

RONALDO LUIZ ERENO

**EXPRESSÃO GÊNICA DAS ISOFORMAS DO RECEPTOR DO
HORMÔNIO LUTEINIZANTE(LHR) EM CÉLULAS DA
GRANULOSA ANTES, DURANTE E APÓS O DESVIO
FOLICULAR EM NOVILHAS NELORE**

RONALDO LUIZ ERENO

**EXPRESSÃO GÊNICA DAS ISOFORMAS DO RECEPTOR DO
HORMÔNIO LUTEINIZANTE(LHR) EM CÉLULAS DA
GRANULOSA ANTES, DURANTE E APÓS O DESVIO
FOLICULAR EM NOVILHAS NELORE**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade Estadual Paulista
“Julio de Mesquita Filho”, Campus
de Botucatu, para a obtenção
do título de Doutor em Medicina
Veterinária, Área de Reprodução
Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ciro Moraes Barros

**Botucatu-SP
2008**

Dedicatória

Karina

*O escritor já disse que a gente
não morre, fica encantado
Pensamos que seja assim mesmo
quando, olhamos a casa vazia de você,
de sua alegria;
Acreditamos que nos encontraremos de novo
num tempo , num espaço
onde poderemos ser felizes
novamente.....*

Agradecimentos:

A realização deste trabalho, só possível graças a ajuda de muitas pessoas. A todas elas manifesto minha gratidão, e de forma particular:

A Mariana Machado, pela ajuda durante todo o experimento e amizade;

Ao prof. Dr. José Buratini Junior, pelo auxílio no delineamento do experimento e a disponibilização de seu laboratório;

A todos os professores do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ – UNESP – Botucatu, por todo o aprendizado que recebi durante esses 9 anos de Pós Graduação;

Ao amigo Marcelo Pegorer, pelo auxílio neste e em outros trabalhos, pelas caronas, as trocas de informações e principalmente pela amizade;

Aos amigos Rafael Satrapa e Renato Simões, pelas nossas idas e vindas ao abatedouro em Santa Cruz do Rio Pardo, pelos radioimunoensaios de P4 e E2 e tantos outros favores feitos por vocês;

A professora Luzia Trinca, pela realização das análises estatísticas dos experimentos;

Aos funcionários da Pós Graduação pela prontidão e gentileza

Aos amigos: Andrey, Thaís, Evandro Sartorelli, Ana Cláudia Barcellos, Paulo e outros que eu possa ter esquecido.

Aos amigos, Leonardo, João Vitor, Fabinho e Diego, pelo auxílio no campo, nas etapas deste experimento;

*“O que verdadeiramente somos é aquilo que
o impossível cria em nós “*

(Clarice Lispector)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

Resumo

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. Isoformas de LHR (“Splicing “alternativos)	18
2.2. LHR e desenvolvimento folicular	20
2.3. Modulação das isoformas do LHR	22
2.4. Atividade biológica das isoformas do LHR	24
2.5. “Down regulation”do LHR	25
3. MATERIAL E MÉTODO	27
3.1. Experimento 1-Etapa 1: Caracterização do momento do desvio folicular	27
3.1.2. Ultra-sonografia	28
3.2. Etapa 2: Abate e remoção dos ovários e avaliação da expressão do LHR	29
3.2.1. Classificação folicular	30
3.2.2. Dissecção dos folículos	30
3.2.3. Obtenção do fluido folicular	30
3.2.4. Isolamento das células da granulosa e extração do RNA total	31
3.3. Extração do RNA total	31
3.4. RT-PCR	32
3.4.1. Protocolo DNase I	32
3.4.2. Reação de transcrição reversa (RT)	33
3.4.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	33
3.4.3. Eletroforese em gel de agarose	35
3.5. Comparação entre as medidas foliculares obtidas pelo US e paquímetro	35

3.6. Análise Estatística	36
4. RESULTADOS	37
4.1. Caracterização do momento do desvio de crescimento folicular (Experimento 1)	37
4.2. Avaliação da expressão do LHR (Experimentos 1 e 2)	40
4.3. Comparação entre as medidas foliculares obtidas pelo US e paquímetro	45
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÕES	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ABSTRACT	66

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Protocolo de sincronização da ovulação e acompanhamento do desenvolvimento folicular ovariano em novilhas Nelore (DIB = Dispositivo Intravaginal Bovino, BE = Benzoato de estradiol, PGF₂ α = Prostaglandina F₂ α , D = Dia, US = Exame Ultra-sonográfico, ↓ = inserção e ↑ = retirada). 28

Figura 2- Estrutura e disposição dos exons no gene codificador do LHR. Os números (1 a 11) indicam os exons; TM = domínio transmembrânico; IC = região intracelular; UTR = região não traduzida. 34

Tabela 1 – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do GAPDH, M1, M2, M3 e M4 e da 17 α hidroxilase. 35

Figura 3 - Diâmetro ($\pm$ EPM) dos dois maiores folículos (F1 = folículo dominante e F2 = folículo subordinado) da onda de crescimento folicular, a partir de 12 horas antes da ovulação (- 12) até 132 horas após. Momento do desvio de crescimento folicular indicado pela seta. 38

Tabela 2- Momento do desvio (dias após a ovulação) e diâmetro folicular (mm) determinado pelo método gráfico ou por regressão linear segmentada, em novilhas Nelore. FD = folículo dominante, EPM = erro padrão da média. 39

Tabela 3- Identificação da novilha, grupo experimental, diâmetro folicular (mm) e porcentagem de expressão relativa ao GAPDH das isoformas do LHR (M1 a M4) nas células da granulosa, obtidas de novilhas da raça Nelore sacrificadas 2 (G2), 2,5 (G 2,5 e 3,0 (G3) dias após a ovulação. 41

Figura 4 – Total de folículos por grupo de novilhas da raça Nelore sacrificadas 2 (G2), 2,5 (G 2,5 e 3,0 (G3) dias após a ovulação e quantidade de folículos que expressaram LHR (p=0,74).	42
Figura 5 – Porcentagem relativa acumulada da expressão das quatro isoformas do LHR (M1, M2, M3 e M4) nas células da granulosa dos folículos dos Grupos de novilhas da raça Nelore sacrificadas 2 (G2), 2,5 (G 2,5 e 3,0 (G3) dias após a ovulação. *A expressão das isoformas M1 e M3 foi detectada com maior intensidade do que as M2 e M4 (p < 0,001).	42
Figura 6- Imagem ilustrativa de gel de agarose a 3,0% corado em solução de brometo de etídio. Podem ser visualizadas bandas correspondentes à amplificação com iniciadores específicos para o GAPDH (850pb) e da 17α hidroxilase e das amostras contaminadas com células da teca	43
Figura 7- Imagem ilustrativa de gel de agarose a 3,0%, corado em solução de brometo de etídio. Podem ser visualizadas bandas correspondentes à amplificação com iniciadores específicos para o GAPDH (850pb) e das isoformas LHRB3 (1240 pb), LHRB4 (1159 pb), LHRB5 (975 pb) e LHRB6 (894 pb) nos grupos de folículos de novilhas Nelore abatidas 2 dias (Grupo G2), 2,5 dias (Grupo G2,5) E 3 DIAS (Grupo G3) após a ovulação. Controle positivo (+) e controle negativo (-).	44
Tabela 4- Grupos de folículos (F5 e F9), diâmetro folicular (mm) obtido por meio de ultra-sonografia (US) ou com auxílio de um paquímetro e, diferença (mm) entre as mensurações obtidas pela US e pelo paquímetro.	45

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	-micrograma
µl	-microlitro
µm	-micrômetro
A	-"antisense"
b	-espécie bovina (p.ex., bLH)
cAMP	-monofosfato de adenosina cíclico
cDNA	-ácido desoxirribonucléico complementar
CG	-célula da granulosa
CYP17	- 17 α -Hidroxilase
DEPC	-dietilpirocarbonato
DNA	-ácido desoxirribonucléico
DNase	-enzima que degrada o ácido desoxirribonucléico
e	-espécie eqüina (p.ex., eCG)
E2	-estradiol
EDTA	-ácido etilenodiaminotetracético
FF	-fluido folicular
FSH	-hormônio folículo estimulante
g	-força G
GAPDH	-gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GnRH	-hormônio liberador de gonadotrofinas
h	-espécie humana (p.ex., hCG)
IGF	-fator de crescimento semelhante à insulina
IGFBP	-proteína específica de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina
LH	-hormônio luteinizante
LRBP	-proteína específica de ligação ao receptor do LH
mg	-miligrama
MgCl ₂	-cloreto de magnésio
mL	-mililitro
mM	-milimolar
mm	-milímetro
ng	-nanograma
nm	-nanômetro
Neg	-negativo
°C	-grau Celsius
pb	-pares de bases
P4	-progesterona
PCR	-reação da cadeia em polimerase
pg	-picograma
pH	-potencial hidrogeniônico
PKC	-proteína quinase C
RNA	-ácido ribonucléico
mRNA	-ácido ribonucléico mensageiro
RNase	-enzima que degrada o ácido ribonucléico
RT	-reação de transcrição reversa

RT-PCR	- reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
S	-“sense”
THS	Hormônio estimulante da tireóide

ERENO, R.L. Expressão gênica das isoformas do receptor do hormônio luteinizante(LHR) em células da granulosa antes, durante e após o desvio folicular em novilhas Nelore. Botucatu, 2008, 67p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

RESUMO

Objetivou-se com o presente trabalho, avaliar a expressão das isoformas do LHR nas células da granulosa de novilhas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), antes, durante e após o desvio folicular. Para caracterizar o momento do desvio folicular (Experimento 1, primeira etapa), novilhas Nelore (n=20) foram submetidas ao seguinte protocolo de sincronização da ovulação: no D-10 receberam um dispositivo intravaginal liberador de progesterona (1,0 g, DIB[®]), associado a aplicação de benzoato de estradiol (BE, 2,5 mg, Estrogin[®], via IM). O dispositivo intravaginal foi removido no D-3 e os animais receberam uma aplicação de PGF₂ α (d-cloprostenol, 500 μ g, Prolise[®], IM). Vinte e quatro horas mais tarde administrou-se 1,0 mg de BE (via IM) e a partir deste momento, o crescimento do folículo dominante foi acompanhado através de exame ultrassonográfico (US, Aloka SSD 900; transdutor de 7,5 a 9,0 MHz, Japan), realizado a cada 12 horas até 144 horas após a ovulação. Na segunda etapa deste experimento avaliou-se a expressão das isoformas do LHR (M1, M2, M3 e M4) nas células da granulosa de folículos obtidos antes, durante e após o momento esperado para ocorrência do desvio folicular. As mesmas novilhas utilizadas anteriormente foram submetidas ao protocolo de sincronização da ovulação descrito acima e separadas em 3 grupos (segunda etapa): Grupo 2 (G2, 2 dias após a ovulação, n=7), Grupo 2,5 (G2,5, 2,5 dias após a ovulação, n=7) e Grupo 3 (G3, 3 dias após a ovulação, n =7). Os animais foram abatidos 2,0, 2,5 e 3 dias após a ovulação para remoção dos ovários e as células da granulosa, coletadas dos folículos ovarianos, foram separadas para a extração do RNA total com Trizol. A expressão gênica das isoformas de LHR foi mensurada por RT-PCR semi-quantitativo. No experimento 2, um outro lote de novilhas Nelore (n=21) foi submetidos aos procedimentos, descritos na segunda etapa do experimento 1, para aumentar o número de amostras de células da granulosa que expressavam as isoformas dos LHRs. No

experimento 1 (primeira etapa), houve emergência de uma nova onda folicular 12 horas antes da ovulação e o momento do desvio folicular ocorreu 2,3 dias após a ovulação, com o folículo dominante medindo 5,4 mm e o subordinado 4,9 mm de diâmetro. Na segunda etapa, (experimentos 1 e 2) não foi observada expressão do LHR em folículo de 4,5 a 6,7 mm (G2). A expressão do LHR foi primeiramente detectada em duas amostras de 7 mm (G2,5) sendo mais acentuada em amostras do G3 (3 dias após a ovulação, 63,6%). Em todas as amostras que expressaram o LHR, as quatro isoformas deste receptor (M1, M2, M3 e M4) estiveram presentes. Conclui-se que a expressão do LHR ocorre, nas células da granulosa de folículos antrais de novilhas Nelore, a partir do momento do desvio folicular.

Palavras Chaves: expressão gênica, LHR, Nelore, RT-PCR, *Bos taurus indicus*

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVO

Com o advento da avaliação da atividade ovariana através de ultrasonografia transretal, podê-se observar melhor o padrão de crescimento e regressão dos folículos antrais em formas de onda, durante o ciclo estral das fêmeas bovinas (FORTUNE et al., 1988; LUCY et al., 1992; GINTHER et al., 1997a). Em espécies monovularatórias, como os bovinos, a emergência da onda de crescimento folicular, coincide com um aumento nas concentrações plasmáticas de FSH, responsável pelo recrutamento de um grupo de folículos antrais menores que 4 mm de diâmetro (FORTUNE et al., 2001; MIHM & AUSTIN, 2002), com média de crescimento semelhantes entre si (GASTAL et al. 2004). Em média, o número de folículos recrutados durante a emergência da onda folicular variou de 24 folículos para novilhas Holandesas (GINTHER et al., 1996) a 45 para novilhas Nelore (BURATINI et al., 2000).

