

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Sabine Wohlres Viana

**OCORRÊNCIA DE *SPLICING* ALTERNATIVO E POLIMORFISMOS DE
BASE ÚNICA NA SEQUÊNCIA DO RECEPTOR DE HORMÔNIO
LUTEINIZANTE E RELAÇÃO COM O DESENVOLVIMENTO
FOLICULAR EM BOVINOS LEITEIROS**

Juiz de Fora, 2015

SABINE WOHLRES VIANA

**OCORRÊNCIA DE *SPLICING* ALTERNATIVO E POLIMORFISMOS DE
BASE ÚNICA NA SEQUÊNCIA DO RECEPTOR DE HORMÔNIO
LUTEINIZANTE E RELAÇÃO COM O DESENVOLVIMENTO
FOLICULAR EM BOVINOS LEITEIROS**

Tese de doutorado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Machado
Co-Orientador: Dr. João Henrique Moreira Viana

JUIZ DE FORA, 2015

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Wohlres-Viana, Sabine.

Ocorrência de splicing alternativo e polimorfismos de base única na sequência transcrita do receptor do hormônio luteinizante e sua relação com o desenvolvimento folicular em Bovinos Leiteiros. / Sabine Wohlres-Viana. -- 2015.

131 p.

Orientador: Marco Antonio Machado

Coorientador: João Henrique Moreira Viana

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2015.

1. Divergência folicular. 2. Splicing alternativo. 3. Polimorfismos. 4. Esteroidogênese. 5. Células da granulosa. I. Machado, Marco Antonio, orient. II. Viana, João Henrique Moreira, coorient. III. Título.

SABINE WOHLRES VIANA

Ocorrência de *splicing* alternativo e polimorfismos de base única na sequência transcrita do receptor do hormônio luteinizante e relação com o desenvolvimento folicular em bovinos leiteiros

Tese de doutorado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Genética e Biotecnologia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 27 de Janeiro de 2015

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Marco Antonio Machado
Orientador

EMBRAPA Gado de Leite



Dr. João Henrique Moreira Viana
Co-Orientador

EMBRAPA Gado de Leite



Prof. Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo

EMBRAPA Gado de Leite



Prof. Dr. Simone Eliza Facioni Guimarães

Universidade Federal de Viçosa



Dr. Margot Alves Nunes Dode

EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia

A oportunidade favorece as mentes preparadas.

Louis Pasteur

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Dieter (in memorian) e Clotilde, pelo apoio incondicional e por serem responsáveis pela pessoa que me tornei.

Aos meus irmãos, Frank e Karin, pela compreensão nos momentos de ausência e pelo carinho e incentivo.

Ao meu amor, João, pelo apoio em todos os momentos, pelo incentivo e por me fazer acreditar sempre que isto era possível.

Aos meus filhos, Gabriel e Angela, por servirem de inspiração sempre.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Juiz de Fora, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, pela oportunidade da realização do curso de doutorado.

À Fapemig (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais), pela concessão da bolsa de estudos e pelo apoio financeiro aos projetos AQP CVZ 02863/09 e CVZ PPM 0067/11.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro ao projeto 477701/2011-6.

À Embrapa Gado de Leite, por possibilitar o uso de infra-estrutura, animais e materiais necessários para a realização dos experimentos.

Às Fazendas do Basa, em nome de Evandro do Carmo Guimarães e de Simeão Feres Neto, por permitir a coleta de amostras biológicas em doadoras Gir do rebanho.

À Biotran Biotecnologia e Treinamento LTDA, pela colaboração na execução de experimentos relacionados ao 3º capítulo desta Tese.

Ao Pesquisador da Embrapa Gado de Leite e Professor Dr. Marco Antonio Machado, pela orientação, conselhos, confiança e incentivo que foram fundamentais durante o período do doutorado.

Ao Pesquisador da Embrapa Gado de Leite, Dr. João Henrique Moreira Viana, pela co-orientação, oportunidade de realizar os experimentos e pela confiança no desenvolvimento do estudo.

Aos Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite, Dr. Luiz Gustavo Bruno Siqueira e Dra. Maria Gabriela Campolina D. Peixoto pelo apoio durante a análise dos dados experimentais.

Ao Dr. Miller Pereira Palhão, pela colaboração na realização de atividades experimentais e na redação das publicações científicas.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite, Karina, Lorena, Raquel, Fernando, Isabella, Alessa, Felipe, Sula, Isabela e Juliana pela ajuda e bom humor sempre.

Ao amigo do Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite João Gabriel pela ajuda no desenvolvimento dos experimentos.

À funcionária do Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite, Daniele, pela ajuda, paciência e apoio incondicional durante a realização dos experimentos.

Aos funcionários do Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite, Carolina e Del (Gilmar), pela ajuda e apoio durante a realização dos experimentos.

Aos amigos Adriana e Arashiro, que além de participarem da execução dos experimentos, sempre acreditaram e torceram, me ajudando a ter persistência e confiança.

Aos familiares, pela compreensão nos momentos de ausência e pelo incentivo.

A todos que, eventualmente possa ter esquecido de agradecer, mas que de alguma forma ajudaram na realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

O objetivo geral deste estudo foi investigar variações genômicas e transcriptômicas do receptor de hormônio luteinizante (*LHR*) e seu papel nos processos de dominância folicular e resposta à superovulação em bovinos. Foram realizados três experimentos, sendo que em todos se utilizou cDNA sintetizado a partir do RNA total extraído de células da granulosa (CG) folicular. Para a caracterização do transcrito do *LHR*, CG foram recuperadas de folículos dominantes de vacas das raças Gir (n=16) e Holandês (n=16). Após a PCR e o sequenciamento, os dados foram analisados para a presença de polimorfismos, frequência alélica, conteúdo de informação polimórfica (PIC) e Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE). Vinte e um polimorfismos de base única (SNPs) foram identificados, sendo 17 em Gir e 14 em Holandês. A classificação dos SNPs de acordo com os valores de PIC identificou 12 como altamente informativos em Gir e cinco em Holandês. Em relação a HWE, oito SNPs não estavam em equilíbrio em Gir e 10 em Holandês. Duas isoformas derivadas de *splicing* alternativo também foram identificadas, uma no éxon 1 e outra no éxon 10. Conclui-se que o *LHR* em bovinos leiteiros apresenta uma alta frequência de polimorfismos e múltiplas isoformas. Para avaliar o papel das isoformas do *LHR* nas CG durante a divergência folicular, a emergência da onda folicular foi sincronizada em novilhas Gir (n=10) e Holandês (n=10) e os folículos foram aspirados individualmente em diâmetros correspondentes aos períodos de pré-divergência, divergência, e pós-divergência. A expressão relativa das isoformas de *LHR* foi determinada por PCR em Tempo Real e os resultados foram relacionados com as concentrações intrafoliculares de estradiol (E2if). Em ambas as raças, houve um aumento progressivo na concentração de E2if ao longo do desenvolvimento folicular. O E2if foi maior em Holandês quando comparado com Gir antes, durante, e depois da divergência; mas foi similar em folículos de mesmo diâmetro nas duas raças. Observou-se um pico de expressão de *LHR* total após o início da divergência folicular. A expressão das isoformas de *LHR* foi ou baixa (Holandês) ou sub-regulada (Gir) durante este mesmo período. Os resultados sugerem que a divergência precoce do folículo dominante em raças de *Bos indicus* podem estar relacionados à maior sensibilidade ao *feedback* negativo do estradiol. Além disso, mudanças sequenciais na expressão das isoformas de *LHR* podem regular a função do LHR durante da divergência folicular em bovinos. A avaliação do comportamento das isoformas de *LHR* durante a indução exógena do crescimento folicular foi realizada em novilhas Gir caracterizadas com boa (n=5) ou má (n=5) resposta à superovulação. Em ambos os grupos, foram coletadas CG de folículos (8 mm) cujo crescimento ocorreu sem (Controle) ou com estimulação por FSH (SOV). No grupo de boa resposta, não houve diferença na expressão de *LHR* total entre os tratamentos Controle e SOV. No grupo de má resposta, a expressão de *LHR* total foi menor em SOV comparado com Controle, mas não houve diferença na expressão das isoformas. Conclui-se que o *LHR* é diferencialmente expresso em folículos dominantes de novilhas caracterizadas com boa ou má resposta a superovulação.

Palavras-chave: Zebu. Dominância folicular. Células da granulosa. *Splicing* alternativo. Esteroidogênese.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate genomic and transcriptomic variations at the luteinizing hormone receptor (LHR) and its role at the follicular dominance establishment and superovulation outcome in bovine. Three experiments were performed, and for all evaluations cDNA synthesized from total RNA extracted from follicular granulosa cells (GC) were used. To characterize the *LHR* transcript, GC were recovered from dominant follicles from Gir (n=16) and Holstein (n=16) cows. After PCR and sequencing, data were analyzed to identify polymorphisms, allelic frequency, polymorphic information content (PIC) and Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE). Twenty one single nucleotide polymorphism (SNP) were identified, being 17 in Gir and 14 in Holstein. The classification of SNP according to PIC values identified 12 as highly informative in Gir and five in Holstein. Considering HWE, eight SNP were not in equilibrium in Gir and 10 in Holstein. Two isoforms were also identified, one in exon 1 and other in exon 10. We concluded that *LHR* in dairy cattle shows a high frequency of polymorphism and multiple isoforms. To evaluate the LHR isoforms role in GC during follicular divergence, the follicular wave emergence was synchronized in Gir (n=10) and Holstein (n=10) heifers and follicles were individually aspirated at the corresponding sizes of pre-, divergence, and post-. The relative expression of LHR isoforms was determined by real time PCR and results were correlated to the intrafollicular estradiol (E2if) concentrations. In both breeds, there was a progressive increase in E2if concentration during follicular development. The E2if in Holstein was higher when compared to Gir before, during, and after divergence; but was similar in follicles of same size in both breeds. We observed a peak for the total *LHR* expression after the beginning of the follicular divergence. The expression of *LHR* isoforms was low (Holstein) or under-regulated (Gir) during this same period. The results suggest that the early follicular divergence of the dominant follicle in *Bos indicus* breeds can be related to a higher sensitivity to the estradiol negative feedback. Besides, sequential changes in *LHR* isoforms expression can act regulating the LHR function during follicular divergence in bovine. The evaluation of *LHR* isoforms behavior during the exogenous induction of follicular development was performed in Gir heifer previously characterized as good (n=5) or poor (n=5) responders to superovulation. In both groups, GC were collected from follicles (8 mm) which growth occurred without (Control) or with FSH stimulation (SOV). In good responders group, there was no difference in the *LHR* expression between the Control and SOV treatments. In the poor responders group, the total *LHR* expression was lower in SOV when compared to Control, but there was no difference in the expression of the isoforms. We concluded that *LHR* is differentially expressed in dominant follicles from heifers characterized as good or poor responders to superovulation.

Keywords: Zebu. Follicular dominance. Granulosa cells. Alternative Splicing. Steroidogenesis.

LISTA DE FIGURAS

Introdução Geral

Página

- Figura 1. Esquema do desenvolvimento folicular e secreção de gonadotrofina durante o ciclo estral em bovinos. Os folículos estão indicados como viáveis (circulo azul) ou atrésicos (circulo azul claro com preenchimento). Uma onda de FSH circulante (linha preta) precede a emergência de cada onda de crescimento folicular. Uma onda de LH circulante (linha magenta) precede a ovulação. Adaptado de ADAMS *et al.*, 2008..... 23
- Figura 2. O RNA é modificado no núcleo por alteração nas extremidades 5' e 3' e pela remoção dos íntrons por *splicing*. O evento de *splicing* necessita da quebra das junções éxon-íntron e da reunião das extremidades dos éxons. O mRNA maduro é transportado através de poros nucleares para o citoplasma, onde é traduzido (Baseado em BLACK, 2003 e LEWIN, 2007)..... 29
- Figura 3. Duas reações de transesterificação que resultam no *splicing* dos éxons do pré-mRNA. Na primeira reação, a ligação ester entre o fósforo 5' do íntron e o oxigênio 3' (vermelho) do exon 1 é alterada para uma ligação ester com o oxigênio 2' (azul) do sítio de ramificação no resíduo A. na segunda reação, a ligação ester entre o fósforo 5' do éxon 2 e o oxigênio 3' (verde) do íntron é alterada para uma ligação ester com o oxigênio do éxon 1, liberando o íntron em uma estrutura na forma de laço e juntando os dois éxons. As setas vermelhas mostram onde os oxigênios ativados das hidroxilas reagem com os átomos de fósforo. Baseado em LEWIN (2007) e LODISH *et al.* (2003)..... 31
- Figura 4. Exemplos de padrões de *splicing* alternativo. Éxons constitutivos (preto) e sequências alternativas (azul) são reagrupados de acordo com diferentes padrões (linhas pontilhadas). Baseado em BREITBART *et al.* (1987)..... 32
- ### Capítulo 1
- Figura 1. Esquema da cobertura dos *primers* e posição dos SNPs encontrados nos 11 éxons do transcrito do Receptor de Hormônio Luteinizante para cada raça avaliada..... 47
- Figura 2. *Splicing* alternativo do mRNA do receptor do hormônio luteinizante (LHR). A – Receptor completo contendo 11 éxons; B – Receptor apresentando *splicing* alternativo de 30 nucleotídeos no éxon 1; C – Receptor apresentando *splicing* alternativo do éxon 10 completo..... 49
- Figura 3. Eletroforese (gel de poliacrilamida, 5%) dos produtos de PCR para investigar a possível deleção no DNA. +, amostras que apresentavam ausência de 30 nucleotídeos nos fragmentos de mRNA sequenciados; -, amostras que apresentavam fragmento de mRNA completo no sequenciamento.; bp, pares de base. O padrão de peso molecular utilizado identificava intervalos de 50 bp..... 50

Capítulo 2

- Figura 1. Divergência folicular em novilhas Gir e Holandês. Representação gráfica dos dois maiores folículos em crescimento em uma onda folicular e o momento no qual a taxa de crescimento diverge entre os dois folículos, determinando que um se torna dominante (F1) e o outro subordinado (F2). As linhas pontilhadas dividem a variação do diâmetro folicular que caracteriza os períodos de pré-divergência, divergência, e pós-divergência em cada raça..... 68
- Figura 2. Expressão dos transcritos de *Cyp19A1* e *inibina A* nos períodos de pré- e pós-divergência em novilhas Gir (A) e Holandês (B). Os valores de expressão relativa foram comparados com as referências (folículos com o diâmetro esperado na divergência: 6 mm em Gir, 8 mm em Holandês)..... 71
- Figura 3. Expressão relativa do Receptor do Hormônio Luteinizante (*LHR*) total em células da granulosa (GC) durante o desenvolvimento do maior folículo em novilhas Gir (A) e Holandês (B). Os valores de expressão relativa foram comparados às referências (os menores folículos avaliados para cada raça: 4 mm em Gir, 6 mm em Holandês)..... 71
- Figura 4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (8%) dos produtos de PCR para a identificação das isoformas pelo tamanho dos fragmentos. Fragmento de 459 bp –*LHR* integral; fragmento de 378 bp – *Splicing* do éxon 10; fragmento de 194 bp – *Splicing* parcial do éxon 11; fragmento de 113 bp – *Splicing* do éxon 10 e *splicing* parcial do éxon 11; bp, pares de base. Os padrões de peso molecular (Ladder) identificavam intervalos de 25, 50 e 100 bp..... 72
- Figura 5. Expressão relativa das isoformas de *LHR* em células da granulosa (GC) durante o desenvolvimento do maior folículo em novilhas Gir (A-C) e Holandês (D-F). A-C: *splicing* do éxon 10 (S10), *splicing* do éxon 10 e *splicing* parcial do éxon 11 (S10+11), e *splicing* parcial do éxon 11 (S11), respectivamente, em Gir. D-F *splicing* do éxon 10 (S10), *splicing* do éxon 10 e *splicing* parcial do éxon 11 (S10+11), e *splicing* parcial do éxon 11 (S11), respectivamente, em Holandês. Para as comparações, os valores de expressão dos folículos com a maior expressão de *LHR* total (8 mm em Gir, 10 mm em Holandês) foram utilizados como referência..... 74
- Figura 6. Alinhamento do *LHR* integral e das isoformas. As caixas em cinza mostram mudanças de aminoácidos. Caixas em preto mostram os códons de parada. *LHR* – Receptor do Hormônio Luteinizante integral; S10 – Receptor do Hormônio Luteinizante com *splicing* do éxon 10; S10+11 – Receptor do Hormônio Luteinizante com *splicing* do éxon 10 e *splicing* parcial do éxon 11; S11 – Receptor do Hormônio Luteinizante com *splicing* parcial do éxon 11..... 75
- Figura 7. Ilustração esquemática das diferenças no progresso da produção de estradiol intrafolicular e expressão de *LHR* pelas células da granulosa durante o período de divergência folicular entre *B. indicus* e *B. taurus*. F1: folículo dominante; F2: maior folículo subordinado; E2: estradiol intrafolicular. A divergência folicular ocorre em *B. indicus* quando o folículo dominante apresenta cerca de 2 mm de diâmetro a menos que *B. taurus*. Um pico de

expressão de *LHR* ocorre durante a divergência em ambas as subespécies, independente do diâmetro folicular, enquanto a produção de estradiol está associada principalmente com o diâmetro do folículo..... 81

