. ; **SANTOS, P. H.**; RAZZA, E. M.; LOUREIRO, B.; SILVEIRA, J. C.; NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, C. M.; CASTILHO, A. C. S. Exossomos do fluido folicular de vacas Nelore modulam a expressão gênica em células do cumulus e blastocistos bovinos. In: XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2016, Foz do Iguaçu. XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2016.

2016 - FRANCHI, F.F.; FONTES, P. K. ; **SANTOS, P. H.**; LOUREIRO, B.; SILVEIRA, J. C.; NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, C. M.; CASTILHO, A. C. S. The addition of exosomes from superstimulated Nelore cows during in vitro oocyte maturation modulates embryo gene expression. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 2016, TOURS. 18TH INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 2016.

2016 - CARVALHO, A.; FONTES, P. K. ; FRANCHI, F.F.; RODRIGUES, R. B.; **SANTOS, P. H.**; RAZZA, E. M.; CASTILHO, A. C. S. EFEITO DA ADIÇÃO DA PROTEÍNA SÉRICA A ASSOCIADA À PRENHÊZ (PAPP-A) DURANTE A MATURAÇÃO IN

VITRO NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS. Encontro Nacional de Biomedicina. 2016.

2016 - **P.H.SANTOS**; P. K. FONTES; F. F. FRANCHI¹; E.M. RAZZA; M. F. G. NOGUEIRA; C. AMBROZIO-NETO, C. M. BARROS; A. C. S. CASTILHO. Expression and regulation of bta-mir-222 in bovine antral follicles. In: VI International Symposium on Animal Biology of Reproduction. 2016.

2016 - Razza EM, Sudano MJ, Fontes PK, **Santos, PH**, Vilela J, Machado MF, Nogueira MFG. Bovine oocyte prematuration with cyclic adenosine monophosphate modulators: in vitro performance and semi-quantitative lipid evaluation. In: VI International Symposium on Animal Biology of Reproduction. 2016.

2016 - P.K. FONTES, F.F. FRANCHI, R.B. RODRIGUES, A. CARVALHO, **P.H. SANTOS**, E.M. RAZZA, M.F.G. NOGUEIRA, A.C.S. CASTILHO. Pregnancy-associated plasma protein-a improves oocyte maturation and modulates transcription pattern in bovine in vitro-produced embryos. In: VI International Symposium on Animal Biology of Reproduction. 2016.

Atividades didáticas

Palestra ministrada aos alunos do curso de Biomedicina, com o tema: “Produção *in vitro* de embriões” – Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente – SP.

Minicurso ministrado aos alunos de Biomedicina, com o tema: “Produção *in vitro* de embriões: onde estamos e o que queremos?” – Faculdade do Alto Paulista, Tupã – SP

Publicações

Santos, P. H.; Fontes, P.K.; Franchi, F. F.; Nogueira, M.F.G.; Belaz, K.R.A.; Tata, A.; Eberlin, M.N.; Sudano, M.J. ; Barros, C.M; Castilho, A.C.S. MALDI-MS lipid profiles of follicular fluid from Nelore cows submitted to ovarian superstimulation.

Revista: Theriogenology. Fator de Impacto: 1,838

Status: Aceitável (correções em andamento)

Capítulo de livro

Autores: Anthony Castilho, Patrícia Fontes, Fernanda Franchi, **Priscila Santos** e Eduardo Razza

Título do livro: Renin-Angiotensin System

Título do capítulo: Renin_Angiotensin System on Reproductive Biology

INTRODUÇÃO

As biotecnologias de controle do desenvolvimento folicular e ovulação têm sido bastante utilizadas em conjunto com as tecnologias de reprodução assistida, visando o aumento do potencial reprodutivo de animais (gerando múltiplas ovulações) com alto valor econômico. No Brasil é predominante a criação da raça Nelore como gado de corte, devido sua melhor tolerância ao estresse térmico e resistência a parasitas (Barros e Nogueira, 2001). Esta raça apresenta um maior número de folículos antrais quando comparada a outros animais da mesma espécie, tornando-a passível de submissão às tecnologias reprodutivas como a produção *in vitro* de embriões (PIVE; Pontes *et al.*, 2009), mas apesar disso, a raça Nelore possui um estro curto e com alta incidência noturna, dificultando a sua detecção (Pinheiro *et al.*, 1998).