À medida que esses folículos se desenvolvem, secretam quantidades crescentes de inibina e estradiol (WRIGHT & MALMO, 1992; WILTBANK et al., 1996), levando a uma queda gradativa nas concentrações de FSH (MIHM et al., 2002), culminando na atresia de muitos folículos (GINTHER et al., 1996).

O momento em que ocorre a maior diferença na taxa de crescimento entre os dois maiores folículos da onda é denominado de desvio de crescimento folicular (GINTHER et al., 1997). Nesta fase, o maior folículo em crescimento atinge um diâmetro de 8,3 a 8,5 mm em *Bos taurus taurus* (GINTHER et al., 1996) e 6,1 mm em *Bos taurus indicus* (SARTORELLI et al., 2005).

Os mecanismos envolvidos no processo de desvio folicular são complexos e não compreendidos completamente. Sabe-se que neste momento as concentrações de FSH encontram-se em níveis basais (GINTHER et al., 1997). Fatores intrafoliculares também são candidatos a ativação deste processo, tais como sistema IGF, esteróides, os peptídeos ativina A/inibina A, receptores para gonadotrofinas entre outros (ARMSTRONG & WEBB, 1997; BERISHA et al., 2003, FORTUNE et al., 2004, IRELAND et al., 2004). Porém, uma das hipóteses para este evento é a aquisição de receptores para LH (LHr) nas células da granulosa e aumento nas concentrações de estradiol

intrafolicular no folículo selecionado dominante (GINTHER et al., 1996; GINTHER, 2000; BEG et al., 2001).

Xu et al. (1995), caracterizaram a importância da expressão dos transcritos do LHR nas células da granulosa em bovinos, como ponto chave para a associação da dependência de FSH para LH. A expressão do RNA mensageiro (mRNA) do LHR foi detectado nas células da granulosa de folículos com 8 mm; sendo mais acentuada em folículos com tamanho médio de 10,8 mm. Porém em folículos menores de 8 mm não observou-se a expressão para tais receptores (BAO et al. 1997). Beg et al. (2001), avaliaram a relação entre o desvio folicular e diversas características das células da granulosa e fluido folicular. Neste estudo foi detectado um aumento em mRNA para LHR aproximadamente 8 horas antes do início do desvio folicular ou do aumento das concentrações intra-foliculares de estradiol. Porém, em folículos de ovários de vacas Nelore, oriundos de abatedouro, a expressão do LHR ocorreu somente em amostras a partir de 7mm de diâmetro (NOGUEIRA et al., 2007).

Entretanto, enquanto alguns autores sugerem ser o início da expressão do LHR, nas células da granulosa, a causa para a aquisição da dominância folicular (GINTHER et al., 2003), outros afirmam ser um evento decorrente da dominância já instalada (AUSTIN et al., 2001, FORTUNE et al., 2001). Fortune et al. (2001) não detectaram a expressão do LHR, no futuro folículo dominante imediatamente antes da seleção folicular. A primeira diferença observada, entre os maiores folículos (dominante e subordinado), foi a indução – mediada pelo FSH - da protease da IGFBP-4, a PAPP-A (MOGET et al., 2003), que possibilita aumento de IGF livre (biodisponível) que, em sinergismo com o FSH, induziria ao aumento da síntese de estradiol e do crescimento folicular (seleção folicular).

A maioria dos trabalhos sobre a expressão de receptores para gonadotrofinas, com enfoque no momento do desvio de crescimento folicular, utilizou como modelos experimentais bovinos europeus (*Bos taurus taurus*) e os parâmetros dos tamanhos foliculares utilizados nestes experimentos, são referenciados as imagens obtidas por meio de ultra-sonografia. Portanto, faltam informações a respeito da expressão de receptores para LH, nesta fase distinta da dinâmica folicular em fêmeas Nelore (*Bos taurus indicus*).

Objetiva-se com este trabalho confirmar o momento predito para o desvio de crescimento folicular em novilhas Nelore, avaliar a expressão gênica de LHR nas células da granulosa de folículos desses animais, antes, durante e após este evento e comparar as medidas do tamanho folicular obtido por meio de ultra-som e paquímetro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A família dos hormônios glicoprotéicos é formada pelo hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio estimulante da tireóide (TSH) e a gonadotrofina coriônica (CG). São heterodímeros e compostas de uma subunidade α comum e outra β , que é hormônio específica. Todos os mamíferos sintetizam LH, porém a CG tem sido identificada somente em primatas e eqüídeos, sendo o eLH e eCG codificados pelo mesmo gene e ambos têm a mesma seqüência de aminoácidos (PIERCE & PARSONS, 1981).

O receptor do LH possui dois hormônios ligantes, o LH (pituitário) e o CG (placental, REISINGER et al., 2007), porém este último com mais afinidade e especificidade (ZHANG & DUFAU, 2003; PUETT et al., 2007).

O LHR pertence à superfamília dos receptores acoplados à proteína G, assim como os receptores do FSH e do TSH (GETHER, 2000; ASCOLI et al.; 2002, FREDRIKSSON et al. 2003, ZHANG & DUFAU, 2003). O receptor do LH possui uma grande região extracelular (366 aminoácidos codificados pelos primeiros 10 exons do gene, sendo 11 no total), sete hélices transmembrânicas (típica dessa família de receptores), sendo três hélices extracelular, três intracelulares e uma intracelular na região C terminal (PUETT et al., 2007).

A ligação receptor-hormônio está localizada entre os exons 1-7 no domínio extracelular do receptor (ZHANG & DUFAU, 2003). Uma seqüência de aminoácidos próxima à primeira das hélices transmembrânicas, parece ser essencial à ativação do LHR pelo LH, mas não à ligação (ALVAREZ et al. 1999). Por outro lado, isoformas de RNAm que não expressam o exon 10 são traduzidos em receptores com a capacidade de serem ativados pelo hCG, mas não pelo LH (; MÜLLER et al., 2003; REISINGER et al., 2007).

A região extracelular do LHR possui diferentes afinidades com os ligantes (hCG e LH), dependendo de sua origem. Existem distintas afinidades de ligação entre o hCG e o LH de origem bovina (bLH) ou humana (hLH) com os receptores humano e de rato. Nesses estudos, as diferenças de ligação observadas foram relacionadas aos resíduos de aminoácidos, no domínio extracelular do LHR, que diferem entre as espécies estudadas (GALET & ASCOLI, 2005).

A proteína G trimérica é acoplada à região intracelular do LHR (região C terminal) e ativada quando ocorre uma alteração conformacional do receptor após a ligação do hormônio (LEWIN, 2004). A ativação do LHR pode desencadear vias diferentes de resposta celular, intermediadas por diferentes proteínas G na ativação do LHR. A G_i , pela via de ativação dos canais de K^+ , a G_q , através da fosfolipase C e a G_s ativando a adenil ciclase (SHEMESH, 2001).

A complexidade das vias de ativação da proteína G acoplada ao LHR pode se estender à proteína quinase C. Existem sugestões que o LHR possa ativar as proteínas quinase A e C (PKA e PKC). Salvador et al. (2002), demonstraram que, em cultivo das células da granulosa oriundas de folículos pré ovulatórios, a ativação do LHR pelo hCG, induziu a resposta celular (fosforilação/ativação da p42/44 MAPK) predominantemente mediada pela proteína quinase A, independente da PKC.

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

2.1. Isoformas de LHR (“Splicing”alternativos)

A montagem (“splicing”) do transcrito primário de um gene interrompido (pré-RNAm), 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 RNAm. A transcrição gênica poderá gerar RNAm contendo todos os exons do gene (forma completa ou “full-length”) ou algumas formas de RNAm com deleções totais 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 RNAm (transcritos alternativos ou isoformas, LEWIN, 2004).

Não é totalmente entendido o porquê de alguns genes serem mais intensamente transcritos sob o evento do “splicing” alternativo que outros genes. Supõe-se que os mamíferos usem este processo para amplificar a

síntese de proteínas, mantendo o tamanho do genoma em níveis adequados, pois um único gene pode codificar mais de uma proteína funcional (LAREAU et al., 2004).

O “splicing” alternativo pode participar de um mecanismo de autocontrole da expressão gênica (LAREAU et al., 2004) ou de regulação direta no DNA, em outros RNAs ou mesmo em proteínas, mediante a formação de microRNAs a partir do RNA intrônico não codificante (MATTICK, 2004).

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

Várias isoformas do LHR (produtos de “splicing” alternativo) foram descritas em ovinos e bovinos e nem todas parecem ser funcionais. A investigação da região comprometida entre os finais dos éxons 9 e 11 revelou deleção alternativa do éxon 10 e parte do éxon 11, gerando três transcritos alternativos (ABDENNEBI et al., 2002; ROBERT et al., 2003). Kawate & Okuda (1998) relataram três isoformas do LHR em corpo lúteo bovino, denominadas de F (completa deleção do éxon 10), B (deleção final do éxon 9 e 11) e G (comprometimento final do éxon 10 e 11). Das três isoformas encontradas, apenas a F pode sintetizar um receptor completo (regiões extra e intracelular, e transmembrânica), enquanto que as outras (B e G) produzem uma mudança na leitura do RNAm, levando a síntese de receptores truncados. Por outro lado, deleções nos éxons 4 ou 5 nunca foram citadas (BACICH et al., 1999; ABDENNEBI et al., 2002; ROBERT et al., 2003; KAWATE, 2004).

Recentemente, a presença de quatro transcritos alternativos foi confirmada nas células foliculares de vacas aneloradas. Este estudo revelou a ocorrência de deleção facultativa do éxon 3, além das deleções dos éxons 10 e parte do 11 do LHR (ausência completa do éxon 10 e/ou parcial do éxon 11 (NOGUEIRA et al., 2005 e 2007).

Durante o ciclo estral de ovinos, também observou-se a montagem alternativa dos transcritos de LHR (BACICH et al., 1999), no corpo lúteo e gônadas fetais eqüinas (SAINT-DIZIER et al., 2004a) e no ovário de ratas (AATSINKI et al., 1992).

2.2. LHR e desenvolvimento folicular

As células do folículo ovariano possuem RNAm para 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 (BAO & GARVERICK, 1998; BRAW-TAL & ROTH, 2005), ou apenas a partir do desvio folicular até a fase pré ovulatória nas células da granulosa (XU et al. 1995, BAO & GARVERICK, 1998). Essa distinção entre os dois tipos celulares provavelmente tem implicações, na hipótese para o mecanismo da única ovulação que ocorre predominantemente em bovinos (XU et al., 1995; BEG et al., 2001; GINTHER et al., 2003).

Enquanto alguns autores sugerem ser o início da expressão do LHR, nas células da granulosa, a causa para a aquisição da dominância folicular (GINTHER et al., 2003), outros sugerem ser um evento decorrente da dominância já instalada (AUSTIN et al., 2001, FORTUNE et al. 2004).

A viabilidade e o grau de capacitação atingidos 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 fator semelhante a insulina do tipo I, IGF-I; e proteína ligadora do IGF-I do tipo 4, IGFBP-4). Estudos em folículos bovinos demonstraram que existe uma alta correlação entre as concentrações de IGF-I livre, de IGFBP-4, de estradiol e de progesterona, presentes no fluido, e a capacidade desses folículos atingirem a dominância e a capacitação final pré-ovulação (BEG et al., 2001; GINTHER et al., 2001; FORTUNE et al., 2004). Portanto, uma baixa concentração de IGFBP-4 forneceria grandes quantidades de IGF-I biodisponível para ser utilizado como promotor de crescimento pelo folículo, amplificando os efeitos de FSH e promovendo um aumento na produção de estradiol. Essa concentração reduzida de IGFBP-4 está relacionada a uma maior degradação específica dessa proteína ligadora por uma enzima proteolítica, denominada de proteína sérica A associada a prenhez (PAPP-A, MONGET et al., 2003) presente nos

folículos dominantes desde a fase de recrutamento até o momento pré ovulatório (FORTUNE et al., 2004).

Austin et al. (2001), também propuseram que as primeiras mudanças intrafoliculares que distinguem o folículo, destinado a tornar-se dominante, dos outros folículos da população em crescimento, seria a capacidade aumentada em produzir estradiol e a manutenção de baixos níveis de IGFBPs. Corroborando com essa hipótese, Fortune et al. (2001), não detectaram a expressão do LHR, no futuro folículo dominante, imediatamente antes da seleção folicular. A diferença observada, entre os maiores folículos do grupo (futuro dominante e subordinados), foi a indução da protease IGFBP-4, mediada pelo FSH.