Capítulo 3

Figura 1. Expressão relativa do receptor do hormônio luteinizante (*LHR*) total em células da granulosa recuperadas de folículos de 8 mm de novilhas Gir de acordo com a presença ou não de estimulação com FSH exógeno (SOV) e com o fenótipo de resposta ao FSH (boa ou má resposta)..... 101

Figura 2. Expressão relativa de isoformas do receptor do hormônio luteinizante (*LHR*) em células da granulosa recuperados de folículos de 8 mm de novilhas Gir de acordo com a presença ou não de estimulação com FSH exógeno (SOV) e com fenótipo de resposta ao FSH (boa ou má resposta)..... 102

LISTA DE TABELAS

Introdução Geral	Página
Tabela 1. Detecção de Receptor de Hormônio Luteinizante em células da granulosa de folículos bovinos.....	28
Capítulo 1	
Tabela 1. <i>Primers</i> utilizados para PCR e reações de sequenciamento.....	43
Tabela 2. Posição, frequências alélicas e estatísticas para os polimorfismos encontrados no transcrito do <i>LHR</i> bovino. Os maiores valores estão destacados em negrito.....	48
Capítulo 2	
Tabela 1. <i>Primers</i> utilizados para PCR, PCR-RFLP, e PCR em Tempo Real das isoformas de <i>LHR</i> , <i>Cyp19A1</i> , <i>Inibina A</i> , e controles.....	63
Tabela 2. <i>Primers</i> e enzimas de restrição utilizados para identificar a ocorrência de <i>splicing</i> alternativo no mRNA do receptor de LH.	65
Tabela 3. Concentrações de estradiol (E2) and progesterona (P4), e proporção E2:P4, em amostras de fluido folicular coletadas <i>in vivo</i> de raças bovinas leiteiras (Holandês - <i>Bos taurus</i> , e Gir – <i>Bos indicus</i>), em três momentos distintos relacionados ao diâmetro esperado da divergência do folículo dominante.....	70
Capítulo 3	
Tabela 1. <i>Primers</i> utilizados para identificação dos polimorfismos, PCR-RFLP, e PCR em tempo real das isoformas de <i>LHR</i> e dos controles.....	93
Tabela 2. <i>Primers</i> e enzimas de restrição utilizados para identificar a ocorrência de <i>splicing</i> alternativo no receptor de LH.....	95
Tabela 3. Parâmetros superovulatórios das doadoras classificadas como responsivas (boa resposta) ou não (má resposta) ao tratamento com FSH exógeno para induzir múltiplas ovulações.....	98
Tabela 4. Polimorfismos identificados por sequenciamento nos grupos de Boa e Má resposta à superovulação.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A-kinase – Proteína quinase A
- AMPC – Adenosina 3',5' - monofosfato cíclico
- cDNA – “*Complementary DNA*” - DNA complementar
- COC – Complexos *cumulus*-oócitos
- COX2 – Ciclooxygenase 2
- Ct – “*Cycle threshold*” - ciclo limite
- CYP17 – Enzima citocromo P450 17 α hidroxilase
- CYP19 – Enzima citocromo P450 aromatase
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- dNTP – Desoxirribonucleotídeos fosfatados
- E2 - Estradiol
- E2if – Estradiol intrafolicular
- EDTA – “*Ethylenediamine tetraacetic acid*” - ácido etilenodiamino tetra-acético
- EPM – Erro padrão da média
- FSH – Hormônio Folículo Estimulante
- FSHp – Hormônio Folículo Estimulante suíno
- FSHR – Receptor do Hormônio Folículo Estimulante
- hCG – “*human chorionic gonadotropin*” - gonadotrofina coriônica humana
- HWE – “*Hardy-Weinberg Equilibrium*” - Equilíbrio de Hardy-Weinberg
- IL-1 β – Interleucina 1 beta
- IL-6 – Interleucina 6
- LH – Hormônio Luteinizante
- LHR – Receptor do Hormônio Luteinizante
- LHRH – Hormônio liberador de LH
- MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
- MHz – Megahertz
- mRNA – RNA mensageiro
- NRC – “*National Research Council*”
- P4 - Progesterona
- P4if – Progesterona intrafolicular
- PCR – “*Polymerase chain reaction*” - reação em cadeia da polimerase

PIC – “*Polymorphic information content*” - conteúdo de informação polimórfica
RFLP – “*Restriction Fragment Length Polymorphism*” – Polimorfismos de comprimento nos fragmentos submetidos à restrição
RIA – Radioimunoensaio
RNA – Ácido ribonucléico
RNase – Ribonuclease
RT – “*Reverse transcription*” - transcrição reversa
SNP – “*Single Nucleotide Polymorphism*” - Polimorfismo de uma única base
SOV – Superovulação
TNF α – “*Tumor Necrosis Factor alpha*” – Fator alfa de Necrose Tumoral
TSHR – Receptor do Hormônio Estimulante da Tireoide
UTR – “*Untranslated Region*” – Região não traduzida

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 CONTROLE GONADOTRÓFICO DO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR E OVULAÇÃO	22
2.2 RECEPTOR DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE: ESTRUTURA E FUNÇÃO	26
2.3 PROCESSAMENTO DO RNA E <i>SPLICING</i> ALTERNATIVO.....	28
2.4 ISOFORMAS E POLIMORFISMOS DO RECEPTOR DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE.....	33
3 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	34
4 REFERÊNCIAS.....	35
CAPÍTULO 1: IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS E <i>SPLICING</i> ALTERNATIVO NO RECEPTOR DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE DE BOVINOS LEITEIROS	39
1 RESUMO.....	39
2 INTRODUÇÃO	40
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 População animal e localização	41
3.2 Coleta de amostras e processamento	42
3.3 PCR e purificação das amostras	43
3.3.1 Protocolo de PCR 1:	44
3.3.2 Protocolo de PCR 2:	44
3.3.3 Protocolo de PCR 3:	44
3.3.4 Protocolo de PCR 4:.....	45
3.4 Sequenciamento do DNA	45
3.5 Análise dos dados	45
4 RESULTADOS	46
5 DISCUSSÃO	50
6 REFERÊNCIAS.....	53
CAPÍTULO 2: PRODUÇÃO INTRAFOLICULAR DE ESTRADIOL E PADRÃO DE EXPRESSÃO DO RECEPTOR DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE E SUAS ISOFORMAS DURANTE A DIVERGÊNCIA FOLICULAR: CARACTERIZAÇÃO DOS MECANISMOS MOLECULARES EM BOS INDICUS UTILIZANDO UM MODELO <i>IN VIVO</i>	57

1 RESUMO.....	57
2 INTRODUÇÃO	58
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	60
3.1 População animal e localização	60
3.2 Delineamento experimental.....	60
3.3 Coleta e processamento do fluido folicular e de células da granulosa.....	61
3.4 Ensaio hormonal.....	62
3.5 Extração de RNA e Transcrição reversa	62
3.6 Desenho dos <i>Primers</i>	63
3.7 PCR-RFLP	64
3.8 Sequenciamento das isoformas	65
3.9 PCR em Tempo Real	66
3.10 Análise dos dados	67
4 RESULTADOS	68
5 DISCUSSÃO	76
6 REFERÊNCIAS.....	82
CAPÍTULO 3: VARIABILIDADE DE RESPOSTA À SUPEROVULAÇÃO EM BOVINOS E RELAÇÃO COM A EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE ISOFORMAS DO RECEPTOR DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE.....	88
1 RESUMO.....	88
2 INTRODUÇÃO	89
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	90
3.1 População animal e localização	90
3.2 Desenho experimental.....	91
3.3 Sincronização e monitoramento do desenvolvimento folicular, superovulação, e recuperação de embriões.....	91
3.4 Caracterização da resposta superovulatória	92
3.5 Recuperação e processamento das células da granulosa	92
3.6 <i>Primers</i> utilizados para identificação dos polimorfismos, sequenciamento e expressão relativa das isoformas	93
3.7 Identificação dos polimorfismos e das isoformas	94
3.8 Sequenciamento	96
3.9 Análise de expressão relativa.....	97

3.10 Análise dos dados	97
4 RESULTADOS	98
5 DISCUSSÃO	103
6 REFERÊNCIAS.....	105
CONCLUSÕES GERAIS.....	109
ANEXO I - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA EMBRAPA GADO DE LEITE	110
ANEXO II - RESULTADOS DE RFLP (IMAGENS DE GEL DE POLIACRILAMIDA 8%).....	112
ANEXO III - PROTOCOLOS	115
ANEXO IV – RESUMOS	121

1 INTRODUÇÃO GERAL

A dinâmica do crescimento folicular em diversas espécies, incluindo bovinos e humanos, é caracterizada pelo surgimento de sucessivas ondas de crescimento ao longo do ciclo estral ou menstrual (ADAMS *et al.*, 2008). Em cada onda de crescimento, ocorre o desenvolvimento simultâneo de um conjunto de folículos, e posterior seleção de um folículo dominante, capaz de desenvolver até a ovulação e, simultaneamente, bloquear o crescimento dos demais pela supressão da liberação do hormônio folículo estimulante (FSH) pela hipófise (GINTHER *et al.*, 1989). Para o progresso do desenvolvimento o folículo precisa passar por alterações que o tornem apto a se desenvolver em concentrações baixas de FSH. A principal adaptação é a transição da dependência primária do FSH para o hormônio luteinizante (LH) pelo folículo dominante (GINTHER *et al.*, 1996), que ocorre pelo aumento na expressão de receptores para o LH tanto na granulosa como na teca no momento da seleção. Para que ocorra a ovulação, é preciso que o LH se ligue aos receptores localizados na membrana das células da granulosa e da teca de folículos maduros. Esta ligação ativa diversas vias de transdução de sinal que levam a processos inflamatórios e alteração de expressão gênica que modificam a morfologia do folículo e culminam com o rompimento do mesmo (ESPEY e LIPNER, 2006).

A indução de ovulações múltiplas em espécies que normalmente apresentam um conceito por gestação pode ser obtida pelo controle exógeno da função ovariana, processo também conhecido por superovulação ou produção *in vivo* de embriões. O tratamento superovulatório baseia-se na manipulação do mecanismo fisiológico de controle da taxa de ovulação espécie-específica, cujo principal componente é o estabelecimento da dominância folicular. Contudo, a produção *in vivo* de embriões ainda é limitada pela grande variabilidade de resultados, incluindo a caracterização da chamada “má respondedora” – indivíduos que falham em responder ao estímulo exógeno em ciclos de reprodução assistida, a despeito da ausência de qualquer outra alteração reprodutiva (TARLATZIS *et al.*, 2003). Em bovinos, espécie na qual a superovulação ainda é largamente utilizada, estima-se que um terço dos animais não responda ao tratamento (THIBIER, 2008). A variabilidade na resposta superovulatória é evidenciada pelos resultados obtidos em animais da mesma idade e condição de manejo, e tratados com

hormônios e protocolos similares (GREYLING *et al.*, 2002). Na raça Gir, principal raça zebuína utilizada para a formação de rebanhos mestiços leiteiros no Brasil, os resultados são inferiores aos obtidos tanto em taurinos quanto em outras raças zebuínas, com uma média de embriões por coleta inferior a 3,5 (VIANA *et al.*, 2007). A variabilidade na resposta aos tratamentos implica em aumento dos custos associados ao processo e em maior dificuldade na otimização do uso de receptoras.

Apesar da importância do receptor para o LH (LHR) na transição da dependência do FSH para o LH e consequente desenvolvimento morfológico e funcional dos folículos ovulatórios, estudos avaliando a estrutura do mRNA do *LHR* demonstraram a existência de várias isoformas do *LHR* (produtos de *splicing* alternativo) em diversas espécies, sendo que nem todas parecem ser funcionais. Desta forma, os objetivos do presente estudo foram caracterizar a sequência de nucleotídeos do mRNA do receptor do LH e identificar a presença e frequência de produtos de *splicing* alternativo em células da granulosa obtidas de folículos em desenvolvimento e de folículos dominantes com e sem estimulação hormonal exógena (superovulação).

A presente tese foi estruturada na forma de uma revisão de literatura e três capítulos inter-relacionados, nos quais são avaliados polimorfismos (SNPs) e produtos de *splicing* alternativo (isoformas) na sequência do receptor, a presença e padrão de expressão de isoformas ao longo do desenvolvimento folicular no período peri-divergência, e a associação de SNPs e expressão das isoformas em vacas com diferentes perfis de resposta a protocolo de superovulação, e que correspondem à estrutura das publicações relacionadas aos mesmos. Nestes estudos foram analisadas características genômicas e transcriptômicas do *LHR*, que foram associadas a dados fisiológicos e endócrinos de animais das raças Gir e Holandês gerados em experimentos realizados concomitantemente pela equipe do laboratório de reprodução da Embrapa Gado de Leite, relacionados a outra Tese de doutorado (ARASHIRO, 2012) e a uma dissertação de mestrado (MINARÉ, 2013).

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura apresentada neste capítulo irá focar principalmente no controle gonadotrópico do desenvolvimento folicular, progressão da ovulação, estrutura e função do receptor do hormônio luteinizante, mecanismos de *splicing* do RNA, e isoformas e polimorfismos do mRNA do *LHR* identificadas em diversas espécies.

2.1 CONTROLE GONADOTRÓFICO DO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR E OVULAÇÃO

Em bovinos, a função ovariana é regulada pela interação entre os sistemas de *feedback* sistêmico e local envolvendo gonadotrofinas da glândula pituitária (FSH e LH), esteróides e proteínas/peptídeos dos ovários (WEBB e ARMSTRONG, 1998).

O crescimento e o desenvolvimento folicular em bovinos ocorrem em um padrão tipo onda e em cada onda de crescimento, ocorre inicialmente o desenvolvimento simultâneo de um conjunto de folículos, e posteriormente a seleção de um folículo dominante, capaz de progredir o desenvolvimento até a ovulação e, simultaneamente, bloquear o crescimento dos demais (subordinados) (GINTHER *et al.*, 1989). Durante o ciclo estral, ondas pré-ovulatórias de LH e FSH ocorrem simultaneamente e as concentrações plasmáticas basais são paralelas durante grande parte da fase luteal. Contudo, os níveis circulantes de LH e FSH são claramente divergentes durante dois períodos do ciclo estral em bovinos, de forma que a secreção diferencial destas gonadotrofinas em diversos estágios do crescimento folicular está associada com o início e continuidade do crescimento dos folículos até a ovulação, ou atresia, nos diferentes estágios de crescimento (BAO e GAVERICK, 1998; TURZILLO e FORTUNE, 1990).

As ondas foliculares são precedidas por aumento na secreção do FSH e fornecem o estímulo inicial para o crescimento do conjunto de folículos. O FSH entra em declínio no momento, ou logo após o estabelecimento da onda folicular (Figura 1). Além disso, a onda de FSH plasmático pode causar uma redução temporária de FSH pituitário, resultando em

um rápido declínio das concentrações plasmáticas, que são subsequentemente mantidas a níveis baixos por fatores produzidos pelo folículo dominante (p.ex., inibina). Diante de concentrações basais de FSH plasmático, os folículos subordinados regridem, mas o folículo dominante continua a crescer, demonstrando que este é menos dependente de FSH, ou que é mais sensível às concentrações de FSH disponíveis através da indução aumentada de receptores de FSH (ADAMS *et al.*, 1992; ADAMS *et al.*, 2008).