Com a finalidade de diminuir a manipulação animal e também aumentar a produção embrionária, protocolos superestimulatórios sem a necessidade de detecção de estro foram desenvolvidos (Barros e Nogueira, 2001; Baruselli *et al.*, 2006; Bó *et al.*, 2006; Barros *et al.*, 2010). Neste contexto, Barros e Nogueira (2001) desenvolveram o protocolo P-36 e posteriormente foi desenvolvido a sua variação, o protocolo P-36/eCG (Barcelos *et al.*, 2007). Ambos os protocolos têm apresentado maior aquisição de oócitos competentes para a produção embrionária *in vitro* (PIVE), comparados com animais não submetidos aos protocolos superestimulatórios, além de maior produção de embriões bovinos de qualidade (dados não publicados), no entanto, pouco se sabe quanto aos aspectos moleculares envolvidos no desenvolvimento dos folículos ovarianos de vacas submetidas aos protocolos de superestimulação (P-36 e P-36/eCG).

O desenvolvimento do folículo antral é dependente de um conjunto de fatores envolvidos na transformação molecular, bioquímica e morfológica dos componentes

foliculares (oócito e células adjacentes; Sánchez e Smitz, 2012; Aller *et al.*, 2013; Nofferesti *et al.*, 2015). Assim, qualquer alteração no fluido folicular, por exemplo, pode comprometer o desenvolvimento e aquisição da competência oocitária (Sirard *et al.*, 2006; Aller *et al.*, 2013; Nofferesti *et al.*, 2015).

Faz parte do desenvolvimento folicular ovariano a diferenciação funcional das células da granulosa de folículos dominantes (Orisaka *et al.*, 2006). A dominância folicular na raça Nelore ocorre entre 2,5 a 2,8 dias após a ovulação (Sartorelli *et al.*, 2005; Gimenes *et al.*, 2008), onde depois de um crescimento sincronizado de um determinado número de pequenos folículos antrais, apenas um único folículo continua seu crescimento e desenvolvimento até a ovulação (folículo dominante), enquanto os demais regridem (folículos subordinados) (Ginther *et al.*, 1996). Tal acontecimento é denominado divergência (ou desvio) folicular e tem como principal característica a diferença na taxa de crescimento entre o folículo dominante e o segundo maior folículo (Ginther *et al.*, 1996).

As razões pelas quais o folículo dominante é o folículo escolhido para o desenvolvimento final ainda não foram completamente elucidadas, mas acredita-se que a diferenciação sofrida pelos folículos é o que permite o desenvolvimento até a ovulação (Fortune *et al.*, 2001). Um grande número de genes e vias estão envolvidos neste processo (Bao *et al.*, 1997; Webb *et al.*, 1999; Toloubeydokhti *et al.*, 2008). Entre as alterações estão a expressão ou maior expressão dos genes *FSHR*, *LHR*, *AROMATASE*, *3 β -HSD* e *STAR*, o que impacta em uma maior síntese de hormônios esteroides (Bao e Garverick, 1998; Webb *et al.*, 1999).

Diversos fatores estão relacionados com a regulação da expressão de genes importantes na diferenciação celular, dentre estes, estão os microRNAs (miRNAs; Donadeu *et al.*, 2012, Donadeu *et al.*, 2016). Recentes estudos têm demonstrado a ação de miRNAs sobre a expressão gênica no trato reprodutivo de fêmeas mamíferas (Maalouf 2016, Chakrabarty

2007, Ro 2007, Hu 2008, Hossain 2009). Isso porque os miRNAs, que são pequenas moléculas não codificadoras, que participam da regulação pós-transcricional de mRNA, onde um miRNA maduro, unido a um complexo silenciador de mRNA, pode agir silenciando ou degradando o mRNA alvo. E também, é importante salientar, que um único miRNA pode regular a transcrição de diversos genes (Hutvagner and Zamore 2002, Gregory 2005, Selbach 2008) e estes têm se mostrado importante no desenvolvimento folicular ovariano, já que em bovinos, estudos têm demonstrado um diferente perfil de expressão dos miRNAs entre folículos dominantes e folículos subordinados (Sontakke 2014, Salilew-Wondim 2014), sugerindo uma ação dos miRNAs nos processos de diferenciação celular.

Assim, o presente estudo visou buscar um maior entendimento dos efeitos dos protocolos superestimulatórios P-36 e P-36/eCG sobre alterações bioquímicas e moleculares que possam afetar a diferenciação do folículo ovariano na espécie bovina.