O desvio de crescimento folicular está associado com o declínio nas concentrações plasmáticas de FSH, aumento nas concentrações de LHR nas células da granulosa (ADAMS et al., 2008) e aumento circulante de estradiol 17β . A partir deste momento, o folículo dominante tem seu crescimento direcionado pela secreção pulsátil de LH (VAN DEN HURK & ZHAO, 2003).

De acordo com Beg et al. (2001), a expressão do LHR foi detectada em folículos com 8mm de diâmetro, que corresponde a 8 horas antes do momento previsto para o desvio folicular em taurinos. . No entanto, Bao & Garverick (1998) sugerem que a expressão do LHR aumenta com o progressivo desenvolvimento folicular, atingindo o máximo quando o folículo dominante está próximo do seu maior diâmetro. Recentemente, Nogueira et al. (2007), demonstraram que apenas uma das amostras (n=6) de folículos, de vacas Nelore, com 7 mm apresentou expressão de LHR nas células da granulosa, enquanto que em folículos ≥ 8 mm, a ocorrência foi 87,5% .

Sartori et al. (2001), utilizando vacas Holandesas, demonstraram que a ovulação foi efetiva somente em folículos com mais de 10 mm de diâmetro, após a administração de LH. Neste mesmo trabalho não houve resposta ovulatória nos folículos de 7,0 e 8,5 mm de diâmetro. Embora um aumento do LHR nas células da granulosa, seja necessário para a aquisição de dominância folicular, somente este aumento não é suficiente para a instalação plena da capacidade ovulatória. Tal mecanismo, ainda não elucidado, parece ser decorrente de um aumento na quantidade de LHR, associado a alterações nas vias de sinalização intracelular que o LHR possui na fase pós divergência.

2.3. Modulação das isoformas do LHR

Existem 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 da atividade ovariana durante a época do ano, indicando que os estudos dos transcritos alternativos do LHR poderiam estar parcialmente relacionado à fisiologia reprodutiva das fêmeas estudadas (ABDENNEBI et al., 2002). Neste mesmo estudo, relatou-se que em células da teca de folículos antrais ovinos, há predominância na expressão do transcrito completo (“full-length”) do LHR durante a estação reprodutiva ou ovulatória. Entretanto, durante a estação de anestro o transcrito mais expresso foi aquele com deleção do éxon 10 e parcial do éxon 11

Porém, ao contrário das diferenças observadas em diferentes estações do ano, durante o ciclo estral ovino não foi observada a modulação dos transcritos do LHR (BACICH et al., 1999). Neste estudo, os autores detectaram - na expressão do LHR em folículos e corpos lúteos – uma predominância do transcrito com a deleção parcial do exon 11. Também, demonstrou-se a tradução *in vivo* desse transcrito, mediante a detecção da proteína correspondente ao mRNA. Os autores sugerem que tal abundância nos transcritos alternativos do LHR, concomitante a tradução pelas células, deveria representar uma parte do mecanismo pelo qual o LH regula a função ovariana.

Corroborando 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 segunda onda de crescimento folicular.

Evans et al. (2004) observaram que a expressão do gene LHR, em células da granulosa de folículos bovinos, é altamente correlacionada com a dominância folicular, ou seja, os genes da aromatase e do LHR foram expressos nos folículos dominantes e não foram detectados nos subordinados.

Alguns autores observaram correlação positiva entre as concentrações de estradiol e os receptores de LHR (Berisha et al., 2000; Evans

et al. 2004) em raças européias. Entretanto, na em animais anelados, Nogueira et al. (2007) não observaram qualquer correlação entre concentrações foliculares de estradiol e a expressão de LHR nas células da granulosa.

Embora se tenha observado relação entre a expressão do LHR e a viabilidade da célula da granulosa no folículo dominante (EVANS et al., 2004), a mesma correlação não foi suficiente para prever a competência do oócito em atingir a fase de blastocisto (ROBERT et al., 2003). Curiosamente, neste mesmo estudo, oócitos de folículos que expressaram o LHR nas células da granulosa apresentaram maior taxa de blastocisto. No entanto, Calder et al. (2003) e (2005) demonstraram a relação entre a qualidade do COC, a competência do oócito e a expressão do LHR nas células do *cumulus oophorus*. Os autores postularam que os transcritos do LHR poderiam ser parte de genes marcadores para a maturação oocitária *in vitro*.

A expressão do LHR também pode ser modulada diferencialmente em alguns tecidos. No útero bovino, a expressão máxima do LHR ocorre durante a fase de pró-estro/estro, na veia uterina, ou durante a fase luteal no miométrio, endométrio e cérvix. O tipo de tecido pode modular, inclusive o produto final da ativação do LHR. Embora no útero bovino, a ativação do LHR induza a síntese de COX-2 no endométrio e miométrio, o principal produto desta enzima é a PGF, no endométrio, e PGE no miométrio (SHEMESH, 2001).

A modulação torna-se ainda mais complexa quando é proposta a existência de 2 genes do LHR em humanos, sendo um dos genes expresso preferentemente nos ovários (TSAI-MORRIS et al., 1998).

A modulação também pode ocorrer na mobilidade do complexo receptor-ligante na membrana citoplasmática. Aparentemente, o tipo de ligante (LH, hCG ou hCG deglicosilado) ou de receptor (LHR funcional ou não funcional), induzem diferenças estruturais entre os complexos receptor-ligante formados (ROESS et al., 2000a).

Horvat et al. (1999), acoplaram uma proteína fluorescente (GFP) ao LHR do rato formando um complexo (rLHR-GFP) intrínseco fluorescente, e demonstram 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 ao hCG, formaram agrupamentos com restrita difusão lateral.

Interações entre os próprios receptores foram demonstradas para o LHR. Parece que o mecanismo de dessensibilização ao agonista, observado com o LHR em células da granulosa em cultivo e nas células foliculares após o pico pré-ovulatório de LH, é mediado por auto-associações entre dois ou mais LHR, a proteína β -arrestina e regiões da membrana citoplasmática denominadas “raft” (ROESS et al., 2000b, HUNZICKER-DUNN et al., 2003, ROESS & SMITH, 2003). Nessa série de estudos, foi demonstrado que o padrão de agrupamentos de LHR na membrana citoplasmática (tamanho e mobilidade lateral) difere quanto ao ligante (LH ou hCG) e o estado funcional (dessensibilizados ou funcionais).

Herrlich et al., (1996) propuseram um modelo para a ativação do LHR no momento da ovulação, sendo constituído por duas cascatas de sinalização (proteínas G_s e G_i) onde a adenilciclase e a fosfolipase C seriam ativadas, respectivamente. Os autores sugeriram que a concentração de LH e os níveis de LHR deveriam estar suficientemente altos para efetivamente estimular a adenilciclase e a fosfolipase C.

2.4. Atividade biológica das isoformas do LHR

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

Das isoformas detectadas por Kawate et al. (2002) duas traduzem proteínas funcionais (receptores acoplados a proteína G) com afinidades distintas em relação aos ligantes. A isoforma completa (“full”) tem afinidade pelo LH e hCG, enquanto que a isoforma com deleção do exon 10 tem somente afinidade pelo hCG.

O exon 10 foi considerado essencial para o transporte do LHR humano até a membrana citoplasmática (ZHANG et al., 1998). Quando os transcritos alternativos perdem parte do exon 11, ocorre a síntese de um receptor truncado pela introdução de um códon de parada precoce (ROBERT et al., 2003, KAWATE, 2004). Esse LHR truncado não seria transportado até a

superfície celular, ficando aprisionado no citoplasma. Apesar de conservar a capacidade de ligação, essa isoforma truncada não está corretamente posicionada na membrana citoplasmática, além de não ser capaz de ativar a proteína G, portanto é afuncional (KAWATE et al., 2002, KAWATE, 2004).

Hipóteses de cooperação de dímeros, trímeros ou oligômeros de receptores, na obtenção de funcionalidade de receptores acoplados à proteína G (mediando o transporte da isoforma completa, apresentação do ligante ao receptor, ou o controle da biodisponibilidade do ligante), poderiam incluir uma função para as isoformas truncadas (ROESS et al., 2000a; PIERCE et al., 2002; ROBERT et al., 20003; NAKAMURA et al., 2004).

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

Uma tentativa prática para a ativação de qualquer isoforma de LHR, presente na superfície celular, seria a administração de hCG ou de ambos os ligantes (LH e hCG). Nogueira et al. (2005), induziram a ovulação de vacas superestimuladas com LH (controle) ou LH e hCG (tratado) e não observaram diferença significativa na produção total de estruturas ou de embriões viáveis.

2.5. “Down regulation” do LHR

A “down regulation” do LHR, é controlada por uma proteína ligadora deste receptor (LRBP) que é ativada, ou sintetizada, em resposta ao pico pré ovulatório de LH ou de doses farmacológicas de hCG (MENON et al., 2004). A ligação da LRBP com a região codificante do RNAm forma um complexo ribonucleoprotéico que inibe a tradução do LHR (NAIR & MENON, 2005).

Após a ligação do LH, ou do hCG, com o LHR, há aumento intracelular de AMPc que promove a ativação da esteroidogênese e a depleção

do colesterol ovariano. Paralelamente há aumento da transcrição de genes associados à síntese e transporte de colesterol do plasma para o interior da célula (MENON et al., 2006) ocasionando aumento intracelular do colesterol e regulação da esteroidogênese. Sob esta condição, a mevalonato quinase (MVK enzima descrita como LRBP que participa do metabolismo do colesterol) se liga ao RNAm que iria traduzir o LHR/hCGR e acelera sua degradação promovendo a “down regulation” do receptor (MENON et al., 2006). A expressão de RNAm de MVK e a proteína MVK foi induzida em resposta a tratamento prévio com hCG. Segundo este modelo, a “down regulation” é realizada muito mais pela rápida degradação do RNAm do LHR do que pela inibição da tradução do RNAm em LHR. Wang et al. (2007), estabeleceram uma participação direta da MVK regulando a expressão do LHR e sugeriram uma nova relação entre o metabolismo do colesterol e a expressão de LHR no ovário.

3. MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi realizado no município de Ribeirão do Sul, estado de São Paulo, Brasil (latitude 22°47'03" e longitude 49°56'01"). Foram utilizadas novilhas nulíparas Nelore puras de origem (PO; *Bos taurus indicus*, n=20), com faixa etária entre 20 a 24 meses, peso médio de 450 quilos, suplementadas (concentrado, PB: 16% e NDT: 60%) 2 vezes ao dia, em regime de pasto (*Coast cross*), com uma dieta de manutenção e acesso irrestrito a água e sal mineralizado. Para facilitar o manejo durante a caracterização do momento do desvio folicular, os animais foram numerados a fogo (1-20) e separados em 2 grupos (n=10, em cada grupo), sendo que estes, tiveram tratamentos idênticos. Dez dias após o término de avaliação de um grupo, iniciou-se o estudo do próximo.

3.1. Experimento 1- Etapa 1: Caracterização do momento do desvio de crescimento folicular.

Para que todas as novilhas estivessem em estágio de desenvolvimento folicular similar, foram submetidas ao seguinte protocolo de sincronização da ovulação: no D-10 receberam um dispositivo intravaginal liberador de progesterona, previamente utilizados por 8 dias (1,0 g, DIB[®], Syntex, Argentina), associado a aplicação de benzoato de estradiol (BE, 2,5 mg, Estrogin[®], via IM). O dispositivo intravaginal foi removido no D-3 e os animais receberam uma aplicação de PGF₂ α (d-cloprostenol, 500 μ g, Prolise[®], IM). Vinte e quatro horas mais tarde administrou-se 1,0 mg de BE (via IM) e a partir deste momento, o crescimento do folículo dominante foi acompanhado através de exame ultra-sonográfico (US), realizado a cada 12 horas (Figura 1)

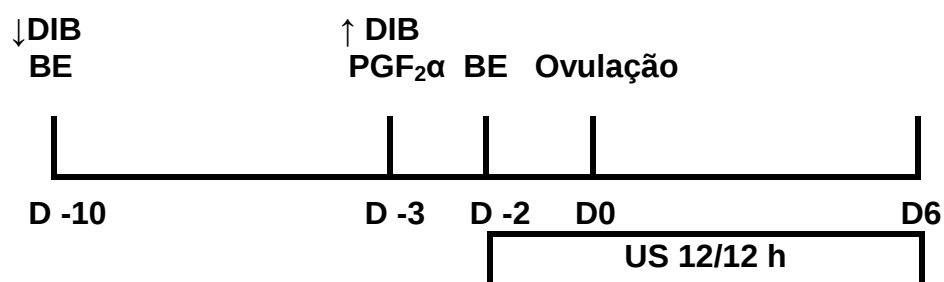


Figura 1. Protocolo de sincronização da ovulação e acompanhamento do desenvolvimento folicular ovariano em novilhas Nelore (DIB = Dispositivo Intravaginal Bovino, BE = Benzoato de estradiol, $\text{PGF}_{2\alpha}$ = Prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$, D = Dia, US = Exame Ultra-sonográfico, ↓ = inserção e ↑ = retirada).