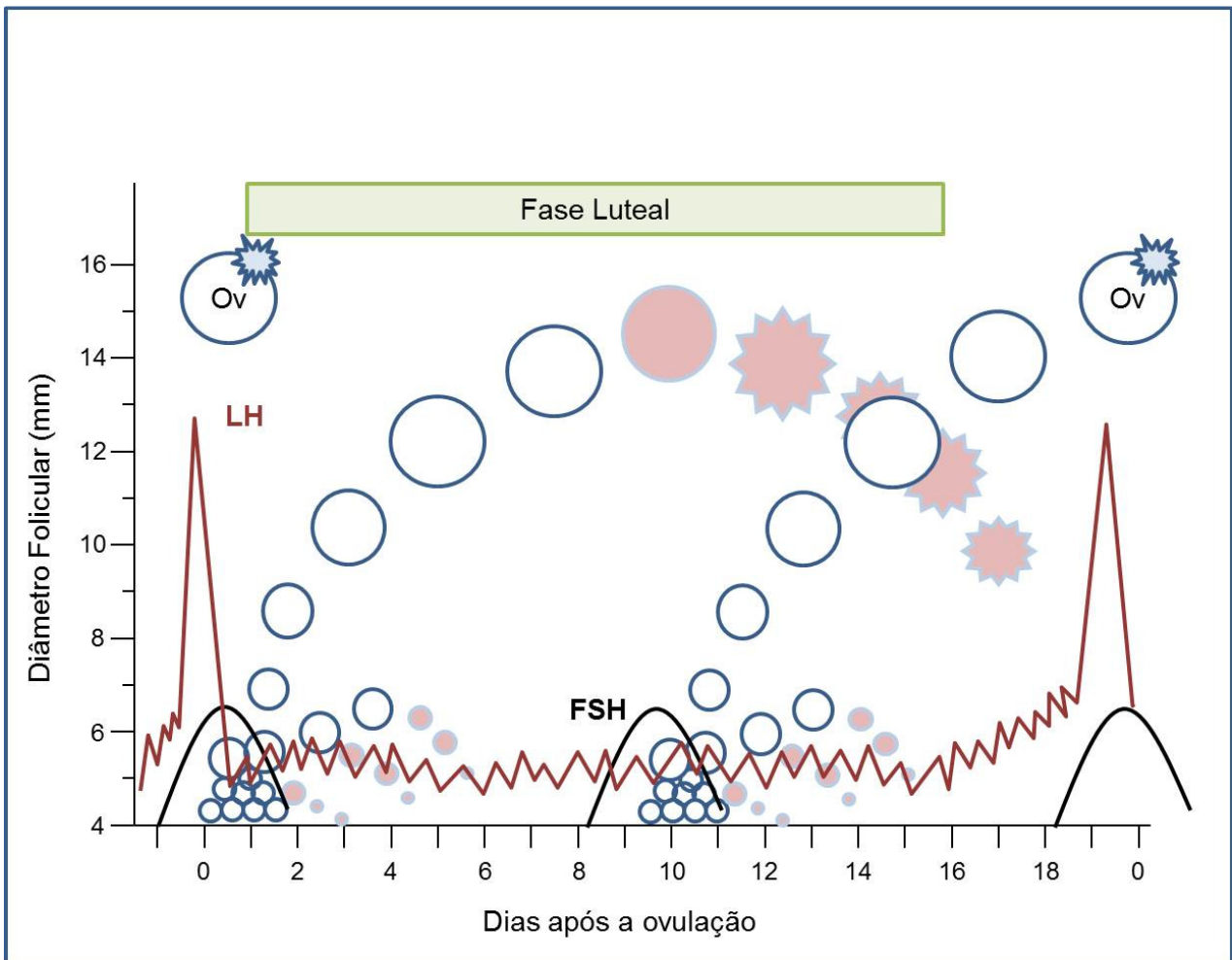


Figura 1. Esquema do desenvolvimento folicular e secreção de gonadotrofina durante o ciclo estral em bovinos. Os folículos estão indicados como viáveis (círculo azul) ou atrésicos (círculo azul claro com preenchimento). Uma onda de FSH circulante (linha preta) precede a emergência de cada onda de crescimento folicular. Uma onda de LH circulante (linha magenta) precede a ovulação. Ov – ovulação; FSH – Hormônio Foliculo Estimulante; LH – Hormônio Luteinizante. Adaptado de ADAMS *et al.*, 2008.

No final do período de dominância (i.e., na ovulação, ou fase de platô de um folículo ovulatório dominante), as concentrações circulantes de FSH começam a aumentar; se elevam em 1,5-2 vezes nos dois dias seguintes, e atingem o pico

aproximadamente 12-24 h antes da emergência da próxima onda (quando o futuro folículo dominante está com 4-5 mm de diâmetro) (ADAMS *et al.*, 2008).

Para que ocorra a seleção folicular, é necessário que o folículo dominante passe por alterações funcionais que o tornem apto a desenvolver mesmo na presença de concentrações reduzidas de FSH. A diminuição das concentrações de FSH circulante no sangue ocorre durante os primeiros três dias da onda. A menor concentração de FSH é atingida quatro dias após a emergência da onda, e permanece baixa pelos próximos 2-3 dias. Os receptores para FSH estão presentes apenas nas células da granulosa, enquanto que os receptores para LH estão presentes tanto nas células da granulosa quanto nas células da teca na parede dos folículos antrais. O folículo dominante adquire mais receptores para LH em suas células da granulosa do que os folículos subordinados, tornando-se mais apto a alterar sua dependência gonadotrópica primária para LH durante a baixa concentração de FSH, e continuar a crescer enquanto os subordinados regridem (GINTHER *et al.*, 1996; ADAMS *et al.*, 2008).

A esteroidogênese folicular é regulada pela ligação do FSH e do LH a receptores específicos de alta afinidade. O modelo “duas células, duas gonadotrofinas” para produção de estradiol sugere que nas células da teca, o LH estimula a conversão de progestinas (pregnenolona ou progesterona) em androstenediona, pela ação da enzima citocromo P450 17 α -hidroxilase (CYP17), fornecendo precursores para posterior síntese de estradiol, enquanto na granulosa, a aquisição de receptores para LH, induzida pelo FSH, estimula a produção de AMPc e leva à um aumento na conversão de andrógenos em estradiol pela ação da enzima P450 aromatase (CYP19) (FORTUNE e QUIRK, 1988; BAO e GAVERICK, 1998; COUSE *et al.*, 2006). O rápido aumento na concentração de estradiol, durante o processo de estabelecimento da dominância, auxilia na redução final da concentração de FSH. Desta forma, o folículo dominante torna-se menos dependente e, conseqüentemente, capaz de se desenvolver na presença de concentrações basais de FSH, ao mesmo tempo em que induz a regressão dos folículos subordinados e bloqueia o surgimento de uma nova onda de crescimento folicular (GINTHER *et al.*, 1996).

Outro componente importante nesta cascata de eventos que direcionam o estabelecimento do folículo dominante é o sistema IGF. Este sistema composto por dois ligantes (IGF-I e IGF-II), dois receptores (tipos 1 e 2), seis proteínas de ligação ao IGF (IGFBP-1 a IGFBP-6), e pelo menos uma protease de IGFBP. O IGF promove a síntese de estradiol em folículos antrais, e algumas IGFBPs (-2, -3 e -5) podem apresentar um efeito negativo sobre a atuação do IGF, se ligando à proteína e a impedindo de se ligar ao

receptor. Entretanto, proteases específicas de IGFs clivam tais proteínas de ligação, permitindo assim a ligação do IGF ao seu receptor. Desta forma, quaisquer alterações nos componentes do sistema poderiam afetar o desenvolvimento folicular (revisado por FORTUNE *et al.*, 2004). A aquisição de outra proteína, a PAPP-A (*pregnancy-associated plasma protein-A*), ocorre em resposta à concentração elevada de FSH circulante e antes que os folículos dominantes se tornem significativamente maiores do que os subordinados. O aumento desta proteína eleva o IGF intrafolicular livre, que então atua de forma sinérgica com o FSH para estimular um rápido aumento da produção folicular de estradiol. Este aumento no estradiol exerce então um *feedback* negativo sobre a secreção de FSH, evitando que os folículos subordinados adquiram PAPP-A (revisado por FORTUNE *et al.*, 2004).

Uma forma de induzir múltiplas ovulações em espécies que apresentam um único conceito por gestação é o tratamento com estradiol exógeno durante a fase luteal, que induz a regressão de um folículo dominante existente, provavelmente pela supressão de LH e FSH, seguido por uma recaída no FSH e emergência sincronizada de uma nova onda folicular. Este tratamento é a base de muitos protocolos para sincronização da ovulação em tempo-fixo, inseminação artificial ou superovulação (ADAMS *et al.*, 2008).

Em mamíferos a ovulação é um processo que começa no momento em que uma onda endógena de LH estimula os receptores que estão distribuídos na superfície das células da granulosa e da teca de um folículo ovariano maduro. O processo termina algumas horas depois no momento que o folículo se rompe e libera um ócito fértil. Em sobreposição a este evento ocorre o processo de luteinização, que também é iniciado pela onda de LH, mas não termina até alguns dias após a ovulação. Desta forma, a ovulação (i.e. ruptura do folículo) é um fenômeno morfológico distinto que ocorre durante a transformação de um folículo ovariano em corpo lúteo (ESPEY *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de metodologias em biologia molecular e tecnologias de DNA recombinante permitiram a compreensão de que a ovulação é um processo complexo que ocorre através de uma cascata de eventos moleculares iniciada pela ligação do LH ao seu receptor localizado na membrana das células da granulosa e da teca em folículos ovarianos maduros. Estes receptores atuam através de vias de sinalização de AMPc e A-kinase para ativar rotas que são responsáveis pela produção de progesterona e induzir a expressão de diversos genes nas células da granulosa que estão associados com a sobre-regulação de citocinas inflamatórias (p.ex., IL-1 β , IL-6, e TNF α). Entre estes genes está a ciclooxigenase-2 (COX-2), que catalisa a conversão do ácido araquidônico em

diversos prostanóides incluindo a prostaglandina E₂, que é vasodilatadora (RICHARDS *et al.*, 1998; ESPEY e LIPNER, 2006).

Uma consequência adicional da ação biológica das prostaglandinas (possivelmente combinadas com outros agentes vasoativos) é a resposta hiperêmica que ocorre durante as primeiras horas do processo ovulatório. Como resultado da exudação de proteínas séricas no tecido conectivo da teca em torno dos folículos, ou da difusão de agentes de sinalização a partir da camada inflamada de granulosa dos folículos, os fibroblastos do ovário passam de um estado quiescente para um estado mais ativo, proliferativo. Estas células se tornam mais alongadas e começam a dissociar umas das outras (ESPEY, 1994; ESPEY e LIPNER, 2006). Tais alterações nos fibroblastos induzem a expressão gênica de diversas proteases (ativador de plasminogênio de tecidual - tPA, calicreínas, diversas metaloproteínases de matriz – MMPs, etc) que juntas enfraquecem a matriz extracelular no tecido conectivo em torno do folículo (RICHARDS *et al.*, 1998; ESPEY e LIPNER, 2006).

Eventualmente, a integridade do folículo é desestabilizada por eventos proteolíticos e, por causa da pressão intrafolicular, a parede do folículo afina e sofre protrusão até que em certo ponto ocorre a ruptura (ESPEY e LIPNER, 2006).

2.2 RECEPTOR DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE: ESTRUTURA E FUNÇÃO

O mRNA do *LHR* bovino possui 701 aminoácidos (www.ncbi.nlm.gov; Genbank *accession number* NM_174381.1) e o gene está localizado no cromossomo 11. A estrutura genômica deste receptor consiste em 11 éxons separados por 10 íntrons. Todos os íntrons ficam localizados no domínio extracelular. Um único éxon, o éxon 11, codifica todo o domínio transmembrana, cauda citoplasmática e região 3'UTR. O domínio de ligação do hormônio compreende a maior parte da região entre os éxons 1 e 10 e consiste em duas regiões ricas em cisteína no éxon 1 e no 9 que fazem limite com um domínio rico em leucina dentro dos éxons 2-8 (DUFAU *et al.*, 1995).

Os receptores de hormônios glicoproteicos constituem uma subfamília da grande família de receptores acoplados a proteínas G. Três receptores formam esta subfamília, o

receptor do hormônio luteinizante (LHR), o receptor do hormônio folículo estimulante (FSHR), e o receptor do hormônio estimulante da tireoide (TSHR) (PUETT *et al.*, 2010).

Os hormônios glicoproteicos e seus receptores regulam processos reprodutivos e metabólicos. As gonadotrofinas e seus receptores são responsáveis pela esteroidogênese nas gônadas e pela ovulação, enquanto que o TSH e seu receptor regulam a produção do hormônio da tireoide. Além dos seus papéis já estabelecidos na regulação normal da reprodução, desenvolvimento, e metabolismo, estes receptores também estão relacionados com diversas condições patofisiológicas (PUETT *et al.*, 2010; SEGALOFF, 2009). Por exemplo, mutações no gene do LHR são relacionadas com distúrbios reprodutivos em humanos como puberdade precoce no sexo masculino, resistência gonadal ao LH/hCG, infertilidade e menstruação irregular (SEGALOFF, 2009).

O receptor do hormônio luteinizante é expresso nas células da teca, células da granulosa e células luteais e intersticiais (HUHTANIEMI, 2004). A ligação do LHR ao LH leva a ativação das vias de transdução de sinal que regulam a diferenciação celular e a esteroidogênese. A expressão do LHR nas gônadas é um processo regulado por hormônios. No ovário, é induzido pelo FSH, estrógeno e fatores de crescimento no folículo pré-ovulatório, é sub-regulada após a onda de LH ovulatória, e aumenta novamente durante a luteinização (DUFAU *et al.*, 1995).

Apesar do papel do LH ser bem caracterizado na divergência folicular (GINTHER *et al.*, 2001), o momento a partir do qual é possível detectar a expressão de LHR em células da granulosa permanece controverso. A Tabela 1 apresenta alguns estudos e os diâmetros nos quais os autores identificaram a presença de LHR em bovinos. As variações de resultados na identificação da expressão do receptor em pequenos folículos antrais entre os estudos podem estar relacionados com as metodologias utilizadas, como o critério de seleção do folículo (inspeção visual, razão E2:P4, monitoramento por ultrassonografia), no agrupamento dos folículos (diâmetro, categorização por tamanho, dia após a onda de emergência), na preparação das células da granulosa (suspensão de células, *in situ*, cultivo *in vitro*), e na sensibilidade das técnicas de identificação (hibridização *in situ*, PCR, PCR em tempo real) ou nos protocolos de amplificação.

Tabela 1. Detecção de Receptor de Hormônio Luteinizante em células da granulosa de folículos bovinos.

Referência	Diâmetro folicular com detecção de LHR	Raça ou cruzamento
XU <i>et al.</i> , 1995	> 9 mm	Cruzamento de gado de corte
BAO <i>et al.</i> , 1997	≥7,8	Holandês
SOUMANO <i>et al.</i> , 1998	Não descrito	Cruzamento de Holandês
BEG <i>et al.</i> , 2001	≥7mm	Holandês
ROBERT <i>et al.</i> , 2003	<4mm	Holandês
NOGUEIRA <i>et al.</i> , 2007	≥7mm	Nelore
SIMÕES <i>et al.</i> , 2012	≥8mm	Nelore e cruzamento de Nelore

2.3 PROCESSAMENTO DO RNA E *SPLICING* ALTERNATIVO

Em organismos eucariotos, as sequências de DNA que compreendem um gene são divididas em duas categorias, éxons e íntrons. Os éxons são as sequências representadas no RNA maduro. Os íntrons são as sequências intercalantes que são removidas quando o transcrito primário é processado para dar origem ao RNA maduro. As sequências de éxons estão na mesma ordem no gene e no RNA (LEWIN, 2007; PIERCE, 2012).

A diferença entre a organização interrompida do gene e a organização ininterrupta do mRNA requer o processamento do produto primário da transcrição. O transcrito primário possui a mesma organização do gene e pode ser denominado de pré-mRNA. O processo pelo qual os íntrons são removidos é chamado de *splicing* do RNA. O *splicing* ocorre no núcleo, junto com outras modificações que são feitas nos RNAs recém-sintetizados (Figura 2). Ao transcrito é adicionada a estrutura cap na extremidade 5' (adição de um resíduo de guanidina pela guanilil transferase que substitui o trifosfato inicial em uma orientação inversa, desta forma “selando” a extremidade) à medida que os íntrons são removidos, e é poliadenilado na extremidade 3' (adição de ~200 resíduos de adenina) formando uma cauda Poli(A). Somente após finalizar todos os eventos de

modificação e processamento o mRNA pode ser exportado do núcleo para o citoplasma (LEWIN, 2007, PIERCE, 2012). Os íntrons são removidos dos pré-mRNAs nucleares por um sistema que reconhece apenas pequenas sequências consenso conservadas nos limites éxon-íntron e dentro dos íntrons chamados de sítios de *splice*. Esta reação necessita de um grande aparato de *splicing*, que possui a forma de uma rede de proteínas e ribonucleoproteínas que funcionam como um grande complexo (spliceossoma). Comparando a sequência do mRNA com a sequência do gene estrutural, as junções entre os éxons e íntrons podem ser identificadas. Uma alta conservação é encontrada apenas imediatamente dentro do íntron na suposta junção. Estas junções frequentemente são descritas como apresentando o dinucleotídeo GU na extremidade 5' do íntron e três elementos em sequência conservados na extremidade 3': o ponto de ramificação, seguido por um trato polipirimidina, seguido por um dinucleotídeo terminal AG na extremidade 3' (LEWIN, 2007; BLACK, 2003).

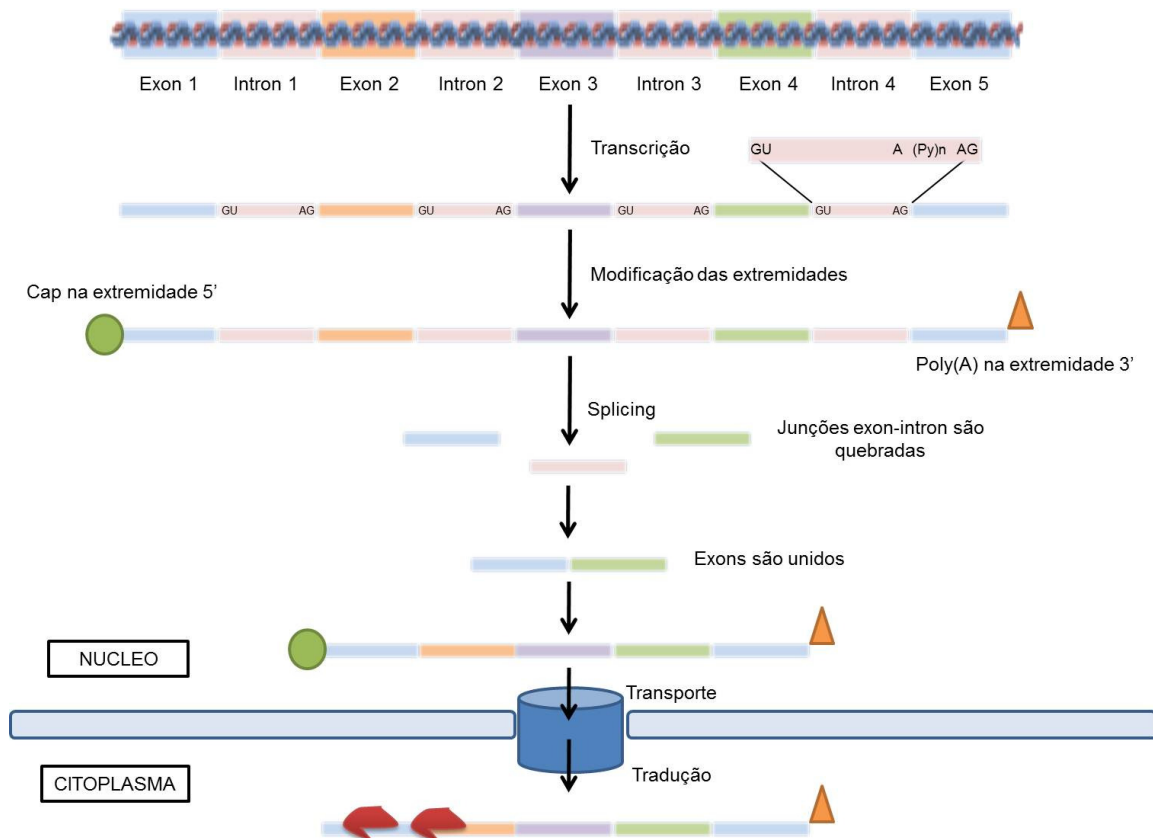


Figura 2. O RNA é modificado no núcleo por alteração nas extremidades 5' e 3' e pela remoção dos íntrons por *splicing*. O evento de *splicing* necessita da quebra das junções éxon-íntron e da reunião das extremidades dos éxons. O mRNA maduro é transportado através de poros nucleares para o citoplasma, onde é traduzido (Baseado em BLACK, 2003 e LEWIN, 2007).

Sugere-se que a conformação do RNA influencia o acesso aos sítios de *splicing*. À medida que determinados íntrons são removidos, a conformação muda e novos pares de sítios de *splicing* se tornam disponíveis. Contudo, a reação não ocorre em sequência ao longo do precursor (LEWIN, 2007). O mecanismo de *splicing* tem sido caracterizado *in vitro* utilizando sistemas nos quais os íntrons podem ser removidos dos RNAs precursores; isto tem demonstrado que a ação do *splicing* não está ligada ao processo de transcrição. O *splicing* pode ocorrer em RNAs que não possuem cap ou poliadenilação. A reação é independente da transcrição ou modificação do RNA; estes eventos, entretanto, ocorrem normalmente de maneira coordenada, e a eficiência do *splicing* pode ser influenciada por outros eventos de processamento (LEWIN, 2007).

A análise dos produtos intermediários formados durante o *splicing* dos pré-mRNAs *in vitro* levou à descoberta de que os éxons passam por duas reações de transesterificação em sequência (Figura 3). Os íntrons são removidos como uma estrutura em forma de laço na qual o G na extremidade 5' do íntron é ligado a uma adenosina próxima a extremidade 3' em uma ligação 2',5' -fosfodiéster incomum. Este resíduo A é chamado de ponto de ramificação porque forma um ramo de RNA na estrutura em laço. Em cada reação de transesterificação, uma ligação fosfodiéster é trocada por outra. Uma vez que o número de ligações fosfodiéster na molécula não é alterado em nenhuma reação, não ocorre consumo de energia. O resultado final destas duas reações é a ligação de dois éxons e a liberação do íntron na forma de uma estrutura em laço (LODISH *et al.*, 2003).

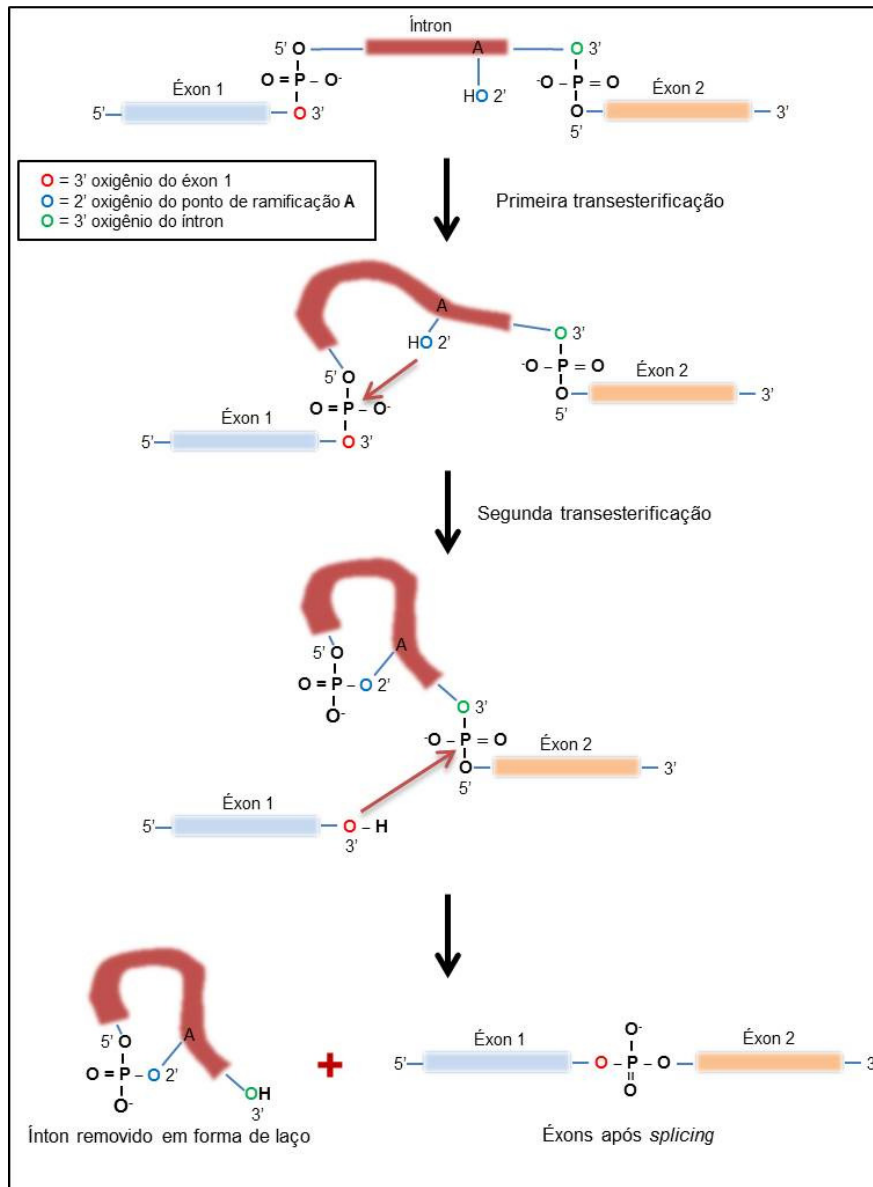


Figura 3. Duas reações de transesterificação que resultam no *splicing* dos éxons do pré-mRNA. Na primeira reação, a ligação ester entre o fósforo 5' do intron e o oxigênio 3' (vermelho) do éxon 1 é alterada para uma ligação ester com o oxigênio 2' (azul) do sítio de ramificação no resíduo A. Na segunda reação, a ligação ester entre o fósforo 5' do éxon 2 e o oxigênio 3' (verde) do intron é alterada para uma ligação ester com o oxigênio do éxon 1, liberando o intron em uma estrutura na forma de laço e juntando os dois éxons. As setas vermelhas mostram onde os oxigênios ativados das hidroxilas reagem com os átomos de fósforo. Baseado em LEWIN (2007) e LODISH *et al.* (2003).

Os mecanismos que aumentam a diversidade de proteínas incluem o uso de múltiplos sítios de início de transcrição, *splicing* alternativo do pré-mRNA, poliadenilação, edição do pré-mRNA, e modificações pós traducionais das proteínas (MANIATIS e TASIC, 2002). Entre estes mecanismos, o *splicing* alternativo é considerado uma das fontes mais importantes de diversidade proteica em vertebrados (BLACK, 2000).

O *splicing* alternativo pode excluir sequências de éxons em alguns transcritos. Este processo permite que um único gene aumente sua capacidade codificante, gerando

isoformas de proteínas distintas em estrutura e função (BREITBART *et al.*, 1987; CÁCERES e KORNBLIHTT, 2002). Algumas alterações no padrão de *splicing* (Figura 4) incluem a remoção alternada de um éxon (cassete de éxons), a remoção ora de um éxon, ora do outro, mas nunca dos dois ao mesmo tempo (éxons mutuamente excludentes), éxons com sítios aceptores ou doadores internos, onde uma porção do éxon, mas não ele inteiro, é removida, e a retenção de íntron (BREITBART *et al.*, 1987).

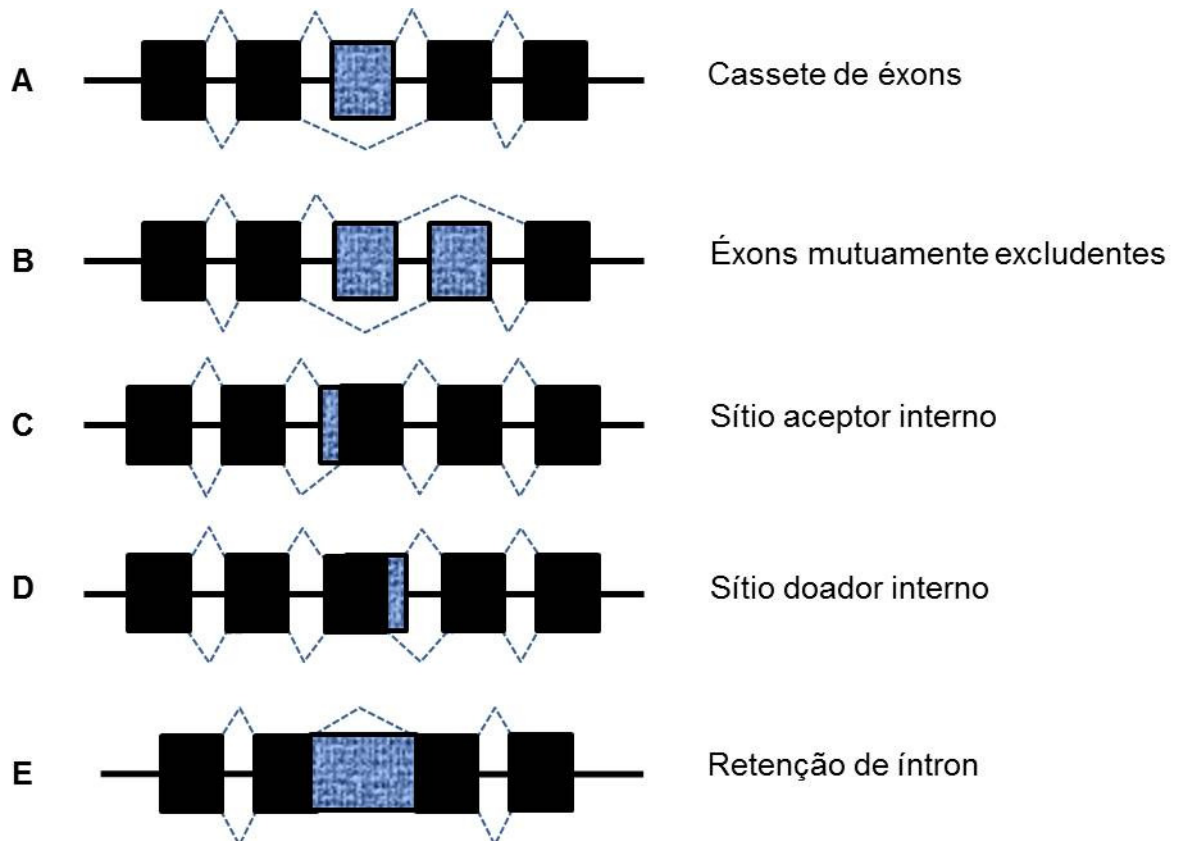


Figura 4. Exemplos de padrões de *splicing* alternativo. Éxons constitutivos (preto) e seqüências alternativas (azul) são reagrupados de acordo com diferentes padrões (linhas pontilhadas). Baseado em BREITBART *et al.* (1987).

Alterações no sítio de *splice* surgem de mudanças na formação do spliceossoma. Na maioria dos sistemas, a escolha do sítio de *splice* parece ser regulado por alteração na ligação dos fatores iniciais do pré-mRNA e na formação dos complexos de spliceossoma iniciais (BLACK, 2003).