3.1.2. Ultra-sonografia

Após a última aplicação de BE (D-2) o desenvolvimento dos folículos ≥ 1 mm de diâmetro foi acompanhado mediante US, realizada a cada 12 horas, até o sexto dia após a ovulação, de forma a permitir a identificação do início do desvio folicular.

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 a 9,0 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 dias sucessivos.

O momento do desvio de crescimento folicular foi caracterizado como o momento em que ocorreu a maior diferença na taxa de crescimento entre os dois maiores folículos da onda.

3.2. Etapa 2: Abate e remoção dos ovários e avaliação da expressão do LHR

Após a caracterização do desvio de crescimento folicular no experimento 1, as novilhas foram novamente sincronizadas com o protocolo citado acima e acompanhadas por US para identificar o momento da ovulação e separadas em 3 grupos: Grupo 2 dias após a ovulação (G2, n=6), 2,5 dias após a ovulação (G2,5, n=7) e 3 dias após a ovulação (G3, n=7). Nas novilhas do Grupo 2,5 e 3, o protocolo de sincronização da ovulação teve início 12 e 24 horas mais tarde em relação as novilhas dos grupos 2, respectivamente, para permitir que os ovários dos animais pudessem ser removidos nos dias 2,0, 2,5 e 3,0 pós-ovulação.

As novilhas utilizadas no Experimento 2, não foram as mesmas descritas na caracterização do desvio folicular (Experimento 1, realizado no período entre dezembro/06 e março/07). Neste experimento 1, após a obtenção dos ovários das novilhas utilizadas no estudo do desvio folicular, a obtenção das células da granulosa foi realizada por meio de raspagem, com pipeta de Pasteur adaptada, da cavidade folicular. Quando as amostras de células da granulosa foram analisadas por RT-PCR, observou-se que a maioria estava contaminada com células da teca, restando apenas o material de 4 novilhas que compunham o grupo 3. Portanto, outro lote composto por 21 novilhas Nelore PO foi utilizado para a análise da expressão do LHR (Experimento 2, outubro/07).

As novilhas do experimento 2 foram abatidas, durante 3 dias consecutivos no Frigorífico Beira Rio, município de Santa Cruz do Rio Pardo-SP, para a obtenção dos ovários no seguinte esquema: primeiro dia, G2 (12 horas antes do momento previsto para a ocorrência do desvio folicular, ou seja 2 dias após a ovulação), segundo dia, G2,5 (próximo ao momento do divergência folicular, 2,5 dias após a ovulação) e no terceiro dia, G3 (12 horas

após este momento, sendo que 2 novilhas (S e T) deste grupo, estavam a 5 dias após a ovulação, por terem antecipado a ovulação. Os animais foram embarcados às 4 horas e abatidos às 6 horas da manhã do mesmo dia.

3.2.1. Classificação folicular

Os folículos foram agrupados em 3 classes de acordo com o estágio do desenvolvimento folicular em que se encontravam no momento do abate: pré desvio, próximo ao momento do desvio e pós desvio folicular. Para cada novilha foram dissecados os dois ou três maiores folículos presentes em ambos os ovários.

3.2.2. Dissecação dos folículos

Os ovários foram acondicionados em sacos plásticos contendo solução fisiológica resfriada (4°C), colocados dentro de uma caixa térmica e levados ao laboratório (a 10 minutos do abatedouro). No laboratório, os folículos foram dissecados com o auxílio de pinças e tesouras lavadas em tubos corning de 50 mL contendo seqüencialmente: água destilada, solução RNaseZap Ambion® e água destilada novamente. Cada folículo foi mensurado com um paquímetro, avaliando-se o diâmetro médio entre a altura e o comprimento.

3.2.3. Obtenção do fluido folicular

O fluido folicular foi aspirado com agulha de calibre 25x10 mm acoplada a seringa de 1,0 mL, e congelado inicialmente a -196°C, e posteriormente em freezer (Forma Scientific®) a -80°C para posterior análise das concentrações de esteróides (estradiol e progesterona) por radioimunoensaio. Estas análises serão realizadas posteriormente a apresentação deste trabalho, devido ao atraso na entrega do KIT Estradiol

DSL-4400 (Diagnostics Systems Laboratoris, Texas, USA) e Progesterona DSL 3400 (Diagnostics Systems Laboratoris, Texas, USA).

3.2.4. Isolamento das células da granulosa

As células da granulosa foram isoladas por centrifugação do fluido folicular e lavagem da cavidade folicular. O fluido folicular foi aspirado com agulha de calibre 25x10 mm acoplada a seringa de 1,0 mL. A seguir, solução fisiológica estéril foi injetada e retirada da cavidade folicular repetidamente (cerca de 8 vezes) para recuperação das células murais e o “*cumulus oophorus*” (COC). Posteriormente, a solução foi centrifugada (3.300xg por 2 min) para concentrar as células e possibilitar a remoção da solução fisiológica. O “pellet” de células resultante foi imerso em 1 mL de solução Trizol, homogeneizado (homogeneizador de tecidos Polytron – UltraTurrax/T-25) por 1 minuto e congelado a -80°C para posterior extração de RNA total através do protocolo Trizol (Invitrogen®). A concentração do RNA total recuperado foi mensurada por espectrofotometria (Biophotometer-Eppendorf®).

3.3. Extração do RNA total

Assim que as amostras foram descongeladas, adicionou-se 200µl de clorofórmio nos tubos contendo o RNA com 1,0 mL de Trizol®. Após 15 segundos de agitação amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 2,5 minutos e centrifugadas a 7.300xg por 15 minutos a 4°C. O clorofórmio foi utilizado para separar a amostra em duas fases: uma orgânica e outra inorgânica ou aquosa. O halo branco é formado por proteínas e o rosa por DNA. O RNA total permanece solubilizado exclusivamente na fase aquosa, representada pelo sobrenadante transparente resultante da centrifugação.

Na etapa de precipitação do RNA total, a fase aquosa obtida anteriormente foi transferida para 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 foi centrifugada a 7.300xg durante 10 minutos à 4°C, formando um “pellet”.

O sobrenadante foi removido e o RNA foi lavado com 1 mL de etanol a 75% e novamente centrifugado a 7.300xg 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.

3.4. RT-PCR

A expressão do RNAm 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 1µg de RNA total foram incubadas com DNase (Invitrogen®). A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando-se iniciador (“primer”) oligo (dt), de acordo com o protocolo SuperScript III (Invitrogen®).

3.4.1. Protocolo DNase I

Conforme as instruções do protocolo DNase I - Amplification Grade (Invitrogen®), o RNA total destinado a reação de transcrição reversa foi transferido para microtubo estéril, onde acrescentou-se 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 à temperatura ambiente durante 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 gelo e imediatamente submetidas à reação de transcrição reversa.

3.4.2. Reação de transcrição reversa (RT)

Para a reação de transcrição reversa, foi utilizado o kit SuperScript III (Invitrogen®), cujo protocolo iniciou-se pela adição em microtubo estéril 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 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 1µl (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.

3.4.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do LHR foram delineados com base na seqüência para o gene bovino disponível no GenBank (acesso MM_174381, descrito por NOGUEIRA et al., 2007, Tabela 1). O oligonucleotídeo iniciador “sense” foi posicionado no exon 9 e o “anti-sense” no exon 11 (Figura 2), a fim de amplificar todas as regiões do receptor. As 4 isoformas do LHRB pesquisadas foram: M1 (forma completa do gene “full length”), M2 (deleção do exon 10), M3 (deleção da porção proximal do exon 11) e M4 (deleção do exon 10 e parte da porção proximal do exon 11). “Primers” para o gene GAPDH foram incluídos no RT-PCR, já que a expressão deste gene foi utilizada como referência para a quantificação da expressão dos receptores

de LH (técnica semiquantitativa). A fim de detectar a contaminação das amostras de células da granulosa com as da teca, investigou-se a expressão da CYP17, característica das células da teca (Tabela 1). As amostras que apresentaram contaminação foram descartadas do experimento de quantificação da expressão gênica do LHR (Figura 6).

Para a amplificação desses transcritos pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizou-se o protocolo Platinum TaqDNA Polimerase Invitrogen®. Ao produto (0,5 uL cDNA) foi acrescentado: 2,5 µL de tampão PCR 10X (fornecido no Kit - Invitrogen®); 0,75 µL de MgCl₂ (50mM); 0,5 µL de dNTP Mix (0,2mM); oligonucleotídeos iniciadores “sense” e “antisense”; 1,25 uL de Platinum Taq DNA polimerase; água destilada autoclavada para completar 25 µL. 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).

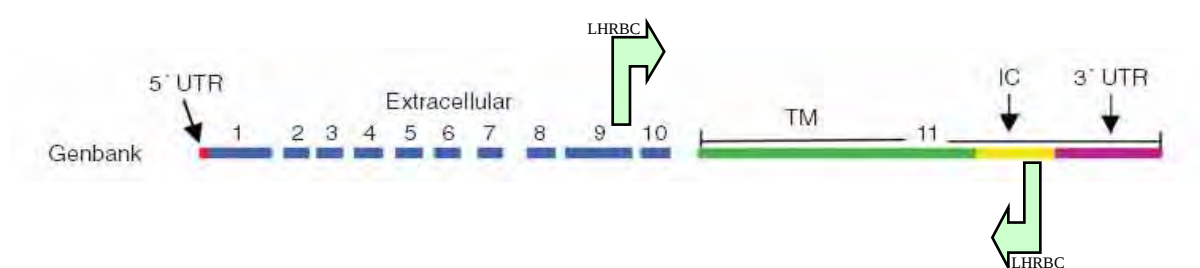


Figura 2- Estrutura e disposição dos exons no gene codificador do LHR. Os números (1 a 11) indicam os exons; TM = domínio transmembrânico; IC = região intracelular; UTR = região não traduzida.

Tabela 1 – Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do GAPDH, M1, M2, M3 e M4 e da 17 α hidroxilase.

Gene Alvo	Seqüência	Fragmento
GAPDH	S 5`tgt tcc agt atg att cca ccc 3'	850 pb
	A 5'tcc acc acc ctg ttg ctg 3'	
LHR		1240 pb (M1)
	S 5'aaa ctt gcc aac aaa cga 3'	1159 pb (M2)
	A 5'ata gca agt ctt gtc cag ga 3'	975 pb (M3)
		894 pb (M4)
17 α hidroxilase (CYP 17)	S 5'gaa tgc ctt tgc cct gtt ca3'	330 pb
	A 5'cgc gtt tga aca caa ccc tt3'	

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

3.4.5. 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 (1 μ g/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 UV e digitalizados no equipamento ImageMaster (PharmaciaBiotech®) para posterior análise por densitometria das bandas.

3.5 Comparação entre as medidas foliculares obtidas pelo US e paquímetro

Para comparar os diâmetros foliculares obtidos através de exames ultra-sonográficos com aqueles oriundos de mensurações realizadas com

um paquímetro, folículos provenientes de ovários de abatedouro foram dissecados e mensurados pelos dois métodos. Cada ovário (n=14) foi colocado dentro de um saco plástico transparente contendo gel (Carbogel[®], Brasil) e o transdutor era movimentado sobre a superfície do saco plástico para obtenção das imagens e mensuração do diâmetro folicular. Os folículos selecionados foram divididos em 2 grupos: grupo F5 (diâmetro folicular $4,9 \pm 0,34\text{mm}$, n=7) e grupo F9 (diâmetro folicular $9,1 \pm 0,36\text{mm}$, n=7). A seguir, os mesmos folículos utilizados na ultra-sonografia foram dissecados e o diâmetro dos mesmos foi aferido com um paquímetro (com escala de 1 mm).

3.6 Análise Estatística

A determinação do momento esperado para a ocorrência do desvio ou divergência folicular, bem como o diâmetro dos dois maiores folículos neste momento, foi realizado de duas formas: 1) através de análise visual do gráfico de cada novilha, contendo os dados sobre o crescimento dos dois maiores folículos ovarianos e 2) por meio do modelo matemático de Regressão Linear Segmentada descrito por BERGFELT et al. (2003). Para testar se houve diferença estatística ou não entre os resultados obtidos através da análise visual (1) ou por meio do modelo matemático (2) e a taxa de crescimento entre os dois maiores folículos antes do momento do desvio, utilizou-se o Test-t de Student. Para as comparações entre as medidas foliculares obtidas pelo US e o paquímetro foi utilizado o Test-t de Student

Para a expressão dos receptores do LH, as comparações foram feitas entre os grupos 2,5 e 3,0, uma vez que no grupo 2 essa expressão foi nula. A comparação entre os grupos 2,5 e 3,0 foi realizada por meio de análise de variância e os dados transformados em Log (X+0,1). As comparações entre as quatro isoformas do LHR foram feitas através de análise de medidas repetidas. Foram consideradas significativas as diferenças com valor de $p < 0,05$. A análise foi realizada utilizando o programa SAS (Intitute, Cary, NC).