2.4 ISOFORMAS E POLIMORFISMOS DO RECEPTOR DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE

Ainda que a expressão do receptor para o LH (LHR) seja imprescindível para a transição da dependência do FSH para o LH e conseqüente desenvolvimento morfológico e funcional dos folículos ovulatórios (BEG *et al.*, 2001), a caracterização do perfil transcricional do gene *LHR* demonstrou a existência de isoformas do *LHR* (produtos de “*splicing*” alternativo) em humanos (MINEGISHI *et al.*, 1997; MADHRA *et al.*, 2004), ratos (AATSINKI *et al.*, 1992), suínos (LOOSFELT *et al.*, 1989), ovinos (BACICH *et al.*, 1994; ABDENNEBI *et al.*, 2002) e bovinos (ROBERT *et al.*, 2003; HASTINGS *et al.*, 2006), incluindo bovinos de raças zebuínas (NOGUEIRA *et al.*, 2007), sendo que nem todas parecem ser funcionais. A deleção parcial do éxon 11, por exemplo, gera uma isoforma que não é transportada para a membrana celular (KAWATE, 2004), enquanto que a deleção do éxon 10 resulta em afinidade diminuída ao LH em relação ao hCG, que é uma gonadotrofina humana que possui ação semelhante ao hormônio luteinizante (MÜLLER *et al.*, 2003). Uma vez que os sítios de ligação do hormônio ao receptor ainda não foram identificados (PUETT *et al.*, 2010), tais isoformas geradas por *splicing* alternativo podem estar envolvidas na regulação da função do LHR e conseqüentemente afetar a eficiência reprodutiva dos indivíduos quando ocorrem alterações no seu padrão de expressão.

A presença de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) é uma característica importante para permitir alguma variabilidade genética e plasticidade fenotípica, inclusive para genes cuja conservação esperada é alta (MIGNON-GRASTEAU *et al.*, 2005). Mesmo os SNPs que não causam mudanças dos aminoácidos codificados (mutações silenciosas) podem causar uma tradução preferencial de códon (NOVOA e POULANA, 2012) e levar a alterações de fenótipo.

Especificamente para sequência codificadora do *LHR* em bovinos, quatro SNPs já foram identificados. Um SNP alterando C→T na posição 1328 do mRNA foi descrito na raça de corte Nelore, e associado com o número de oócitos viáveis obtidos para utilização em procedimentos de fecundação *in vitro* (SANTOS-BIASE *et al.*, 2012). Em outro estudo, três SNPs foram identificados em *Bos taurus*, nas raças *British Friesian* e *North American Holstein* (HASTINGS *et al.*, 2006). Os SNPs alteravam G→T na posição 1401, C→T na posição 1470, e G→T na posição 1581 do mRNA do *LHR* bovino. Considerando os

possíveis haplótipos, todas as variações foram associadas com alterações em fertilidade (intervalo entre partos, número de inseminações para concepção, índice de produção de leite, etc).

Todos os polimorfismos foram identificados no éxon 11 do receptor. Como este éxon é codificador para o domínio transmembrana e intracelular, pouco se pode afirmar sobre o efeito de polimorfismos nesta região na eficiência da ligação do LH ao receptor. São necessários estudos avaliando a presença e a associação de SNPs nos demais exons que codificam o domínio extracelular com a eficiência reprodutiva em animais com fenótipos bem estabelecidos.

3 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Apesar do papel central do LHR nos mecanismos de dominância folicular e ovulação, ainda existem importantes lacunas no conhecimento, particularmente quanto ao início e padrão de expressão deste receptor durante o crescimento folicular. Adicionalmente, pouca informação sobre as isoformas do receptor presentes em bovinos está disponível. Estes fatores impedem a associação da presença de *splicing* alternativos e polimorfismos a fenótipos reprodutivos específicos. Além disso, até o momento não foram realizados estudos em bovinos que avaliassem variantes do mRNA do *LHR* em modelos *in vivo*. Em geral, as investigações são realizadas com células obtidas de folículos de ovários removidos (ovarectomia) das doadoras o que gera um comprometimento definitivo da função reprodutiva dos animais, o que, além de restrições éticas, impossibilita a realização de avaliações sucessivas de um mesmo indivíduo e utilizando-se diferentes protocolos experimentais.

4 REFERÊNCIAS

- AATSINKI, J.T.; PIETILG, 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. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 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. 819–26, 2002.
- ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC, J.P.; KO, J.C.H.; GINTHER, O.J. Association between surger of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.94, p.177-188, 1992.
- ADAMS, G.P.; JAISWA, L R.; SINGH, J.; MALHI, P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, v.69, p. 72-80, 2008.
- ARASHIRO, E.K.N. **Adequação de metodologias para o estudo *in vivo* da vascularização e da caracterização do fluido folicular e células da granulosa**. 2012. Tese (Doutorado em Ciência Animal), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.
- BACICH, D.J.; ROHAN, R.M.; NORMAN, R.J.; RODGERS, R.J. Characterization and relative abundance of alternatively spliced luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid in the ovine ovary. **Endocrinology**, v.135, p.735-744, 1994.
- BAO, B.; GARVERICK, A.; SMITH, G.W.; SMITH, M.F.; SALFEN, B.E.; YOUNGQUIST, R.S. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. **Biology of Reproduction**, v.56, p.1158-1168, 1997.
- BAO, B.; GARVERICK, H.A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **Journal of Animal Science**, v.76, p.1903-1921, 1998.
- BEG, M.A.; BERGFELD, 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.
- BLACK, D.L. Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology. **Cell**, v.103, p.367-370, 2000.
- BLACK, D.L. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. **Annual Review of Biochemistry**, v.72, p.291-336, 2003.

- BREITBART, R.E.; ANDREADIS, A.; NADAL-GINARD, B. Alternative splicing: A mechanism for the generation of multiple protein isoforms from single genes. **Annual Review of Biochemistry**, v.56, p.467-495, 1987.
- CÁCERES, J.F.; KORNBLIHTT, A. R. Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. **TRENDS in Genetics**, v.18, n.4, p.186-193, 2002.
- COUSE, J.F.; HEWITT, S.C.; KORACH, K.S. Steroid Receptors in the ovary and uterus. In: Knobil, E.; Neill, J.D. (eds), **The Physiology of Reproduction**, 3rd ed. Elsevier. 2006.
- DUFAU, M.L.; TSAI-MORRIS, C.H.; HU, Z.Z.; BUCZKO, E. Structure and Regulation of the Luteinizing Hormone Receptor Gene. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.53 (1-6), p.283-291, 1995.
- ESPEY, L.L. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. **Biology of Reproduction**, v.50, p. 233-238, 1994.
- ESPEY, L.L.; BELLINGER, A.S.; HEALY, J.A. Ovulation: an inflammatory cascade of gene expression. In: Leung, P.C.K; Adashi, E.Y. (Eds.), **The Ovary**, 2nd ed. Elsevier. 2004.
- ESPEY, L.L.; LIPNER, H. Ovulation. In: Knobil, E.; Neill, J.D. (eds), **The Physiology of Reproduction**, 3rd ed. Elsevier. 2006.
- FORTUNE, J. E.; QUIRK, S.M. Regulation of steroidogenesis in bovine preovulatory follicles. **Journal of Animal Science**, v.66, suppl. 2, p.1-8, 1988.
- FORTUNE, J. E.; RIVERA, G.M.; YANG, M.Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, v.82-83 p.109-126, 2004.
- GINTHER, O.J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal association among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.87, n.1, p.223-230, 1989.
- 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.1187-1194, 1996.
- 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.
- GREYLING, J.P.C.; VAN DER NEST, M.; SCHWALBACH, L.M.J.; MULLER, T. Superovulation and embryo transfer in South African Boer and Indigenous feral goats. **Small Ruminant Research**, v.43, p.45-51, 2002.
- HASTINGS, N.; DONN, S.; DERECKA, K.; FLINT, A.P.; WOOLLIAMS, J.A. Polymorphisms within the coding region of the bovine luteinizing hormone receptor gene and their association with fertility traits. **Animal Genetics**, v.37, p.583-585, 2006.
- HUHTANIEMI, I. Functional consequences of mutations and polymorphisms in gonadotropin and gonadotropin receptor genes. In: Leung, P.C.K; Adashi, E.Y. (Eds.), **The Ovary**, 2nd ed. Elsevier. 2004.

KAWATE, N. Studies on the regulation of expression of luteinizing hormone receptor in the ovary and the mechanism of follicular cyst formation in ruminants. **Journal of Reproduction and Development**, v.50, p.1-8, 2004.

LEWIN, B. **Genes IX**. 9th ed. Jones & Bartlett Learning. 2007.

LODISH, H.; BERK, A.; MATSUDAIRA, P.; KAISER, C.A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M.P.; ZIPURSKY, L.; DARNELL, J. **Molecular cell biology**. 5th ed. WH Freeman. 2004.

LOOSFELT, M. H.; MISRAHI, M.; ATGER, M.; SALESSE, R.; THI, M.T.V.H-L.; JOLIVET, A.; GUIOCHON-MANTEL, A.; SAR, S.; JALLAL, B.; GARNIER, J.; MILGRON, E. Cloning and Sequencing of porcine LH-hCG receptor cDNA: Variants lacking transmembrane domain. **Science**, v.245, p.525-528, 1989.

MADHRA, M.; GAY, E.; FRASER, H.M.; DUNCAN, W.C. Alternative splicing of the human luteal LH receptor during luteolysis and maternal recognition of pregnancy. **Molecular Human Reproduction**, v.10, p.599–603, 2004.

MANIATIS, T.; TASIC, B. Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. **Nature**, v.418, p.236–243, 2002.

MIGNON-GRASTEAU, S.; BOISSY, A.; BOUIX, J.; FAURE, J.M.; FISHER, A.D.; HINCH, G.N.; JENSEN, P.; LE NEINDRE, P.; MORMÈDE, P.; PRUNET, P.; VANDEPUTTE, M.; BEAUMONT, C. Genetics of adaptation and domestication in livestock. **Livestock Production Science**, v.93, p.3-14, 2005.

MINARÉ, T.P. Avaliação da eficiência da superovulação em bovinos da raça Gir baseada na mobilização da população folicular. 2013. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade José do Rosário Velanno – UNIFENAS, Alfenas, Minas Gerais, 2013.

MINEGISHI, T.; TANO, M.; ABE, Y.; NAKAMURA, K.; IBUKI, Y.; MIYAMOTO, K. Expression of luteinizing hormone/human chorionic gonadotrophin (LH/HCG) receptor mRNA in the human ovary. **Molecular Human Reproduction**, v.3, n.2, p.101-107. 1997.

MÜLLER, T.; GROMOLL, J.; SIMONI, M. Absence of Exon 10 of the Human Luteinizing Hormone (LH) Receptor Impairs LH, But Not Human Chorionic Gonadotropin Action. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.88, p.2242–2249, 2003.

NOGUEIRA, M.F.G.; BURATINI, JR J.; PRICE, C.A.; CASTILHO, A.C.S.; PINTO, 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. **Molecular Reproduction and Development**, v.74, p.680–686, 2007.

NOVOA, E.M.; POULANA, L.R. Speeding with control: codon usage, tRNAs, and ribosomes. **Trends in Genetics**, v.28, p.574-81, 2012.

PIERCE, B.A. Genetics: a conceptual approach. 4th ed. W.H.Freeman and Company. 2012.

PUETT, D.; ANGELOVA, K.; COSTA, M.R.; WARRENFELTZ, S.W.; FANELLI, F. The luteinizing hormone receptor: Insights into structure–function relationships and hormone-

receptor-mediated changes in gene expression in ovarian cancer cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.329, p.47–55, 2010.

RICHARDS, J.S.; RUSSELL, D.L.; ROBKER, R.L.; DAJEE, M.; ALLISTON, T.N. Molecular mechanisms of ovulation and luteinization. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.145, p.47–54, 1998.

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

SANTOS-BIASE, W.K.; BIASE, F.H.; BURATINI JR, J.; BALIEIRO, J.; WATANABE, Y.F.; ACCORSI, M.F.; FERREIRA, C.R.; STRANIERI, P.; CAETANO, A.R.; MEIRELLES, F.V. Single nucleotide polymorphisms in the bovine genome are associated with the number of oocytes collected during ovum pick up. **Animal Reproduction Science**, v.134, p.141-149, 2012.

SEGALOFF, D.L. Diseases associated with mutations of the human lutropin receptor. In: Tao, Y.-X. (Ed.), **Progress in Molecular Biology and Translational Science: G Protein-Coupled Receptors in Health and Disease**, Part B. Elsevier. 2009.

SOUMANO, K.; LUSSIER, J.G.; PRICE, C.A. Levels of messenger RNA encoding ovarian receptors for FSH and LH in cattle during superovulation with equine chorionic gonadotrophin versus FSH. **Journal of Endocrinology**, v.156, p.373-378, 1998.

TARLATZIS, B.C.; ZEPHIRIDIS, L.; GRIMBIZIS, G.; BONTIS, J. Clinical management of low ovarian response to stimulation for IVF: a systematic review. **Human Reproduction Update**, v.9, n.1, p.61-76, 2003.

THIBIER, M. International Embryo Transfer Society: Data Retrieval Committee Annual Report. **Embryo Transfer Newsletter**, v.26, n.4, p.4-9, 2008.

TURZILLO, A. M.; FORTUNE, J.E. Suppression of the secondary FSH surge with bovine follicular fluid is associated with delayed ovarian follicular development in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.89, p.643-653, 1990.

VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A.; SIQUEIRA, L.G.B.; SOUZA, E.D.; FREITAS, C.; FERNANDES, C.A.C. Characteristics of the superovulatory response in Gyr (*Bos indicus*) cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v.17, p.311-312, 2007.

WEBB, R.; ARMSTRONG, D.G. Control of ovarian function; effect of local interactions and environmental influences on follicular turnover in cattle: a review. **Livestock Production Science**, v.53, p.95-112, 1998.

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. **Biology of Reproduction**, v.53, p.951-957, 1995.

CAPÍTULO 1: IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS E *SPLICING* ALTERNATIVO NO RECEPTOR DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE DE BOVINOS LEITEIROS

1 RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a presença de variabilidade no receptor do hormônio luteinizante (*LHR*) e a ocorrência de isoformas do mRNA em duas raças bovinas de leite. Células da granulosa foram recuperadas de folículos dominantes de 16 vacas Gir e 16 vacas Holandês. O RNA total foi extraído e os polimorfismos e isoformas foram identificados após a síntese do cDNA e PCR. Após o sequenciamento, os cromatogramas foram avaliados, e múltiplas sequências foram alinhadas. Os dados foram analisados para a presença de polimorfismos, frequência alélica, conteúdo de informação polimórfica (PIC) e Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE). Vinte e um polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) foram identificados no mRNA do receptor de LH. Dezesete SNPs foram identificados nos animais Gir (sete exclusivamente), e 14 SNPs foram encontrados em animais holandeses (quatro exclusivamente). Sete dos 21 polimorfismos encontrados não alteraram os aminoácidos traduzidos. Oito SNPs resultaram em alterações de grupos químicos dos aminoácidos. A classificação dos SNPs de acordo com os valores de PIC identificou 12 como altamente informativos em Gir e cinco em Holandês. Em relação a HWE, oito SNPs não estavam em equilíbrio em Gir e 11 em Holandês. Duas isoformas também foram identificadas, uma no éxon 1, que excluía 30 nucleotídeos iniciando na posição 118, e outra no éxon 10. Juntos, estes dados mostram que *LHR* em bovinos leiteiros apresenta uma alta frequência de polimorfismos e múltiplas isoformas resultantes de *splicing* alternativo.

2 INTRODUÇÃO

A dinâmica do desenvolvimento folicular em diversas espécies, incluindo bovinos, é caracterizada por sucessivas ondas de crescimento durante o ciclo estral (revisado por ADAMS *et al.*, 2008). Em cada onda, um conjunto de folículos se desenvolve simultaneamente, e posteriormente, um é selecionado como dominante. O folículo dominante bloqueia o desenvolvimento dos demais folículos pela redução nas concentrações do hormônio folículo estimulante (FSH), que é liberado pela hipófise (revisado por GINTHER *et al.*, 2001a). Neste ambiente, o folículo dominante precisa passar por mudanças que o tornem apto a continuar o desenvolvimento em baixas concentrações de FSH. A maior alteração é a transição da dependência do FSH para o hormônio luteinizante (LH) (GINTHER *et al.*, 2001b), que é mediada pela expressão elevada de LHR em células da granulosa e da teca no momento da seleção do folículo dominante. A ovulação é desencadeada pela ligação do LH ao seu receptor na membrana das células da granulosa ou da teca em folículos ovulatório maduros. Esta ligação ativa várias vias de transdução de sinal que induzem processos inflamatórios e alteram a expressão gênica resultando em modificação da morfologia do folículo e culminando com a ruptura do mesmo (ESPEY e LIPNER, 2006).