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização do momento do desvio folicular (experimento1)

Das 20 novilhas utilizadas inicialmente no experimento 1, 5 não ovularam e 5 perderam condição corporal (aproximadamente 1 ponto de escore corporal, na escala 1-5, LOWMAN, 1976) durante as avaliações ultrasonográficas, conseqüentemente, foram excluídas do experimento.

O uso do método gráfico forneceu resultados semelhantes aos obtidos por meio de regressão linear segmentada (Tabela 2). Ao analisar retrospectivamente os diagramas de cada novilha (n=10), observou-se o surgimento de um grupo de folículos (em média $10,2 \pm 4,08$ folículos por novilha), doze horas antes da ovulação, caracterizando a emergência de uma onda folicular. Neste momento, os diâmetros médios do maior folículo e dos demais folículos, foram de $2,7 \pm 0,11$ mm e $2,2 \pm 0,21$ mm. No momento da ovulação (ou seja, 12 horas após a observação da emergência), o número de folículos recrutados aumentou para $14,9 \pm 2,96$.

Em 80% (8) das novilhas o futuro folículo dominante era maior folículo ($2,67 \pm 0,09$ mm) que os subordinados ($2,02 \pm 0,1$ mm, $p < 0,001$) já na emergência da onda, ou seja, 12 horas após a ovulação.

O desvio de crescimento folicular ocorreu $2,3 \pm 0,21$ dias após a ovulação e os diâmetros foliculares foram de $5,3 \pm 0,21$ e de $4,9 \pm 0,05$ mm, para o folículo dominante e subordinado, respectivamente (regressão linear segmentada, Figura 3 e Tabela 2). Nas novilhas 6 e 5, a ocorrência da divergência folicular foi atípica em relação as demais, ocorrendo 1,5 e 4 dias após a ovulação, respectivamente.

A taxa de crescimento, determinada a partir de 12 horas antes da ovulação até o momento do desvio folicular, foi semelhante entre o futuro folículo dominante ($0,53 \pm 0,15$ mm) e o maior folículo subordinado ($0,53 \pm 0,22$ mm).

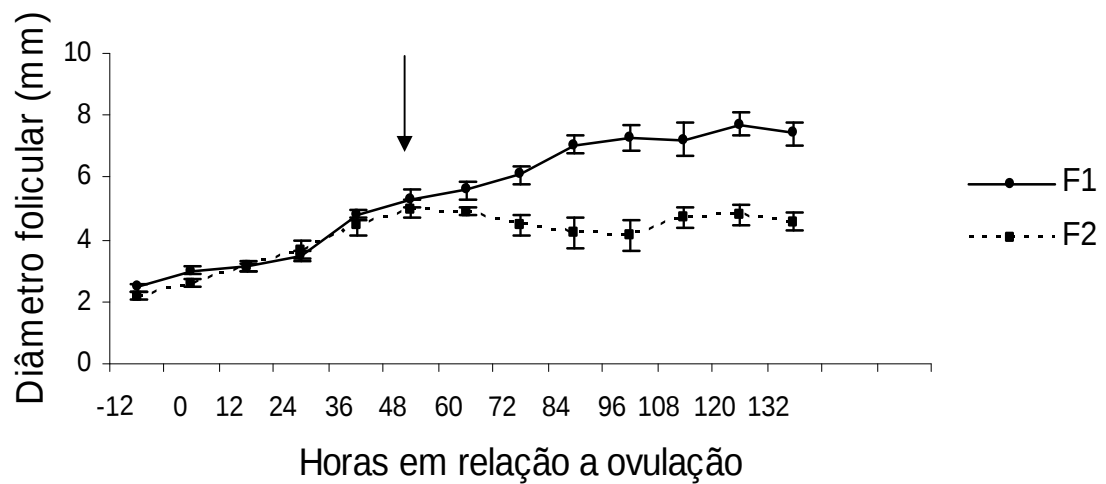


Figura 3 - Diâmetro ($\pm$ EPM) dos dois maiores folículos (F1 = folículo dominante e F2 = folículo subordinado) da onda de crescimento folicular, a partir de 12 horas antes da ovulação (- 12) até 132 horas após. Momento do desvio de crescimento folicular indicado pela seta.

Tabela 2- Momento do desvio (dias após a ovulação) e diâmetro folicular (mm) determinados pelo método gráfico ou por regressão linear segmentada, em novilhas Nelore. FD = folículo dominante, EPM = erro padrão da média.

Novilha	Método gráfico		Regressão linear segmentada	
	dias após ovulação	FD (mm)	dias após ovulação	FD (mm)
2	2,5	4,7	2	4,6
4	2	5,6	1,9	5,6
5	4	6,3	3,8	6,4
6	1,5	4,3	1,5	4,2
9	2	6,5	2	6,5
10	2	5	2	5,1
11	2	6,5	2	6,5
12	2,5	5	2,4	4,8
14	2,5	5,2	2,6	5
15	2	4,4	2,2	4,6
Média±EPM	2,3±0,21	5,3±0,21	2,24±0,19	5,36±0,27

Não houve diferença significativa entre os grupos (método gráfico vs regressão linear segmentada), Teste-t ($p>0,05$)

4.2. Avaliação da expressão do LHR (experimentos 1 e 2)

O grupo 2 era composto por 6 novilhas, porém, o animal S, antecipou a ovulação em 48 horas e passou para o grupo 3. Portanto, restaram 5 novilhas neste grupo. Das 7 novilhas do grupo 2,5, 2 não ovularam e as amostras dos folículos de outra não expressaram GAPDH e foram excluídas do experimento (restaram 4 novilhas neste grupo). Das 8 novilhas do grupo 3, as amostras de duas delas foram negativas para o GAPDH e, conseqüentemente, essas novilhas foram retiradas do grupo. Além das amostras da novilha 13, as de outras 4 novilhas oriundas do experimento 1 (novilhas N, O, P e Q), foram incluídas neste grupo (número total de novilhas do grupo 3 = 11).

No grupo 2 não foi detectada expressão de nenhuma isoforma de LHR nos 6 folículos oriundos dos 5 animais deste grupo apesar destes folículos expressarem o GAPDH. Já nos animais do grupo 2,5 (n=4), dos 8 folículos examinados, 4 foram classificados como dominantes e destes, dois (50%) expressaram LHR. Por outro lado, 63,63% dos folículos do grupo 3 classificados como dominantes (n=11) expressaram LHR (Tabela 03 e Figura 7).

Nos folículos classificados como dominantes, de acordo com o exame ultra-sonográfico realizado no dia da ovulação, não houve diferença significativa na porcentagem de folículos que expressaram o RNAm do LHR ($p=0,74$) nos folículos provenientes dos grupos 2,5 e 3,0 (Figura 4).

Em todas as outras amostras foliculares que expressaram o receptor do LH, as quatro isoformas estiveram presentes, exceto um folículo da novilha N, que não expressou a isoforma M4 (Tabela 3).

A expressão das isoformas M1 e M3 foi detectada com maior intensidade do que as M2 e M4 ($p < 0,001$, Figura 5).

Tabela 3- Identificação da novilha, grupo experimental, diâmetro folicular (mm) e porcentagem de expressão relativa ao GAPDH das isoformas do LHR (M1 a M4) nas células da granulosa, obtidas de novilhas da raça Nelore sacrificadas 2 (G2), 2,5 (G 2,5 e 3,0 (G3) dias após a ovulação.

Novilha	Grupo	Folículo(mm)	Isoformas do LHR			
			M1	M2	M3	M4
A	2	5,5	-	-	-	-
B	2	5,5	-	-	-	-
B	2	4,5	-	-	-	-
C	2	5,5	-	-	-	-
D	2	5	-	-	-	-
E	2	6,7	-	-	-	-
F	2,5	7	60,23	17,09	51,70	8,09
F	2,5	6	-	-	-	-
G	2,5	7	20,26	2,97	15,08	2,88
G	2,5	5	-	-	-	-
H	2,5	7	-	-	-	-
H	2,5	6	-	-	-	-
I	2,5	7	-	-	-	-
I	2,5	6,2	-	-	-	-
J	3	7	-	-	-	-
J	3	9	35,25	17,55	26,91	12,95
K	3	9	-	-	-	-
L	3	7	-	-	-	-
L	3	8	37,40	12,40	32,71	11,40
M	3	7	-	-	-	-
N ⁺	3	10	13	1	7	0
N ⁺	3	5	-	-	-	-
O ⁺	3	8,5	57	16	47	7
O ⁺	3	6	-	-	-	-
P ⁺	3	6,5	-	-	-	-
P ⁺	3	8,2	-	-	-	-
Q ⁺	3	7,5	10	3	6	1
Q ⁺	3	5	-	-	-	-
R	3	10	59,15	25,97	55,68	22,53
R	3	7	-	-	-	-
S	3	14	100,64	19,13	63,61	14,06
S	3	8	11,40	3,03	5,82	2,82
T	3	11	-	-	-	-
T	3	6	-	-	-	-

⁺ Novilhas provenientes do experimento 1

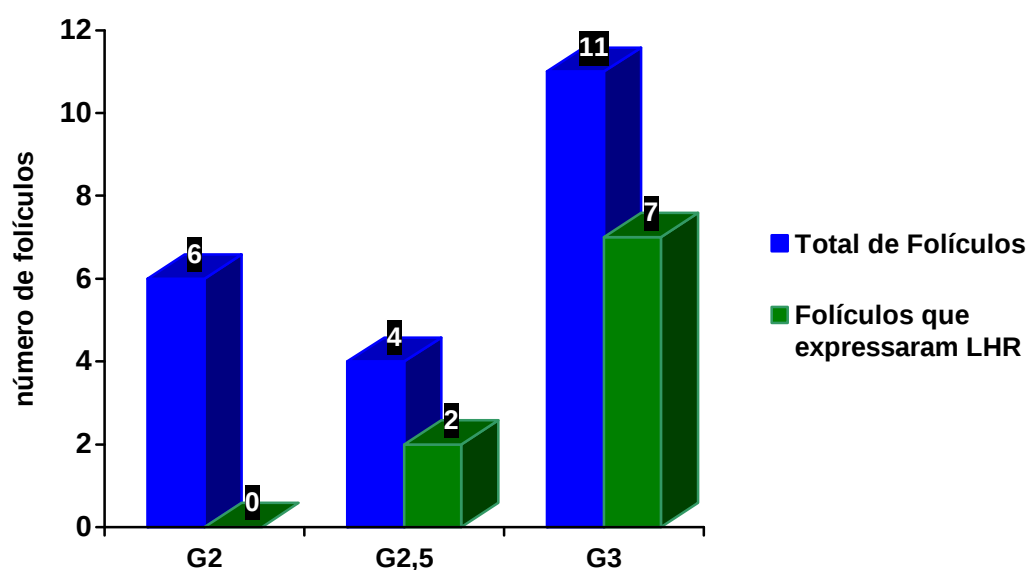


Figura 4 – Total de folículos por grupo de novilhas da raça Nelore sacrificadas 2 (G2), 2,5 (G 2,5 e 3,0 (G3) dias após a ovulação e quantidade de folículos que expressaram LHR ($p=0,74$).

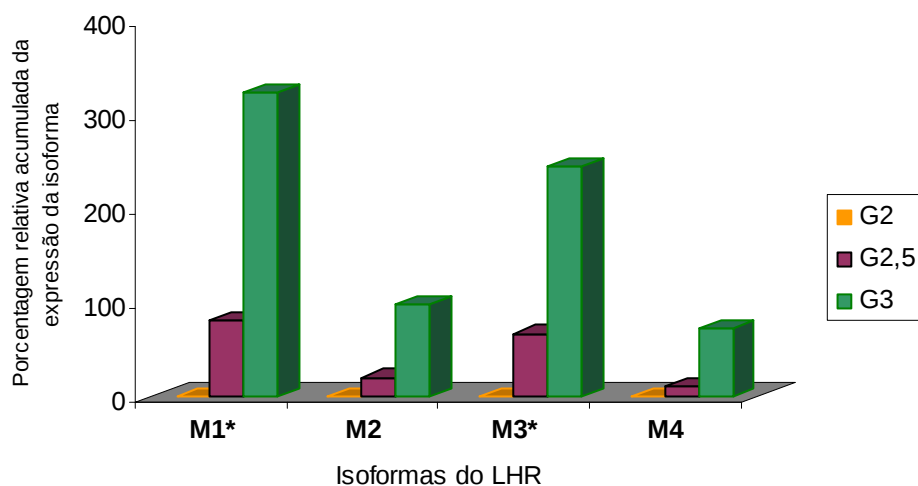


Figura 5 – Porcentagem relativa acumulada da expressão das quatro isoformas do LHR (M1, M2, M3 e M4) nas células da granulosa dos folículos dos Grupos de novilhas da raça Nelore sacrificadas 2 (G2), 2,5 (G 2,5 e 3,0 (G3) dias após a ovulação.

* A expressão das isoformas M1 e M3 foi detectada com maior intensidade do que as M2 e M4 ($p < 0,001$).

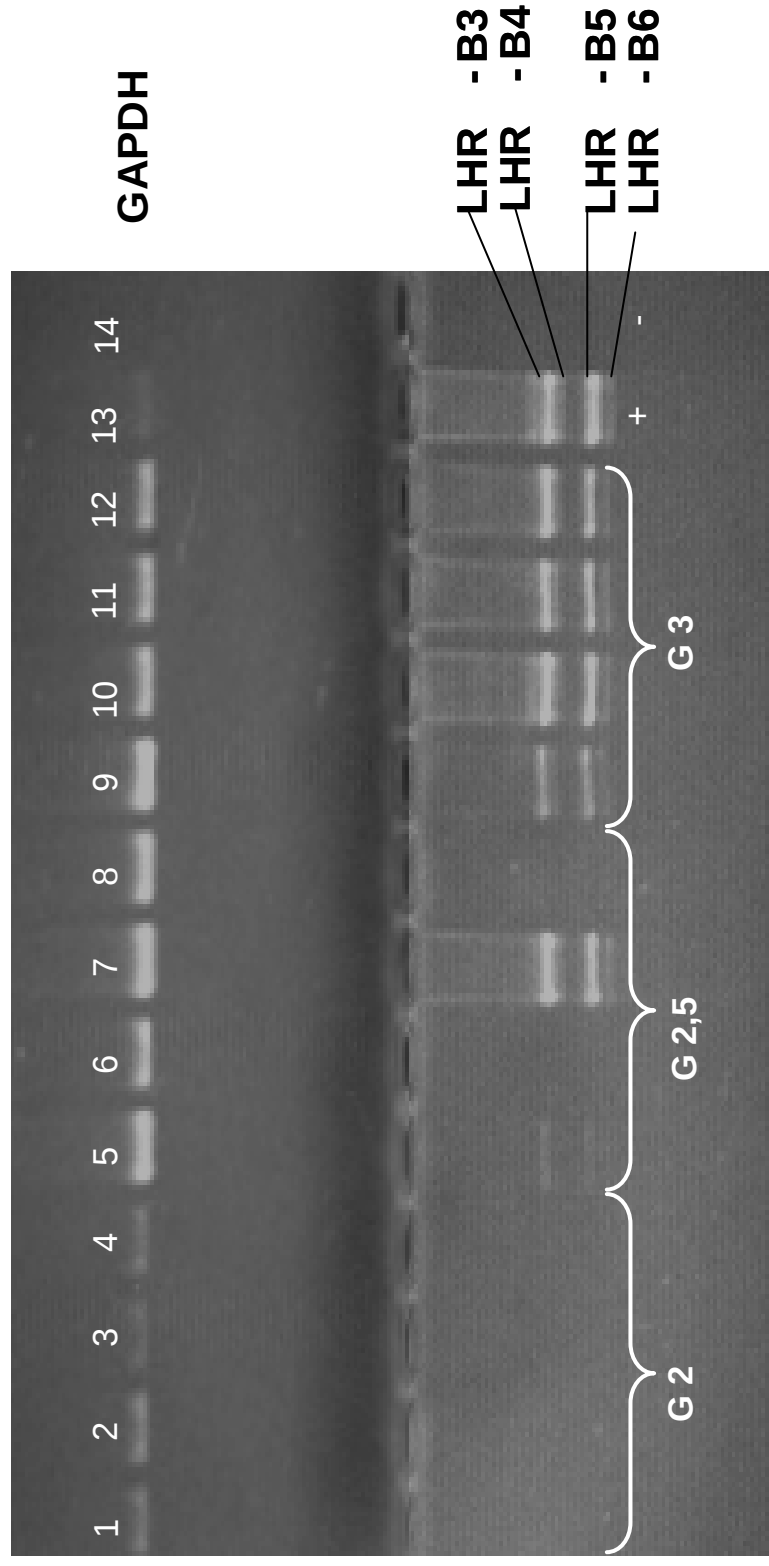


Figura 7 - Imagem ilustrativa de gel de agarose a 3,0%, corado em solução de brometo de etídio. Podem ser visualizadas bandas correspondentes à amplificação com iniciadores específicos para o GAPDH (850pb) e da isoformas LHRB3 (1240 pb), LHRB4 (1159 pb), LHRB5 (975 pb) e LHRB6 (894pb) nos grupos de folículos de novilhas Nelore abatidas 2 dias (Grupo G2), 2,5 dias (Grupo G2,5) e 3 dias (Grupo G3) após a ovulação. Controle positivo (+) e controle negativo (-).

4.3. Comparação entre as medidas foliculares obtidas por meio de ultra-sonografia vs paquímetro

Os folículos selecionados pela ultra-sonografia foram divididos em 2 grupos: grupo F5 (diâmetro folicular = $4,9 \pm 0,34$ mm, n = 7) e grupo F9 (diâmetro folicular = $9,1 \pm 0,36$ mm, n = 7) e, a seguir, foram dissecados e mensurados com o auxílio de um paquímetro. Os diâmetros foliculares determinados por meio de ultra-sonografia foram significativamente inferiores aos determinados com paquímetro (Tabela 4).

Tabela 4- Grupos de folículos (F5 e F9), diâmetro folicular (mm) obtido por meio de ultra-sonografia (US) ou com auxílio de um paquímetro e, diferença (mm) entre as mensurações obtidas pela US e pelo paquímetro.

GRUPO F5			GRUPO F9		
US (mm)	Paquímetro (mm)	Diferença (mm)	US (mm)	Paquímetro (mm)	Diferença (mm)
4	5,3	1,3	10,1	11,2	1,1
4,1	5,6	1,5	9,7	10,5	0,8
4,8	6	1,2	8,8	10,3	1,5
6,2	7,5	1,3	7,5	9	1,5
5,3	5,9	0,6	8,4	10	1,6
5,9	7	1,1	9,5	10,6	1,1
4	5,3	1,3	10,1	11,2	1,1
⁺ $4,9 \pm 0,34^b$	$6 \pm 0,32^c$	$1,18 \pm 0,10^a$	$9,1 \pm 0,36^d$	$10,4 \pm 0,28^e$	$1,24 \pm 0,10^a$

⁺Média $\pm$ EPM

^{a-e} Valores com sobrescritos diferentes, diferem entre si ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

Neste experimento, a emergência da onda de crescimento folicular ocorreu 12 horas antes da ovulação, caracterizada pelo recrutamento de um grupo de folículos $\geq 1,8$ mm. De maneira semelhante, Jaiswal et al. (2004), observaram o aparecimento de um grupo de folículos de 1 a 3 mm, 48 horas antes da ovulação. Entretanto, estudos anteriores, definem como emergência da onda, o momento da visualização de folículos ≥ 3 mm, 24 horas após a ovulação (GINTHER et al., 1996; SARTORELI et al., 2005; CASTILHO et al., 2007). A disparidade entre esses dados pode ser explicada pelos aparelhos de ultra-som utilizados nos experimentos anteriores. Tanto neste experimento, como no de Jaiswal et al. (2004), os exames ultrasonográficos foram realizados com transdutor de 9,0 MHz que permite a visualização de folículos com $\geq 1,0$ mm, o que não é possível com aparelhos com probes de 5 a 7,5 MHz, utilizados nos outros estudos.

A detecção do grupo de folículos de 1 a 3 mm, descritos por Jaiswal et al. (2004) coincidiu com o início do aumento das concentrações de FSH. De fato, a emergência da primeira onda folicular ocorre antes da ovulação, pois, segundo Adams et al. (1992) o aumento nas concentrações de FSH, inicia-se entre 2 e 4 dias (~48 a 96 h) antes da detecção ultra-sonográfica de folículos ≥ 4 mm, Além disso, vários trabalhos, *in vitro*, têm demonstrado que pequenos folículos antrais, com apenas uma camada de células da granulosa são responsivos ao FSH (RICHARDS & MIDGLEY, 1976, FRICKE et al., 1997; TANAKA et al., 2001).

O intervalo entre a ovulação e o desvio folicular encontrado neste estudo foi de 2,3 dias, com o maior folículo medindo 5,3mm e o segundo maior 4,9mm. Estes dados estão de acordos com os descritos anteriormente na raça Nelore, (desvio folicular 2,4 a 2,8 dias após ovulação e maior folículo medindo entre 5,4 a 6,2 mm; SARTORELLI et al., 2005; CASTILHO et al., 2007, GIMENES et al., 2008). Entretanto, em novilhas da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*) apesar do desvio folicular ocorrer 2 a 3 dias após a ovulação, o diâmetro do maior folículo (futuro folículo dominante = 8,5 mm) é cerca de 2,5 mm maior que o observado na raça Nelore, enquanto que o segundo maior folículo possui 7,2 mm no momento do desvio (GINTHER et al., 1996).

No presente trabalho, na emergência da onda folicular, o futuro folículo dominante, já era maior (2,67mm) que os demais folículos (2,02mm) da onda, o que lhe garantiu, no momento do desvio, uma vantagem de 0,4mm de diâmetro. De maneira semelhante, em novilhas Hereford cruzadas, o futuro folículo dominante, foi detectado com 1 mm no momento da emergência antes que os demais do grupo fossem visualizados; e no momento do desvio, o diâmetro deste folículo foi 0,7 mm maior do que os demais folículos (JAISWAL et al., 2004). No entanto, em novilhas Nelore, Castilho et al. (2007), não observaram diferença em tamanho nos dois maiores folículos da onda no momento de desvio (5,4 vs 5,3 mm).

A média de crescimento (0,5 mm a cada 12 h) foi semelhante entre o futuro folículo dominante e seu subordinado até o momento do desvio. Dados semelhantes são mencionados em estudos com a raça Nelore (SARTORELLI et al., 2005; CASTILHO et al., 2007). Em novilhas Holandesas, a média de crescimento foi de 0,5 mm a cada 8 horas (GINTHER et al., 2003).

As disparidades encontradas entre zebuínos e taurinos, quanto ao tamanho folicular e o momento do desvio, não estão bem elucidadas, porém podem ser decorrentes de interferências de fatores raciais, climáticos, nutricionais.

Existem evidências na literatura de que a aquisição de receptores de LH (LHR, BODENSTEINER et al., 1996, BEG et al., 2001) é importante para a manutenção do folículo selecionado após a diminuição nos níveis sanguíneos de FSH. Além disso, discute-se também a possível participação do LH no início do processo de desvio folicular. Segundo Ginther et al. (2001), as células da granulosa do futuro folículo dominante adquirem receptores de LH pouco antes do início do desvio, os quais poderiam ser ativados pelo aumento transitório de LH.

Nos folículos do Grupo 2 (4,5 a 6,7 mm de diâmetro), não se detectou a expressão de LHR nas células da granulosa (0/6). Essa expressão, foi primeiramente detectada em 2 amostras provenientes de folículos com 7 mm de diâmetro, de duas novilhas (F e G) do grupo G2,5. Entretanto, é provável que nestas novilhas o momento do desvio tenha ocorrido antes do momento esperado (2,3-2,8 dias), a exemplo do que ocorreu com a novilha 6 (Experimento 1, 1,5 dias), e, conseqüentemente, estes animais já teriam

passado a fase de desvio folicular. Reforçando essa hipótese, a diferença de tamanho encontrada entre os dois maiores folículos na novilha G foi de 2 mm, indicando que a dominância morfológica já estava bem definida, no momento da obtenção de seus folículos. Por outro lado, as células da granulosa dos folículos das novilhas H e I (ambos com 7 mm), não expressaram LHR, possivelmente por ainda não terem atingido o momento do desvio folicular. Estas suposições poderão ser comprovadas após a determinação das concentrações de estradiol e progesterona no fluido folicular, uma vez que a relação estradiol/progesterona permite distinguir os folículos dominantes dos atresícos.

No presente trabalho, o fato de não se ter observado a expressão do LHR em nenhuma amostra do grupo 2 (0/6), evidencia que a aquisição de tais receptores, nas células da granulosa, ocorre somente em folículos com ≥ 7 mm. Estes dados corroboram os já descritos em animais anelados (a expressão do LHR foi primeiramente detectada em folículos de 7mm; NOGUEIRA et al. 2007) e também em novilhas Hereford (expressão ocorrendo em folículos a partir de 9mm, XU et al., 1995). No entanto, contrariam a hipótese levantada por Beg et al. (2001), segundos os quais a expressão dos receptores de LH nas células da granulosa do futuro folículo dominante ocorreria cerca de 8 h antes do desvio folicular. Considerando-se esta hipótese (Beg et al., 2001), no presente trabalho a expressão do LHR deveria estar ocorrendo 8 h antes do desvio, ou seja, em folículos com diâmetro inferior a 5,4 mm, que corresponderia as amostras do Grupo 2. Entretanto, como as mensurações dos diâmetros dos folículos utilizados para detecção do LHR, foram feitas com paquímetro, que forneceu resultados em média 1,18 mm maiores que as obtidos pelo ultra-som, o diâmetro de 5,4 mm obtido por meio de ultra-sonografia corresponderia a 6,6 mm do paquímetro, ou seja, após ocorrência do desvio folicular em novilhas Nelore.