A expressão do LHR em células da granulosa é um mecanismo importante para o estabelecimento da taxa de ovulação espécie-específica (GINTHER *et al.*, 2001b) e conseqüentemente para a fertilidade. Contudo, polimorfismos e isoformas do *LHR* geradas por eventos de *splicing* alternativo também podem interferir nos eventos regulados por LH. Por exemplo, vários polimorfismos no *LHR* prejudicam resultados reprodutivos em humanos (revisado por THEMEN, 2005). Em bovinos, a ocorrência de polimorfismos de um único nucleotídeo (*Single Nucleotide Polymorphisms* – SNPs) neste receptor está associada com variações em características reprodutivas e de produção (HASTINGS *et al.*, 2006; SANTOS-BIASE *et al.*, 2012). Estes estudos, entretanto, examinaram apenas o éxon 11 do receptor e informações sobre os demais 10 éxons ainda não estão disponíveis. Estudos avaliando a estrutura do mRNA do *LHR* em diversas espécies têm identificado a presença de algumas isoformas (ABDENNEBI *et al.*, 2002; KAWATE, 2004; MADHRA *et al.*, 2004; NOGUEIRA *et al.*, 2007), porém nem todas parecem ser funcionais e a importância de sua expressão ainda é desconhecida.

A caracterização genômica e transcriptômica do *LHR* em bovinos pode ser útil para auxiliar na compreensão de diferenças em características reprodutivas entre raças, como aquelas observadas entre *Bos taurus* e *Bos indicus*. As raças bovinas leiteiras são um modelo interessante para o estudo do LHR uma vez que, por décadas, tem ocorrido uma forte pressão seletiva para a produção de leite, com clara interferência no desempenho reprodutivo e uma redução nos valores genéticos para fertilidade (ROYAL *et al.*, 2000; WASHBURN *et al.*, 2002; WEIGEL, 2004; BUTLER, 2014). Além disso, raças taurinas e zebuínas apresentam diferenças marcantes na dinâmica folicular ovariana e em suas respostas a tecnologias de reprodução assistida (revisado por SARTORI *et al.*, 2010). Desta forma, este estudo avaliou a variabilidade do *LHR* em bovinos leiteiros verificando a presença de polimorfismos e a ocorrência de isoformas de *LHR*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 População animal e localização

Este estudo foi realizado nos Laboratórios de Reprodução Animal e de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite, localizados em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Células da granulosa (CG) e amostras de sangue foram coletadas de vacas das raças Gir (*Bos indicus*, n=16) e Holandês (*Bos taurus*, n=16), múltiparas, não gestantes e não lactantes. As vacas eram provenientes de rebanhos compostos por linhagens mistas e foram selecionadas especificamente para evitar pelo menos duas gerações de parentesco direto. Todos os procedimentos realizados nos animais experimentais foram conduzidos de acordo com as diretrizes da Comissão de Ética, Bioética e Bem-Estar Animal (CEBEA) e foram aprovados pelo Comitê de ética no uso de animais da Embrapa Gado de Leite (Protocolo CEUA-EGL 03/2013; Anexo I).

3.2 Coleta de amostras e processamento

Em um estudo anterior foi demonstrado que o diâmetro do folículo dominante durante a divergência foi maior em animais da raça Holandês do que em animais da raça Gir ($8,7\pm 0,1$ vs. $6,9\pm 0,5$ mm, respectivamente; ARASHIRO *et al.*, 2013a). Portanto, neste estudo foram utilizadas células da granulosa recuperadas de folículos dominantes (após a divergência) de 10 mm para vacas Holandês e 8 mm para vacas Gir. As amostras de CG foram obtidas utilizando uma metodologia descrita anteriormente (ARASHIRO *et al.*, 2013b). A amostra recuperada foi então centrifugada a 600 X g por 10 min para separar o fluido e a fração de células. O sobrenadante (FF) foi removido e armazenado a -20 °C para análise hormonal. O pellet restante contendo CG foi lavado duas vezes em solução salina (NaCl 0.9%) e preservada em *RNA Later* (Ambion, Austin, TX, EUA) a -20 °C até a extração do RNA. O RNA total foi extraído utilizando o *RNeasy Micro Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram quantificadas utilizando o espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific, Walham, MA, EUA) e a qualidade foi avaliada utilizando Bioanalyzer 2100 (Agilent, Palo Alto, CA, EUA). A transcrição reversa foi realizada utilizando o *SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix Kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, as amostras foram armazenadas a -80 °C até a PCR.

A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com protocolo de Sambrook *et al.* (2001), com modificações. Foram coletadas amostras de sangue de vacas Gir e Holandês utilizando tubos a vácuo contendo EDTA. Os leucócitos foram separados por centrifugação e transferidos para tubos de 2 mL. As amostras foram lavadas com tampão de lise até que um *pellet* branco fosse obtido. O *pellet* foi então tratado com tampão de extração de DNA contendo RNase. Em seguida foi realizada incubação com proteinase K e o conteúdo proteico foi removido por tratamento com fenol-clorofórmio. O DNA foi precipitado com isopropanol/acetato de sódio. O *pellet* foi reidratado com etanol 70% e ressuspenso em Tris-EDTA. As amostras foram quantificadas utilizando o espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) e armazenadas a -80 °C até a PCR.

3.3 PCR e purificação das amostras

Os *primers* ou foram elaborados utilizando o programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>), de acordo com a sequência do receptor do hormônio luteinizante de bovinos disponível no banco de dados do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov; *accession number* NM_174381.1) ou foram obtidos de referência bibliográfica (Tabela 1) para sequenciar 2359 pares de base do transcrito.

Tabela 1. *Primers* utilizados para PCR e reações de sequenciamento.

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	Fragmento (bp)	AT (°C)	Concentração (nM)	Referência
LHR1	F - ATGGGACGGCCGTCCTCGCGCTGAGG R - CCCCCGGAAGGCGTCGTTGTGCATCTTCT	666	65	300	Kawate <i>et al.</i> 2004
LHR2	F - GCCTCAGCCGACTATCACTC R - CCGAGGGAGATTTGTAAACG	223	50	300	--
LHR3	F - ATGCCTTTGACAACCTCCTC R - GAATGGACTCTAGCCCGTAGG	462	52	200	--
LHR4	F - CTGGAGCTGAAGGAAAATGC R - ATCCAGCCACTCAGTTCAC	387	50	300	-- Robert <i>et al.</i> 2003
LHR5	F - GAAAGCACAGCAAGGAGACC R - GTCTGCAAAGGCGAGGTTGC	281	53	300	--
LHR6	F - CAAACTGACAGTCCCCGCTTT R - GCAACACGGCAATGAGAGTA	335	52	300	Marson <i>et al.</i> 2008 Hastings <i>et al.</i> 2006
LHR7	F - CAAAAGCTGCGACTGAAACA R - CAACAGAAAGAAATCCCTTTGG	484	48	500	-- Robert <i>et al.</i> 2003
LHR8	F - ATCCAGAGCTGATGGCTACC R - ATAGCAAGTCTTGTCAGGA	425	50	300	-- Nogueira <i>et al.</i> 2007
LHR9	F - AAAGGCATTCCAAAGGGATT R - TACTACCCAAAGCAATTTATAGATTC	462	47	500	--
LHR DNA	FORWARD LHR1 R - CTCACAGTCGGCTGAGGCCG	172	60	300	Kawate <i>et al.</i> 2004 --

AT: *Annealing Temperature* – Temperatura de ligação dos *primers*

--: Sequência de *primer* desenhada especificamente para este estudo.

Os *primers* foram desenhados de forma a gerar fragmentos com sobreposição de sequência de aproximadamente 70 pares de base em cada extremidade (Figura 1). Os protocolos de PCR estão apresentados a seguir separadamente.

3.3.1 Protocolo de PCR 1:

Cada PCR era composta por tampão de PCR (1X), $MgCl_2$ (2 mM), dNTPs (0,2 mM), *primers* (*forward* e *reverse*, Tabela 1), Hot Start Taq Polymerase (1U, Promega, Madison, WI, EUA), cDNA (equivalente a 8 ng de RNA), e água até um volume final de 20 μ L. A condição de corrida para os *primers* LHR2, LHR3, LHR4, LHR5, LHR6, LHR7, LHR8 e LHR9 foi elaborada utilizando o protocolo de PCR *Touchdown* (KORBIE e MATTICK, 2008) como segue: 94°C por 2 min seguidos de 10 ciclos de 94°C por 45 seg, 10°C acima da temperatura específica do *primer* (Tabela 1) por 30 seg (decrecendo 1°C a cada ciclo), e 72°C por 1 min; 30 ciclos de 94°C por 45 seg, temperatura específica do *primer* (Tabela 1) por 30 seg, e 72°C por 1 min.

3.3.2 Protocolo de PCR 2:

O *primer* LHR1 possui conteúdo Guanina-Citosina de aproximadamente 70%; por isso, 2M de betaína (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foram adicionados à reação (composição descrita no Protocolo 1) para melhorar a eficiência da amplificação do fragmento. Para este *primer* a condição de PCR foi 94°C por 2 min seguidos 40 ciclos de 94°C por 45 seg, 65°C por 30 seg, e 72°C por 1 min. Não foi utilizado protocolo *Touchdown*.

3.3.3 Protocolo de PCR 3:

Para amplificar um fragmento da região inicial do transcrito menor do que aquele amplificado com o par de *primer* LHR1, foi realizada outra PCR utilizando os *primers* LHR1 *forward* e LHR2 *reverse*. Os componentes das reações foram os mesmos descritos para o Protocolo de PCR 2. Devido ao conteúdo GC dos *primers* e subsequente diferença na temperatura de anelamento, a condição de PCR para este conjunto de *primers* foi: 94°C por 2 min seguidos de 40 ciclos de 94°C por 45 seg, 65°C por 30 seg (anelamento do *primer* LHR1 *forward*) seguido de 50°C por 30 seg (anelamento do *primer* LHR2 *reverse*) (Tabela 1), e 72°C por 1 min.

3.3.4 Protocolo de PCR 4:

O *primer* LHR DNA foi utilizado para determinar se uma divergência no tamanho do fragmento obtido na região inicial do transcrito era devido a uma deleção genômica ou a um evento de *splicing* alternativo. Cada PCR era composta por tampão de PCR (1X), MgCl₂ (2 mM), dNTPs (0,2 mM), *primers* (*forward* e *reverse*, Tabela 1), Taq Polymerase (1U, Promega), DNA (50 ng), e água até um volume final de 20 µL. A condição de corrida foi estabelecida como segue: 94°C por 2 min seguidos de 40 ciclos de 94°C por 45 seg, 60°C por 30 seg, e 72°C por 1 min.

Após cada PCR, os fragmentos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (1%) e as bandas observadas foram cortadas e purificadas utilizando o *GFX DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram quantificadas em Nanodrop (Thermo Scientific) e armazenadas a -20°C até a utilização nas reações de sequenciamento.

3.4 Sequenciamento do DNA

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE DNA Analysis Systems* (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos das reações de sequenciamento foram injetadas no aparelho Mega BACE 1000 utilizando parâmetros de corrida pré-estabelecidos. Os cromatogramas resultantes foram avaliados utilizando o programa *DNA Baser* (DNA Baser Sequence Assembler v3.5.4., Heracle BioSoft SRL, www.DnaBaser.com). As sequências foram alinhadas utilizando o programa MEGA 5 (TAMURA *et al.*, 2011).

3.5 Análise dos dados

As informações sobre os polimorfismos (frequência alélica, Equilíbrio de Hardy-Weinberg, e índice de fixação) foram analisadas utilizando o programa POPGENE (FRANCIS *et al.*, 1997). Os valores de PIC foram determinados de acordo com Botstein *et al.* (1980) e Petkov *et al.* (2004) como $2pq$, sendo p e q as frequências alélicas de um

SNP. Devido à natureza bialélica dos SNPs, os valores de PIC variaram de 0,0 a 0,5. Os polimorfismos foram testados para Equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizando teste de razão de verossimilhança a um nível de $P > 0,05$.

4 RESULTADOS

Após análise das sequências, 21 SNPs foram identificados no mRNA do receptor de LH. As informações sobre estes SNPs estão resumidas na Tabela 2 e as posições demonstradas na Figura 1. Para os animais da raça Gir, 17 SNPs foram identificados e distribuídos da seguinte forma: 13 SNPs eram heterozigotos (SNPs 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 12, 13, 16, 18, 20, e 21), o que significa que estavam presentes em duas formas simultaneamente (p.ex., A e T); quatro SNPs eram homozigotos (SNPs 1, 10, 11, e 19) e, portanto, representados por um único nucleotídeo (G, G, G, e A, respectivamente). Para os animais da raça Holandês, 14 SNPs foram identificados sendo: três SNPs heterozigotos (SNPs 3, 4, e 13) e 11 SNPs homozigotos (SNPs 1, 2, 6, 8, 10, 11, 12, 14, 15, 17, e 18, representados por G, T, C, A, G, G, A, A, T, T, e A, respectivamente). As sequências foram comparadas com a informação sobre o transcrito de *LHR* bovino (*Bos taurus*) disponível no GenBank (*accession number* NM_174381). Esta análise revelou que sete dos SNPs foram encontrados exclusivamente em Gir, enquanto quatro SNPs foram encontrados somente em Holandês (Tabela 2). Para deduzir as possíveis consequências fisiológicas de cada SNP, seu impacto na tradução dos aminoácidos foi avaliado. Dos 21 polimorfismos identificados, apenas sete não alteraram o aminoácido traduzido. Dos 14 restantes, oito alteraram os grupos químicos dos aminoácidos produzidos.

De acordo com os valores de PIC para os polimorfismos, 12 SNPs foram classificados com altamente informativos ($P > 0,25$) em Gir e cinco em Holandês. Em relação a HWE, oito SNPs não estavam em equilíbrio em Gir e 11 em Holandês (Tabela 2).

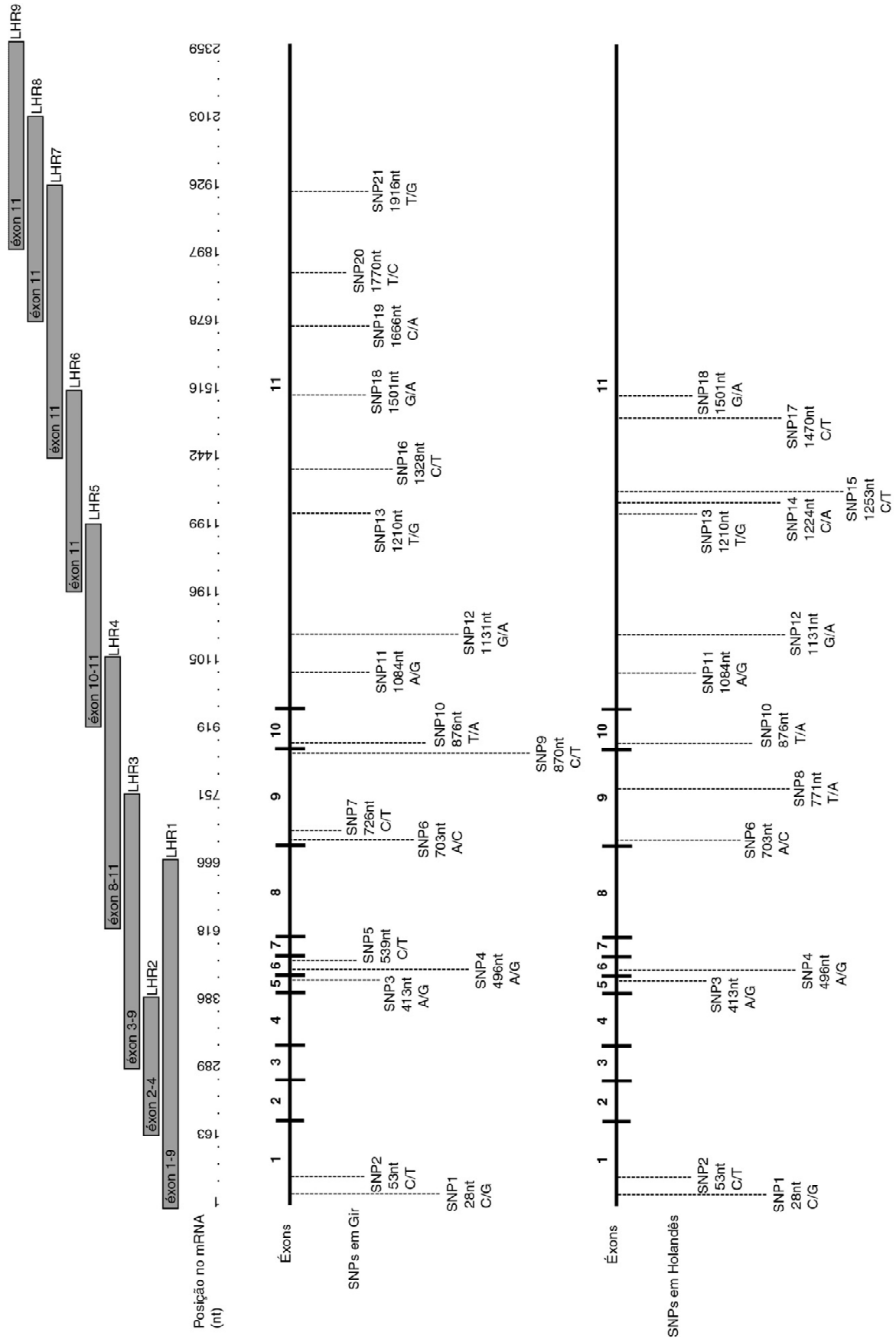


Figura 1. Esquema da cobertura dos *primers* e posição dos SNPs encontrados nos 11 éxons do transcrito do Receptor de Hormônio Luteinizante para cada raça avaliada.

Tabela 2. Posição, frequências alélicas e estatísticas para os polimorfismos encontrados no transcrito do *LHR* bovino. Os maiores valores estão destacados em negro.

Raça	SNPs	Posição ^a	Éxon	Mudança de Nucleotídeo (Normal-Variante)	Mudança de Aminoácido (Normal→ Variante)	Frequência do alelo normal	Frequência do alelo variante	PIC ^b	HWE ^c (P)	
Gir	SNP1	28	1	C-G	Leu→Val	0.11	0.89	0.20	<0.01	
	SNP2	53	1	C-T	Pro→Leu	0.21	0.79	0.33	>0.05	
	SNP3	413	5	A-G	His→Arg	0.57	0.43	0.49	>0.05	
	SNP4	496	6	A-G	Ile→Val*	0.57	0.43	0.49	>0.05	
	SNP5	539	6	C-T	Thr→Met*	0.63	0.37	0.47	>0.05	
	SNP6	703	9	A-C	Lys→Gln*	0.83	0.17	0.28	>0.05	
	SNP7	726	9	C-T	Tyr	0.87	0.13	0.23	>0.05	
	SNP9	870	9	C-T	Asn	0.77	0.23	0.35	<0.01	
	SNP10	876	10	A-G	Gln	0.20	0.80	0.32	<0.001	
	SNP11	1084	11	A-G	Asn→Asp*	0.27	0.73	0.39	<0.001	
	SNP12	1131	11	G-A	Thr	0.23	0.77	0.35	<0.01	
	SNP13	1210	11	T-G	Ser→Ala*	0.77	0.23	0.35	>0.05	
	SNP16	1328	11	C-T	Ala→Val	0.23	0.77	0.35	<0.001	
	SNP18	1501	11	G-A	Val→Met	0.37	0.63	0.47	<0.001	
	SNP19	1666	11	C-A	Gln→Lys*	0.87	0.13	0.23	<0.001	
	SNP20	1770	11	T-C	Phe	0.97	0.03	0.06	>0.05	
	SNP21	1916	11	T-G	Leu→Trp*	0.97	0.03	0.06	>0.05	
	Holandês	SNP1	28	1	C-G	Leu→Val	0.00	1.00	0	
		SNP2	53	1	C-T	Pro→Leu	0.80	0.20	0.32	<0.05
		SNP3	413	5	A-G	His→Arg	0.93	0.07	0.13	>0.05
		SNP4	496	6	A-G	Ile→Val*	0.97	0.03	0.06	>0.05
SNP6		703	9	A-C	Lys→Gln*	0.79	0.21	0.33	<0.001	
SNP8		771	9	T-A	Ser	0.92	0.08	0.15	<0.01	
SNP10		876	10	A-G	Gln	0.42	0.58	0.49	<0.001	
SNP11		1084	11	A-G	Asn→Asp*	0.93	0.07	0.13	<0.01	
SNP12		1131	11	G-A	Thr	0.93	0.07	0.13	<0.01	
SNP13		1210	11	T-G	Ser→Ala*	0.60	0.40	0.48	<0.01	
SNP14		1224	11	C-A	Phe→Leu*	0.93	0.07	0.13	<0.01	
SNP15		1253	11	C-T	Ala→Val	0.93	0.07	0.13	<0.01	
SNP17		1470	11	C-T	Leu	0.93	0.07	0.13	<0.01	
SNP18		1501	11	G-A	Val→Met	0.67	0.33	0.44	<0.001	

^a Iniciando no primeiro ATG na sequência do GenBank (*accession number* NM_174381); *Mudança no grupo do aminoácido; ^bPIC – Conteúdo de Informação Polimórfica; ^cHWE – Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A avaliação do transcrito também revelou duas isoformas provenientes de eventos de *splicing* alternativo (Figura 2), ambas observadas em gel de agarose e posteriormente confirmadas por análise de sequência. Em uma isoformas, o *splicing* ocorreu no éxon 1

com a exclusão de 30 nucleotídeos iniciando na posição 118. Contudo, esta alteração não modificou a matriz de leitura para a tradução dos aminoácidos. A segunda isoforma identificada apresentava ausência do éxon 10.

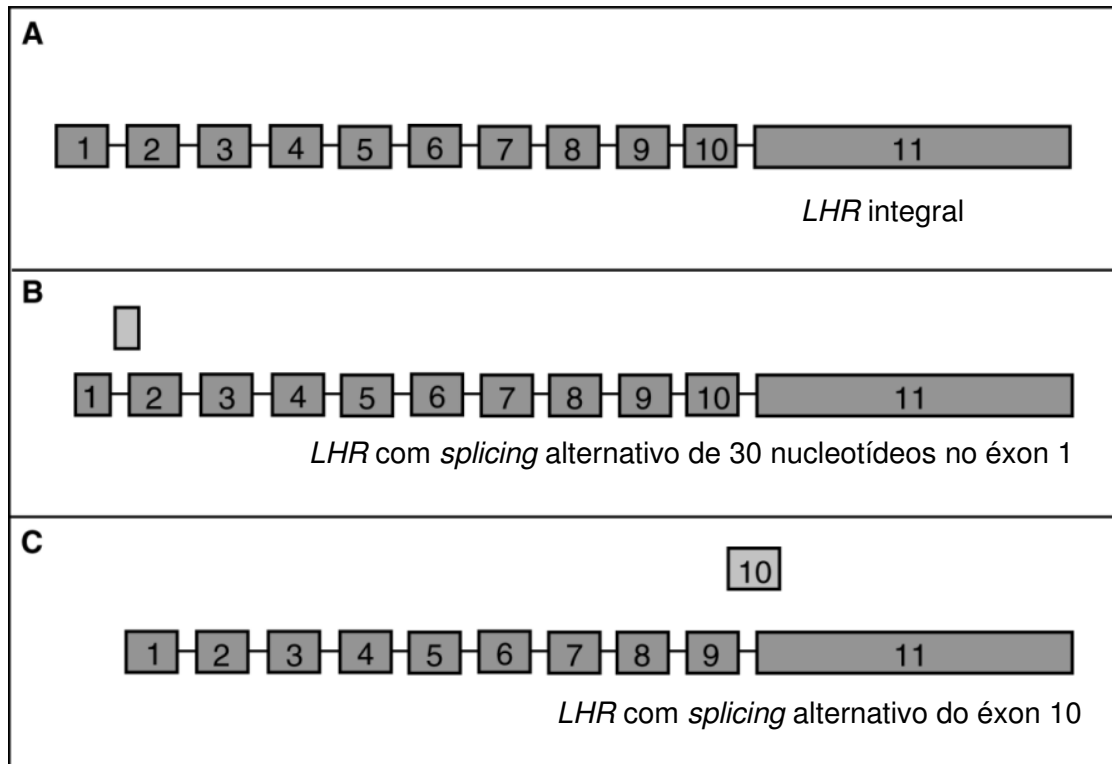


Figura 2. *Splicing* alternativo do mRNA do receptor do hormônio luteinizante (LHR). **A** – Receptor completo contendo 11 éxons; **B** – Receptor apresentando *splicing* alternativo de 30 nucleotídeos no éxon 1; **C** – Receptor apresentando *splicing* alternativo do éxon 10 completo.

Para determinar se a exclusão dos 30 nucleotídeos era resultado de uma alteração na sequência genômica ou um evento de *splicing* no mRNA, foi realizada PCR utilizando o *primer* que incluía uma região codificadora do mRNA (LHR1 *forward* - anelamento ocorrendo no éxon 1) e uma região do DNA (LHR DNA reverse – anelamento ocorrendo no íntron 1). Os resultados desta reação (Figura 3) revelaram que o fragmento obtido apresentava o mesmo tamanho (172 pares de base) com amostras com e sem a divergência de tamanho observada anteriormente na análise da sequência do mRNA, sugerindo que a exclusão dos 30 nucleotídeos era devida a evento de *splicing* alternativo.

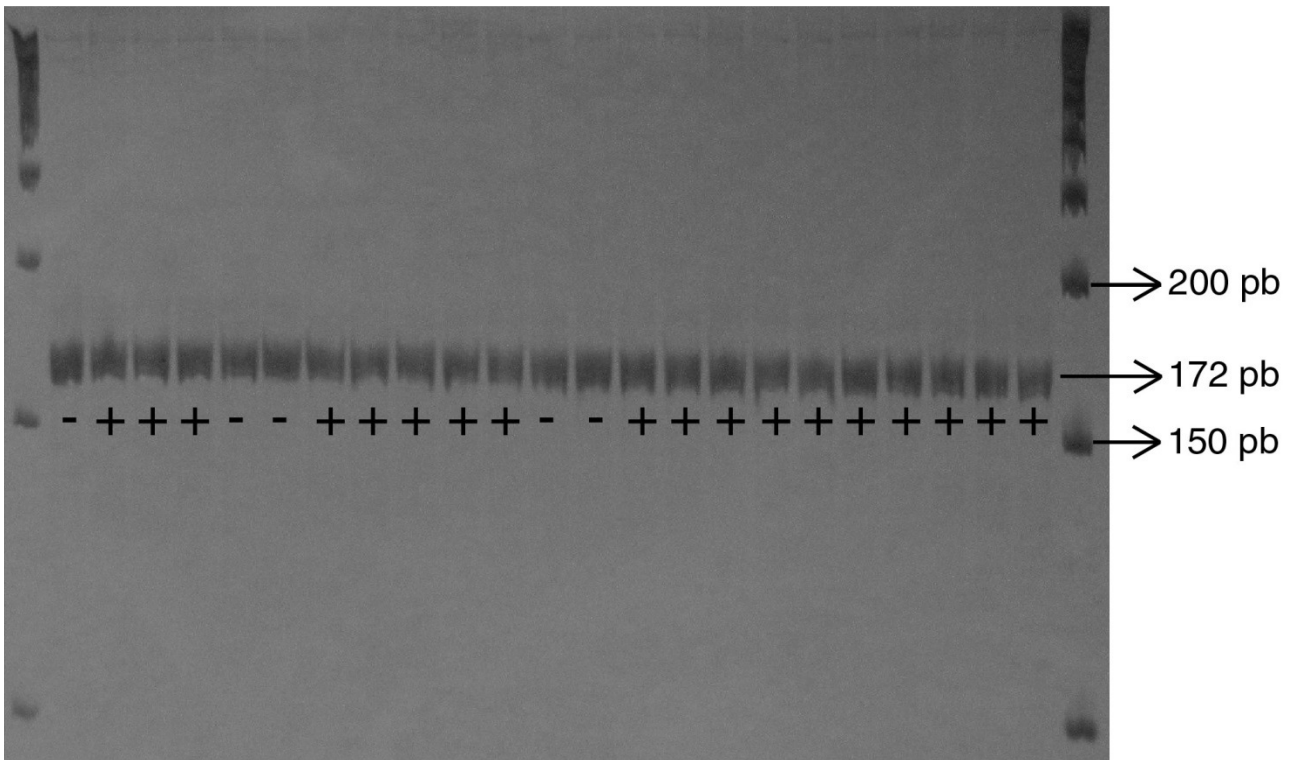


Figura 3. Eletroforese (gel de poliacrilamida, 5%) dos produtos de PCR para investigar a possível deleção no DNA. +, amostras que apresentavam ausência de 30 nucleotídeos nos fragmentos de mRNA sequenciados; -, amostras que apresentavam fragmento de mRNA completo no sequenciamento.; bp, pares de base. O padrão de peso molecular utilizado identificava intervalos de 50 bp.

5 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi identificar SNPs e isoformas de mRNA geradas por eventos de *splicing* alternativo em transcritos do *LHR* em bovinos leiteiros. Para deduzir as possíveis consequências fisiológicas dos SNPs na função do LHR, o impacto dos polimorfismos nos aminoácidos que seriam traduzidos foi avaliado. Dos 21 polimorfismos identificados, apenas sete não alteraram o aminoácido traduzido. Oito deram origem a aminoácidos de grupos químicos diferentes dos que seriam produzidos sem as alterações. Portanto, os SNPs podem causar mudanças na estrutura terciária da proteína traduzida e eventualmente alterar propriedades funcionais, como a afinidade de ligação do LHR ao LH. Entretanto, a estrutura tri-dimensional do sítio de ligação do LHR, mesmo em humanos, permanece desconhecida (PUETT *et al.*, 2010). Como resultado, a relevância fisiológica dos SNPs identificados neste estudo ainda terá que ser esclarecida.

Mesmo os SNPs que não causam mudanças dos aminoácidos codificados podem causar uma tradução preferencial de códon (NOVOA e POULANA, 2012), que pode estar relacionada com diferentes fenótipos reprodutivos.

O SNP16, encontrado exclusivamente em amostras da raça Gir, já foi descrito anteriormente na raça de corte Nelore (SANTOS-BIASE *et al.*, 2012), sugerindo que este SNP é uma variante específica do Gado zebuíno. Os autores sugerem que este polimorfismo afeta o número de oócitos viáveis em protocolos de fecundação *in vitro*. De forma consistente, a raça Gir apresenta uma maior média de população folicular durante o ciclo estral e produz mais complexos *cumulus*-oócito (COC) após aspiração folicular guiada por ultrassonografia do que a raça Holandês (PONTES *et al.*, 2010). De forma interessante, o SNP16 foi encontrado em heterozigose, e entre doadoras Gir também existe uma alta variabilidade na população folicular e produção de COC (VIANA *et al.*, 2010), o que sugere que este SNP pode ser um alvo interessante para futuros estudos fenômicos reprodutivos.

Neste estudo, o SNP17 foi encontrado exclusivamente em amostras da raça Holandês. Este SNP já havia sido identificado em outro estudo utilizando gado *B. taurus*, nas raças *British Friesian* e *North American Holstein* (HASTINGS *et al.*, 2006). Assim como o SNP16 no gado zebuíno, o SNP17 parece ser específico de raças europeias. Entretanto, este polimorfismo não resulta em alteração no aminoácido e é, portanto, pouco provável que modifique o dobramento da proteína. Hastings *et al.* (2006) identificaram dois SNPs adicionais (posições 1401G→T e 1581G→T), que não foram detectados nem nas amostras de Gir nem nas de Holandês utilizadas no presente estudo.

Devido à importância do LHR para a regulação da função ovariana, seria esperado que a sequência de nucleotídeos fosse altamente conservada entre os animais. Entretanto, mesmo para genes essenciais, alguma variabilidade é importante para permitir uma plasticidade fenotípica e a seleção natural (MIGNON-GRASTEAU *et al.*, 2005). A pressão da seleção artificial para características de produção pode alterar este equilíbrio e levar à endogamia aumentada e mudanças na variação genética de outras características. O número de polimorfismos encontrados em no presente estudo pode refletir as diferenças causadas pela pressão de seleção para muitas características aplicadas diferentemente para as duas raças avaliadas. A raça Gir, que começou a ser intensamente selecionada mais recentemente, apresentou a maior variabilidade genética, com apenas quatro SNPs homozigotos dos 17 identificados, enquanto na raça Holandês,

que tem sido intensamente selecionada por décadas, 11 dos 14 SNPs identificados eram homozigotos.