Ainda existe controvérsia na literatura com relação ao papel do LH no processo de desvio folicular. Parte do problema se deve às diferentes técnicas utilizadas para detectar o RNAm para LHR (hibridização *in situ* vs RT-PCR) e a validação das mesmas para as diferentes isoformas do receptor de LH. Evans & Fortune (1996), não observaram o RNAm do LHR nas células da granulosa do folículo dominante ou do maior folículo subordinado no segundo e terceiro

dias da onda folicular (momento do desvio), ao utilizarem técnica de hibridização *in situ*. Utilizando esta mesma técnica, Yuan et al. (1998) observaram expressão de LHR somente em folículos ≥ 9 mm, 60 horas após a emergência da onda. Entretanto, por RT-PCR, a expressão do LHR foi confirmada em folículos com 8 mm de diâmetro, o que corresponde, a 8 horas antes do momento esperado para a ocorrência do desvio de crescimento folicular em taurinos (BEG et al., 2001).

Apesar do mecanismo preciso para a seleção do folículo dominante ainda não estar completamente elucidado, sabe-se que durante este evento além do possível papel do LH e seus receptores, estão também envolvidos os fatores de crescimento semelhante a insulina (IGFs), que parecem desempenhar papel crítico neste processo. Os IGFs são sinérgicos ao FSH na promoção de crescimento folicular e produção de estradiol (FORTUNE et al., 2004). O aumento nas concentrações intrafoliculares deste esteróide, bem como os de ativina A e a diminuição dos níveis de IGFBP-2 e -4, estão relacionados a dominância folicular (GINTHER et al., 2002; KOJIMA et al., 2003).

A redução das proteínas ligantes de IGF (IGBPs) tem sido associada a aumento da atividade proteolítica da proteína sérica A associada a prenhez (PAPP-A, MONGET et al., 2003) e a expressão de seu RNAm é mais abundante no folículo dominante em crescimento nos bovinos do que em folículo pequenos não selecionados (FAYAD et al., 2004, FORTUNE et al., 2004). Além disso, a PAPP-A é responsável pela degradação de IGFBP-2, levando ao aumento da biodisponibilidade de IGF (MONGET et al., 2003). Embora não se tenha encontrado diferenças nas concentrações de IGF total de folículos dominantes em relação aos subordinados (DE LA SOTA et al., 1996), a concentração de IGF-I livre foi maior no fluido folicular do maior folículo comparado ao segundo maior da mesma onda, mesmo antes da observação de diferenças no diâmetro e na concentração de estradiol (BEG et al., 2002). Essas observações, sugerem a existência de um sistema modulador da disponibilidade de IGF intra-folicular, diferencialmente regulado em folículos dominantes e subordinados, o que permitiria ao maior folículo, ter uma dominância bioquímica antes do estabelecimento da dominância morfológica (FORTUNE et al., 2004).

O fato da expressão do LHR ter ocorrido nas células da granulosa de folículos $\geq 7\text{mm}$, reforça a hipótese de que a capacidade ovulatória folicular é adquirida após o desvio de crescimento folicular. Sartori et al. (2001), observaram que em vacas Holandesas, a administração de LH induziu 80% de ovulação nos animais com folículos $\geq 10\text{mm}$ e nenhuma resposta nas vacas com folículos de 7 ou 8,5 mm. No grupo de vacas com folículos de 7 e 8,5mm (tamanho folicular próximo ao momento de desvio) não houve ovulação. Em estudo similar realizado com a raça Nelore, a administração de LH exógeno promoveu ovulação em 90, 80 e 33% das novilhas com folículos $> 10\text{ mm}$, de 8,5 a 10 mm e de 7 a 8,4 mm, respectivamente (GIMENES et al., 2008). Em vacas Nelore, a administração de LH induziu ovulação em 90% dos animais com folículos entre 9 e 10 mm e 20% nas vacas com folículos entre 7,5 e 8,0 mm de diâmetro (comunicação pessoal, SIMÕES, R.A.L.)

Nas novilhas abatidas 3 dias após a ovulação (grupo 3, pós-desvio), foi possível determinar, de acordo com o diâmetro folicular, quais eram os folículos dominantes e subordinados. Nestes animais, 63,63% (7/11) dos folículos classificados como dominantes (7,5 a 14 mm) expressaram as 4 isoformas de LHR. Curiosamente, duas amostras de uma mesma novilha (novilha S), obtidas de um folículo de 8 e outro de 14 mm, expressaram o LHR. No entanto, quando se compara a concentração das isoformas (M1 a M4) presentes em ambos, nota-se que no menor folículo (8 mm) a intensidade de expressão foi menos acentuada em relação ao maior (14 mm). Uma possível explicação para este achado surpreendente seria a ocorrência de um processo de dominância apenas parcial, exercida pelo folículo de 14 mm, resultando numa atresia mais tardia do folículo de 8mm. Por outro lado, no folículo de 11 mm da novilha T, não foi detectada expressão de LHR. Este folículo poderia estar em atresia caso o animal apresentasse ciclo estral de três ou quatro ondas foliculares.

A presença dos 4 transcritos do LHR foi confirmada em todas as amostras que expressaram este receptor, exceto um folículo na novilha N, que não expressou a isoforma M4. Além disso, as isoformas M1 e M3 apresentaram maior intensidade de expressão em relação as M2 e M4, à semelhança dos resultados obtidos por Nogueira (2005a). O significado biológico deste predomínio de expressão das isoformas M1 e M3 ainda não é

conhecido. Entretanto, ABDENNEBI et al. (2002) relataram que em ovinos o transcrito com deleção do exon 10 e parcial do 11 (M4), foi mais expresso durante o anestro estacional, enquanto que durante a fase reprodutiva predominou a expressão do transcrito completo (M1) e sugeriram que esses dados poderiam explicar a estacionalidade reprodutiva na espécie ovina. Por outro lado, em primatas observou-se uma variação biológica, na expressão do LHR, em que o exon 10 é naturalmente perdido durante a transcrição (GROMOLL et al., 2003). A isoforma que apresenta deleção do exon 10 (M2), resulta em afinidade diminuída ao LH em relação ao hCG (Muller et al., 2003). O exon 10 foi considerado essencial para o transporte do LHR humano até a membrana citoplasmática (ZHANG et al., 1998). Quando os transcritos alternativos perdem parte do exon 11 (M3 e M4), ocorre a síntese de um receptor truncado pela introdução de um códon de parada precoce (ROBERT et al., 2003, KAWATE, 2004). Esse LHR truncado não seria transpostado até a superfície celular, ficando aprisionado no citoplasma. Apesar de conservar a capacidade de ligação, essa isoforma truncada não está corretamente posicionada na membrana citoplasmática, além de não ser capaz de ativar a proteína G, portanto é afuncional (KAWATE et al., 2002, KAWATE, 2004).

6. CONCLUSÕES

1) Em novilhas Nelore, a emergência da onda de crescimento folicular ocorre 12 horas antes da ovulação, sendo que neste momento o futuro folículo dominante já era 0,4mm maior em relação aos seus contemporâneos.

2) O desvio de crescimento folicular ocorre em média, 2,3 dias após a ovulação e os diâmetros do maior e do segundo maior folículos neste momento, foram de 5,4 e 4,9mm, respectivamente.

3) As medidas foliculares obtidas por meio de paquímetro, são em média, 1,18mm maiores daquelas obtidas por ultrasonografia.

4) A expressão das isoformas de LHR ocorre nas células da granulosa de folículos antrais, a partir do momento do desvio folicular.

7- REFERÊNCIAS*

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.127-135, 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.819-826, 2002.

ADAMS G.P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC, J.P.; KO, J.C.; GINTHER, O.J. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence follicular waves in heifers. *J. Reprod. Ferti.*, v.94, p.177-188, 1992.

ADAMS, G.P., JAISWALL, R., SINGH, J., MALHI, P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, v.69, p.72-80, 2008.

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. *Endoc.* ,v.140, p.1775-1782, 1999.

ARMSTRONG, D.G.; WEBB, R. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Review of Reproduction*, v.2, p.139-146, 1997.

ASCOLI, M.; FANELLI, F.; SEGALOFF, D. The lutropin/choriogonadotropin receptor, a perspective. *Endocrinol. Rev.*. p.141-174, 2002.

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

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 wave of the bovine estrous cycle. *Biol. Reprod.*, v.64, p.839-848, 2001.

BACICH, D.J., EARL, C.R., O'KEEFE, D.S., NORMAN, R.J., RODGERS, R.J. Characterization of the translated products of the alternatively spliced luteinizing hormone receptor in the ovine ovary throughout the oestrus cycle. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v.147, p.113-124, 1999.

BAO, B.; GARVERICK, H.A.; MITH, G.W.; SMITH, M.F.; SALFEN, B.E.; YOUNGQUIST, R.S. Changes in messenger ribonucleic acid (mRNA) encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. *Biology of Reproduction*, v.56, p.1158-1168, 1997.

BAO, B., GARVERICK, H.A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicle during ovarian follicular waves: a review. *J. Anim. Sci.*, v.76, p.1903-1921, 1998.

BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; KOT, K.; WILTBANK, M.C.; GINTHER, O.J. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biology of Reproduction*, v.64, p.432-441, 2001.

BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; KOT, K.; GINTHER, O.J. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. *Biology of Reproduction*, v.66, p.120-126, 2002.

BERGFELT, D.R.; SEGO, L.H.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Calculated follicle deviation using segmented regression for modeling diameter differences in cattle. *Theriogenology*, v.59, p.1811-1825, 2003.

BERISHA, B., SCHAMS, D., KOSMAN, M., AMSELGRUBER, W., EINSPIANIER, 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.371-382, 2000.

BERISHA, B.; SINOWATZ, F.; SCHAMS, D. Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family members during the final growth of bovine ovarian follicles. ,. v.67, p.162-171, 2003.

BODENSTEINER, K.J.; WILTBANK, M.C.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Alterations in follicular estradiol and gonadotropin receptors during development of bovine antral follicles. *Theriogenology*, v.45, p.499-512, 1996.

BURATINI JR, J., PRICE, C.A., VISINTIN, J.A., BÓ, G.A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (Bos indicus) heifers. *Theriogenology*. v.54, p.421-31, 2000.

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.453-461, 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., SMITH, L.C., WATSON, A.J. Effect of serum and cumulus cells expansion on marker gene transcripts in bovine cumulus-oocyte complexes during maturation in vitro. *Fertil. Steril.*, v.83, p.1077-1085, 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, p189-196, 2007.

EVANS, A.C.O.; FORTUNE, J.E. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinology*, v.138, p.2936-2971, 1997.

DE LA SOTA, R.L.; SIMMEN, F.A.; DIAZ, T.; THATCHER, W.W. Insulin-like growth factor system in bovine first-wave dominant and subordinate follicles. *Biology of Reproduction*, v.55, p.803-812, 1996.

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 development during follicular waves in cattle. *Biology of Reproduction*, v.70, p.1475-1484, 2004.

FAYAD, T.; LÉVESQUE, V.; SIROIS, J.; SILVERSIDES, D.W.; LUSSIER, J.G. Gene expression profiling of differentially expressed genes in granulosa cells of bovine dominant follicles using suppression subtractive hybridization. *Biology of Reproduction*, v.70, p.523-533, 2004.

FORTUNE, J.E., SIROIS, J., QUIRK, S.M. The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine estrous cycle. *Theriogenology*. v.29, p.95-109, 1988.

FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; EVANS, A.C.; TURZILLO, A.M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biology of Reproduction*, v.65, p.648-654, 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.

FREDRIKSSON, R.; LAGERSTRÖM, M.C.; LUNDIN, L.G.; SCHIÖTH, H.B. The G-protein-coupled receptors in the human genome from five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.*, v.63, p.1256-1272, 2003.

FRICKE, P.M.; AL-HASSAN, M.J.; ROBERTS, A.J.; REYNOLDS, L.P.; REDMER, D.A.; FORD, J.J. Effect of gonadotropin treatment on size, number, and cell proliferation of antral follicles in cow. *Domest Anim Endocrinol.*, v.14, p.171-180, 1997.

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.1263-1276, 2005.

GASTAL, E.L.; GASTA, M.O.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Interrelationships among follicles during the common-growth phase of a follicular wave and capacity of individual follicles for dominance in mares. *Reproduction*, v.128, p.417-422, 2004.

GETHER, U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocrinol. Rev.*, v.21, p.90-113, 2000.

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

GINTHER, O.J.; KOT, K.; KULICK, L.J.; WILTBANK, M.C. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular wave in cattle. *Theriogenology*, v.48, p75-87, 1997.

GINTHER, O.J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim Reprod Sci.* v.60, p.61-79, 2000.

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

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; KOT, K. Activin A, estradiol and free insulin-like growth factor I in follicular fluid preceding the experimental assumption of follicle dominance in cattle. *Biology of Reproduction*, v.67, p.14-19, 2002.

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.239-257, 2003.

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

GROMOLL, J., WISTUBA, J., TERWORT, N., GODMAN, 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. *Biology of Reproduction*, v.69, p.75-80, 2003.

HERRLICK, A., KÜHN, B., GROSSE, R., SCHMID, A., SCHULTZ, G., GUDERMANN, T. Involvement of G_s and G_i proteins in dual coupling of the luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phospholipase C. *J. Biol. Chem.*, v.271, p.16764-16772, 1996.

HORVAT, R.D., NELSON, S., CLAY, C.M., BARISAS, B.G., ROESS, D.A. Intrinsically fluorescent luteinizing hormone receptor demonstrates hormone – driven aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.255, p.382-385, 1999.

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. 42744-427449, 2003.

HUHTANIEMI, I. Mutations of gonadotropin and gonadotrophin receptor genes: what to they teach us about reproductive physiology? *J. Reprod. Fertil.*, v.119, p.173-86, 2000.

IRELAND, J.L.H.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; WINN, M.E.; BURNS, D.S.; IRELAND, J.J Evidence for autocrine and paracrine roles of α 2-macroglobulin in regulation of estradiol production by granulosa cells and development of dominant follicles. *Endocrinology*, v.145, p.2784-2794, 2004.

JAISWALL, R.S.; SINGH, J.; ADAMS, G.P. Developmental patterns of small antral follicles in the bovine ovary. *Biology of Reproduction*, v.71, p.1244-1251, 2004.

KAWATE, N., OKUDA, K. Coordinated expression of splice variants for luteinizing hormone receptor messenger RNA during the development of bovine corpora lutea. *Mol. Reprod. Dev.*, v.51, p.66-75, 1998.

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.531-538, 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.

KOJIMA, F.N.; BERGFELD, E.G.M.; WEHRMAN, M.E.; CUPP, A.S.; FIKE, K.E.; MARISCAL-AGUAYO, D.V.; SANCHEZ-TORRES, T.; GARCIA-WINDER, M.; CLOPTON, D.T.; ROBERTS, A.J.; KINDER, J.E. Frequency of hormone pulses in cattle influences duration of persistence of dominant ovarian follicles, follicular fluid concentration of steroids, and activity of insulin-like growth factor binding proteins. *Anim. Reprod. Sci.*, v.77, p.187-211, 2003.

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.273-282, 2004.

LEWIN, B. Genes VIII. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall, Pearson. *Education*, Inc., 2004, chap.2; chap.28.

LOWMAN, B. G.; SCOTT, N. A.; SOMERVILLE, S. H. Condition scoring of cattle. Edinburgh: *The east of Scotland College of Agriculture*, 1976, p.1-13 (Bulletin, 6).

MANIKKAN, 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 wave and changes in second wave follicles after pulsatile LH infusion. *Anim. Reprod. Sci.*, v.67, p.189-203, 2001.

MATTICK, J.S. Páginas ocultas no livro da vida. *Sci. Am. Bras.*, v.30, p.55-61, 2004.

MENON, K.M.J., MUNSHI, U.M., CLOUSER, C.L., NAIR, A.K. Regulation of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor expression: a perspective. *Biology of Reproduction*, v.70, p.861-866, 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. The final stages of dominant follicle selection in cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v.23, p.155-166, 2002.

MONGET, P.; MAZERBOURG, S.; DELPUECH, T.; MAUREL, M.C.; MANIERE, S.; ZAPF, J.; LALMANACH, G.; OXVIG, C.; OVERGAARD, M.T. Pregnancy-associated plasma protein A is involved in insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) proteolytic degradation in bovine and porcine preovulatory follicles: identification of cleavage site and characterization of IGFBP-2 degradation. *Biology of Reproduction*, v.68, p.77-86, 2003.

MÜLLER, T.; GROMOLL, J.; SIMONI, M. Absence of éxon 10 of the human luteinizing hormone (LH) receptor impairs LH, but not human chorionic gonadotropin action. *J. Clin. Endocrinol., Metab.* v.88, p.2242-2249, 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.42809-42816, 2005.

NAKAMURA, K., YAMASHITA, S., OMORI, Y., MINEGISHI, T. A sílice variant of the human luteinizing hormona (LH) receptors modulates the expresión of the wild-type human LH receptor. *Mol. Endocrinol.*, v. 18, p.1461-1470, 2004.

NOGUEIRA, M.F.G. Expressão gênica do Receptor do Hormônio Luteinizante (LHR) em células da teca e da granulosa de folículos antrais bovinos. Tese (doutorado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2005a.

NOGUEIRA, M.F.G., BURATINI, Jr, J., BARROS, C.M. Tratamento com eCG 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, 2005b.

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.

PIERCE, J.G.; PARSONS, T.F. Glycoprotein hormones: structure and function. *Ann. Rev. Biochem.* v.50, p.465-495, 1981.

PIERCE, K.L., PREMONT, R.T., LEFKOWITZ, R.J. Seven-transmembrane receptors. *Mol. Cell.Biol.* v.3, p.639-650, 2002.

PUETT, D.; LI, Y.; DeMARS G.; ANGELOVA, K.; FANELI, F. A functional transmembrane complex: The luteinizing hormone receptor with bound ligand and G protein. *Mol. And Cel. Endocrinol.*, v.260(2), p.126-136, 2007.

REISINGER, K.; BAAL, N.; McKINNON, T.; MÜNSTEDT, K.; ZYGMUNT, M. The gonadotropins: Tissue-specific angiogenic factors? Review. *Mol. and Cell. Endoc.*, v.269, p.65-80, 2007.

RICHARDS, J.S.; MIDGLEY, A.R. Protein hormone action: a key to understanding ovarian follicular and lutel cell development. *Endocrinology*, v.98,p.929-934, 1976.

ROBERT, C.; GAGNÉ, D., LUSSIER, J.G., BOUSQUET, D., BARNES, F.L., SIRARD, M.A. Presence of LH receptor mRNA in granulose cells as a potential marker of oocyte developmental competence and characterization of the bovine splicing forms. *Reproduction*, v.125, p.437-446, 2003.

ROESS, D.A., BRADY, C.J., BARISAS, B.G., Biological function of the LH receptor is associated with slow receptor rotational diffusion. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1464, p.242-250, 2000a.

ROESS, D.A, HORVAT, R.A., MUNNELLY, H., BARISAS, B.G. Luteinizing hormone receptors are self-associated in the plasma membrane. *Endocrinology*, v.141, p.4518-4523, 2000b.

ROESS, D.A., SMITH, S.M.L. Self-association and raft localization of functional luteinizing hormone receptors. *Biology of Reproduction*, v.69, p.1765-1770, 2003.

SAINT-DIZIER, M., CHOPINEAU, M., DUPONT, J., COMBARNOUS, Y. Expression of the full-length and alternatively spliced equine luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor mRNAs in the primary corpus luteum and fetal gonads during pregnancy. *Reproduction*, v.128, p.219-228, 2004a.

SALVADOR, L.M.; MAIZELS, E.; HALES, D.B.; MIYAMOTO, E.; YAMAMOTO, H.; HUNZICKER-DUNN, H.; M. Acute signaling by the LH receptor is independent of protein kinase C activation. *Endocrinology*. v.143, p.2986-2994, 2002.

SARTORELLI, E.S.; CARVALHO, L.M.; BERGFELT, R.D.; GINTHER, O.J.; BARROS, C.M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows). *Theriogenology*, v.63, p.2382-2394, 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. *Biology of Reproduction*, v.65, p.1403-1409, 2001.

SAS: STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. A USER'S GUIDE. Cary: SAS Institute, versão 9.1.3, ano 2002/2003.

SHEMESH, M. Actions of gonadotrophins on the uterus. *Reproduction*, v.121, p.835-842, 2001.

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

TSAI-MORRIS, C.H., GENG, Y., BUCZKO, E., DUFAU, M.L. A novel human luteinizing hormone receptor gene. *J. Clin. Endocrinol, Metab.*, v.83, p.288-291, 1998.

VAN DEN HURK, R., ZHAO, J. Regulação do crescimento oocitário e maturação em mamíferos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.31, p.172-187, 2003.

WANG, L., NAIR, A.K., MENON, K.M.J. Ribonucleic Acid Biding Protein Mediated Regulation of Luteinizinh Hormone Receptor Expression in Granulosa Cells: Relationship to Sterol Metabolism. *Molecular Endocrinology*, v.21, p.2233-2241, 2007.

WILTBANK, M.C.; PURSLEY, J.R.; FRICKE, P.M; VASCONCELOS, J.L.; GINTHER, J.N.; GIBBONS, J,R.; GINTHER, O.J. Development of IA and ET programs that do not require detection of estrus using recent information on follicular growth. In : ANNUAL CONVENTION PORTLAND, 15, 1996, Oregon. *Proceedings...* Oregon: American Embryo Transfer Association, 1996, p.23-44.

WRIGHT, P.J.; MALMO, J. Pharmacological manipulation of fertility. *Appl. Food. Anim. Pract.*, v.8, p.57-89, 1992.

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.951-957, 1995.

YUAN, W.; BAO, B.; GARVERICK, H.A.; YOUNGQUIST, R.A.; LUCY, M.C. Follicular dominance in cattle is associated with divergent of ovarian gene expression for insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II, and IGF binding protein

2 in dominant and subordinate follicles. *Dom. Anim. Endocri.*, v.15, p.55-63, 1998.

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 insert into the human follicle-stimulating hormone receptor. *Mol. Cell. Endocri.*, v.142, p.165-174, 1998.

ZHANG, Y.; DUFAU, M.L. Dual mechanisms of regulation of transcription of luteinizing hormone receptor gene by nuclear orphan receptors and histone deacetylase complexes. *Jour. Steroid. Biochem. Molec. Biol.*, . v.85, p.401-414, 2003.

Isoforms of luteinizing hormone receptor (LHR) gene expression in granulosa cells before, during and after follicular deviation in Nelore heifers.

Abstract

The main objective of the present work was to evaluate the expression of LHR isoforms in granulosa cells from Nelore heifers, before, during and after follicle deviation. To characterize the time of follicle deviation (Experiment 1, phase 1), Nelore heifers (n=20) were submitted to the following synchronization protocol: at Day -10 (D -10) they received an intravaginal progesterone releasing device (1.0 g, DIB[®]) and estradiol benzoate (BE, 2.5 mg, Estrogin[®], i.m.). Intravaginal device was removed on D -3 and animals received PGF₂ α (d-cloprostenol, 500 μ g, Prolise[®], i.m.). Twenty four hours afterwards 1.0 mg de BE (i.m.) was administered and follicular growth of the dominant follicle was registered by ultrasonography (US, Aloka SSD 900; 7.5 to 9.0 MHz probe) performed every 12 h until 144 h after ovulation. In the second phase of this experiment expression of isoforms of LH receptors (M1, M2, M3 and M4) from granulosa cells obtained from follicles before, during and after the expected time of follicle deviation, were evaluated. The same heifers used on phase 1 were submitted to the protocol described above to synchronize ovulation, and randomly allocated in three groups (phase 2): Group 2 (G2, 2 days after ovulation, i.e., before the expect time of deviation, n=7), Group 2.5 (G2.5, 2.5 days after ovulation, i.e., during deviation, n=7) and Group 3 (G3, 3 days after ovulation, i.e., after deviation). The animals were slaughtered 2.0, 2.5, and 3 days after ovulation to remove the ovaries, and granulosa cells from ovarian follicles were separated for total RNA extraction with Trizol. Gene expression of LHR isoforms were determined by RT-PCR. In experiment 2, another group of Nelore heifers (n=21) was exposed to the same procedures described in the second phase of experiment 1, to increase the number of samples from granulosa cells that expressed LHR isoforms. In experiment 1 (phase 1), a new follicular wave emerged 12 h before ovulation, and deviation occurred 2.3 days after ovulation (at this time the diameter of dominant and subordinate follicles were 5.4 and 4.9 mm, respectively). In the second phase (experiments 1 and 2), there was no expression of LHR in follicles with 4.5 to 6.7 mm (G2).

LHR expression was first detected in two samples from 7 mm follicles (G2.5), and was more evident in samples from G3 (3 days after ovulation). It is concluded that LHR expression, in granulosa cells from Nelore heifers, occurs during and after follicle deviation.

Key words: gene expression, LHR, Nelore, RT-PCR, *Bos taurus indicus*