Os resultados de PIC e HWE (Tabela 2) sugerem que a frequência dos alelos no *LHR* está mudando e isto pode estar sendo direcionado pela forte pressão de seleção para produção de leite em raças de gado leiteiras ou pelos sistemas de acasalamento impostos às populações sob seleção, p.ex., endogamia. A seleção direcional aumenta a taxa de endogamia se comparada com a seleção aleatória uma vez que a seleção para uma determinada característica aumenta a probabilidade de co-seleção dos indivíduos relacionados por parentesco quando comparada com a seleção aleatória dentro e através das gerações (KRISTENSEN e SORENSEN, 2005). O número relativamente pequeno de touros utilizados intensamente no gado Gir leiteiro brasileiro, a rápida disseminação da raça, e a seleção focada na produção de leite têm contribuído para aumentar o coeficiente de endogamia, que pode resultar em perdas reprodutivas, produtivas, e econômicas (SANTANA JR. *et al.*, 2014). Na última década, tem ocorrido um aumento significativo no uso de técnicas de produção *in vitro* de embriões nesta raça (VIANA *et al.*, 2012), particularmente com sêmen sexado. Isto resulta na seleção de poucos indivíduos, em maior variação no sucesso reprodutivo (e tamanho de famílias) e, portanto, em uma alta taxa de endogamia (KRISTENSEN e SORENSEN, 2005). No gado Holandês, o efeito negativo da seleção para produção de leite no desempenho reprodutivo é bem conhecido. Entretanto, permanece controverso se este é um efeito direto ou se é mediado por parâmetros metabólicos em vacas de alta produção (BUTLER, 2014).

Este estudo também identificou duas variantes formadas por *splicing* alternativo (Figura 1), uma no éxon 1, e outra no éxon 10. Estes dados forneceram a primeira descrição do *splicing* no éxon 1. Estudos anteriores podem não ter identificado esta isoforma devido a grande quantidade de GC nesta região, o que demandou adaptações metodológicas para viabilizar tal achado. O alto conteúdo GC (%) no DNA afeta a eficiência da amplificação, uma vez que *primers* e DNA molde ricos em GC podem impedir a desnaturação, anelamento, e extensão durante o curso das amplificações na PCR (MCDOWELL *et al.*, 1998, LI *et al.*, 2011). A principal causa de amplificação ineficiente na PCR é a baixa eficiência da ligação do *primer*. Desta forma, as propriedades dos *primers* são de vital importância para a amplificação, especialmente nas amostras de DNA rica em GC. Grande parte da literatura disponível afirma que o desenho do *primer* deve minimizar a formação de estruturas secundárias. Entretanto, existe pouca informação sobre como ajustar os outros parâmetros do desenho do *primer* (LI *et al.*,

2011). Geralmente sugere-se que as temperaturas de ligação dos *primers forward* e *reverse* devem ser mais similares o possível. Contudo, isto nem sempre é possível porque as regiões para as quais os *primers* estão sendo desenhados podem não apresentar o mesmo conteúdo GC. Para amplificar com sucesso a região inicial do mRNA do *LHR*, foram utilizados *primers* (*forward* e *reverse*) com temperaturas de ligação diferentes (aproximadamente 15°C), o que exigiu um passo de anelamento de dois estágios na PCR. O *splicing* no éxon 1 causou a exclusão de 30 pares de base, mas não alterou a matriz de leitura para a codificação dos aminoácidos. Estudos adicionais são necessários para elucidar a importância desta isoformas.

A segunda variante de *splicing* encontrada não apresentava o éxon 10. Esta isoforma já foi descrita anteriormente em bovinos (ROBERT *et al.*, 2003; NOGUEIRA *et al.*, 2007) e em humanos (MULLER *et al.*, 2003; MADHRA *et al.*, 2004). Apesar de ter sido relatada como mais responsiva a gonadotrofina coriônica humana (hCG) do que ao LH (MULLER *et al.*, 2003), sua relevância biológica permanece pouco clara. A forma integral e ambas as isoformas descritas em neste estudo foram identificadas em todas as amostras avaliadas, sugerindo que a expressão destas diferentes variantes de *LHR* desempenha papel na regulação da função das células da granulosa.

Em conclusão, o *LHR* apresenta alta frequência de polimorfismos e de isoformas geradas por *splicing* alternativo apesar de seu papel em um mecanismo altamente conservado. Juntos, estes resultados fornecem a informação genômica e transcriptômica que pode ser utilizada em futuros estudos de associação para avaliar como as variantes do *LHR* podem estar relacionadas com os fenótipos reprodutivos.

6 REFERÊNCIAS

- 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.; JAISWA, L R.; SINGH, J.; MALHI, P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, v.69, p.72-80, 2008.

- ARASHIRO, E.K.N.; PALHAO, M.P.; SANTOS, J.R.L.; FONTES, R.C.; SIQUEIRA, L.G.B.; HENRY, M.; VIANA, J.H.M. Three-dimensional modeling of color Doppler images: a new approach to study follicular vascularization in cattle. **Animal Reproduction**, v.10, p.662-669, 2013a.
- ARASHIRO, E.K.N.; PALHAO, M.P.; WOHLRES-VIANA, S.; SIQUEIRA, L.G.B.; CAMARGO, L.S.A.; HENRY, M.; VIANA, J.H.M. In vivo collection of follicular fluid and granulosa cells from individual follicles of different diameters in cattle by an adapted ovum pick-up system. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.11, p.73-80, 2013b.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in Man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.
- BUTLER, S.T. Genetic control of reproduction in dairy cows. **Reproduction Fertility and Development**, v.26, p.1-11, 2014.
- ESPEY, L.L.; LIPNER, H. **Ovulation**. In: Knobil, E.; Neill, J.D. (eds), *The Physiology of Reproduction*, 3rd ed. Elsevier. 2006.
- FRANCIS, Y.; YANG, C.; BOYLE, R.C.; TIMOTHY, B.J.; YE, Z.H.; MAO, J.X. **POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis**. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada. 1997.
- GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; DONADEU, F.X.; KOT, K. Follicle selection in monovular species. **Biology of Reproduction**, v.65, p.638-647, 2001a.
- 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, 2001b.
- HASTINGS, N.; DONN, S.; DERECKA, K.; FLINT, A.P.; WOOLLIAMS, J.A. Polymorphisms within the coding region of the bovine luteinizing hormone receptor gene and their association with fertility traits. **Animal Genetics**, v.37, p.583-585, 2006.
- KAWATE, N. Studies on the regulation of expression of luteinizing hormone receptor in the ovary and the mechanism of follicular cyst formation in ruminants. **Journal of Reproduction and Development**, v.50, p.1-8, 2004.
- KORBIE, D.J.; MATTICK, J.S. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. **Nature Protocols**, v.3, p.1452-1456, 2008.
- KRISTENSEN, T.N.; SORENSEN, A.C. Inbreeding – lessons from animal breeding, evolutionary biology and conservation genetics. **Animal Science**, v.80, p.121-133, 2005.
- LI, L.Y.; LI, Q.; YU, Y.H.; ZHONG, M.; YANG, L.; WU, Q.H.; QIU, Y.R.; LUO, S.Q. A primer design strategy for PCR amplification of GC-rich DNA sequences. **Clinical Biochemistry**, v.44, p.692-698, 2011.
- MADHRA, M.; GAY, E.; FRASER, H.M.; DUNCAN, W.C. Alternative splicing of the human luteal LH receptor during luteolysis and maternal recognition of pregnancy. **Molecular Human Reproduction**, v.10, p.599–603, 2004.

- MARSON, E.P.; FERRAZ, J.B.S.; MEIRELLES, F.V.; BALIEIRO, J.C.C.; ELER, J.P. Effects of polymorphisms of LHR and FSHR genes on sexual precocity in a *Bos Taurus* x *Bos indicus* beef composite population. **Genetics and Molecular Research**, v.7, p.243-251, 2008.
- MCDOWELL, D.G.; BURNS, N.A.; PARKES, H.C. Localised sequence regions possessing high melting temperatures prevent the amplification of a DNA mimic in competitive PCR. **Nucleic Acids Research**, v.26, p.3340-3347, 1998.
- MIGNON-GRASTEAU, S.; BOISSY, A.; BOUIX, J.; FAURE, J.M.; FISHER, A.D.; HINCH, G.N.; JENSEN, P.; LE NEINDRE, P.; MORMÈDE, P.; PRUNET, P.; VANDEPUTTE, M.; BEAUMONT, C. Genetics of adaptation and domestication in livestock. **Livestock Production Science**, v.93, p.3-14, 2005.
- MÜLLER, T.; GROMOLL, J.; SIMONI, M. Absence of Exon 10 of the Human Luteinizing Hormone (LH) Receptor Impairs LH, But Not Human Chorionic Gonadotropin Action. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.88, p.2242–2249, 2003.
- NOGUEIRA, M.F.G.; BURATINI, JR J.; PRICE, C.A.; CASTILHO, A.C.S.; PINTO, 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. **Molecular Reproduction and Development**, v.74, p.680–686, 2007.
- NOVOA, E.M.; POULANA, L.R. Speeding with control: codon usage, tRNAs, and ribosomes. **Trends in Genetics**, v.28, p.574-581, 2012.
- PETKOV, P.M.; DING, Y.; CASSEL, M.A.; ZHANG, W.; WAGNER, G.; SARGENT, E.E.; ASQUITH, S.; CREW, V.; JOHNSON, K.A.; ROBINSON, P.; SCOTT, V.E.; WILES, M.V. An efficient SNP system for mouse genome scanning and elucidating strain relationships. **Genome Research**, v.14, p.1806-1811, 2004.
- PONTES, J.H.; SILVA, K.C.; BASSO, A.C.; RIGO, A.G.; FERREIRA, C.R.; SANTOS, G.M.; SANCHES, B.V.; PORCIONATO, J.P.; VIEIRA, P.H.; FAIFER, F.S.; STERZA, F.A.; SCHENK, J.L.; SENEDA, M.M. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, v.74, p.1349-1355, 2010.
- PUETT, D.; ANGELOVA, K.; COSTA, M.R.; WARRENFELTZ, S.W.; FANELLI, F. The luteinizing hormone receptor: Insights into structure–function relationships and hormone-receptor-mediated changes in gene expression in ovarian cancer cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.329, p.47–55, 2010.
- ROBERT, C.; GAGNÉ, D.; LUSSIER, J.G.; BOUSQUET, D.; BARNES, F.L.; SIRARD, M.A. Presence of LH receptor mRNA in granulosa cells as a potential marker of oocyte developmental competence and characterization of the bovine splicing isoforms. **Reproduction**, v.125, p.437–446, 2003.
- ROYAL, M.D.; DARWASH, A.O.; FLINT, A.P.F.; WEBB, R.; WOOLLIAMS, J.A.; LAMMING, G.E. Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility. **Animal Science**, v.70, p.487–501, 2000.

- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning. A laboratory manual**. New York : Cold Spring Harbor, volumes 1, 2 e 3. 2001.
- SANTANA JR., M.L.; PEREIRA, R.J.; BIGNARDI, A.B.; EL FARO, L.; TONHATI, H.; ALBUQUERQUE, L.G. History, structure, and genetic diversity of Brazilian Gir cattle. **Livestock Science**, v.163, p.26-33, 2014.
- SANTOS-BIASE, W.K.; BIASE, F.H.; BURATINI JR, J.; BALIEIRO, J.; WATANABE, Y.F.; ACCORSI, M.F.; FERREIRA, C.R.; STRANIERI, P.; CAETANO, A.R.; MEIRELLES, F.V. Single nucleotide polymorphisms in the bovine genome are associated with the number of oocytes collected during ovum pick up. **Animal Reproduction Science**, v.134, p.141-149, 2012.
- SARTORI, R.; BASTOS, M.R.; BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; ERENO, R.L.; BARROS, C.M. Physiological differences and implications to reproductive management of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle in a tropical environment. **Society for Reproduction and Fertility Supplement**, v.67, p.357-375, 2010.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, p.2731-2739, 2011.
- THEMMEN, A.P.N. An update of the pathophysiology of human gonadotrophin subunit and receptor gene mutations and polymorphisms. **Reproduction**, v.130, p.263-274, 2005.
- VIANA, J.H.; PALHAO, M.P.; SIQUEIRA, L.G.; FONSECA, J.F.; CAMARGO, L.S. Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (**Bos indicus**) cows undergoing repeated ovum pick-up. **Theriogenology**, v.73, p.966-972, 2010.
- VIANA, J.H.; SIQUEIRA, L.G.; PALHAO, M.P.; CAMARGO, L.S. Features and perspectives of the Brazilian *in vitro* embryo industry. **Animal Reproduction**, v.9, p.12-18, 2012.
- WASHBURN, S.P.; SILVIA, W.J.; BROWN, C.H.; MCDANIEL, B.T.; MCALLISTER, A.J. Trends in reproductive performance in southeastern Holstein and Jersey DHI herds. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.244–251, 2002.
- WEIGEL, K. Improving the reproductive efficiency of dairy cattle through genetic selection. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.E86–E92, 2004.

CAPÍTULO 2: PRODUÇÃO INTRAFOLICULAR DE ESTRADIOL E PADRÃO DE EXPRESSÃO DO RECEPTOR DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE E SUAS ISOFORMAS DURANTE A DIVERGÊNCIA FOLICULAR: CARACTERIZAÇÃO DOS MECANISMOS MOLECULARES EM BOS INDICUS UTILIZANDO UM MODELO *IN VIVO*

1 RESUMO

O objetivo deste estudo foi caracterizar o papel da produção intrafolicular de estradiol e o papel das isoformas do receptor do hormônio luteinizante (*LHR*) nas células da granulosa (CG) nas diferenças durante a divergência folicular entre raças leiteiras de animais *Bos indicus* e *Bos taurus*. A emergência da onda folicular foi sincronizada em novilhas Holandês (n=10) e Gir (n=10) e os folículos foram aspirados individualmente nos diâmetros correspondentes aos períodos de pré-divergência, divergência, e pós-divergência (aproximadamente 6, 8, 10 a 12 mm em Holandês; e 4, 6, 8 a 10 mm em Gir). As concentrações de estradiol intrafolicular (E2if) e progesterona (P4if) foram determinadas por RIA utilizando o fluido folicular (FF) e a expressão relativa de *Cyp19A1*, de *inibina A*, e das formas de *LHR* foi avaliada nas CG utilizando PCR em Tempo Real. Em ambas as raças, um aumento progressivo na concentração de E2if foi observado ao longo do desenvolvimento folicular. Além disso, o E2if foi maior em Holandês quando comparado com Gir ($P < 0,05$) antes, durante, e depois da divergência; mas foi similar ($P > 0,05$) em folículos de mesmo diâmetro nas duas raças. De forma similar, a expressão de *Cyp19A1* aumentou em ambas as raças na mesma variação de diâmetro e um pico de expressão de *LHR* total ocorreu após a divergência folicular. A expressão das isoformas de *LHR* foi baixa tanto em Holandês quanto em Gir durante este mesmo período. Estes resultados indicam que a divergência do folículo dominante em um menor diâmetro, em *Bos indicus*, não ocorre devido a um aumento antecipado da produção de estradiol, mas sim à um pico da expressão de *LHR* durante a divergência. Além disso, mudanças sequenciais no padrão de expressão das isoformas de *LHR* atuam na regulação fina da função do *LHR* durante a divergência folicular em bovinos.

2 INTRODUÇÃO

A divergência folicular é um mecanismo chave para o estabelecimento da taxa de ovulação espécie-específica em animais mono-ovulatórios, como os bovinos (revisado por GINTHER *et al.*, 2001a). O folículo dominante reprime o crescimento e induz a atresia dos folículos subordinados dentro da mesma onda folicular, ao mesmo tempo em que adquire progressivamente capacidade ovulatória (GINTHER *et al.*, 1996). Se a ovulação não ocorrer, o folículo dominante também entra em atresia e uma nova onda folicular emerge. O processo de seleção é caracterizado inicialmente por um desvio no padrão de crescimento do maior folículo dentro de um conjunto, após o qual ele irá crescer em uma taxa diferente quando comparado com seu grupo (folículos subordinados) (GINTHER *et al.*, 1997). O mecanismo de dominância é ativado principalmente por uma redução no FSH endógeno através de *feedback* negativo exercido pelo estradiol e pela inibina produzidos pelo folículo dominante, cujo crescimento subsequente é sustentado pela transição da dependência do FSH para LH (KULICK *et al.*, 1999; GINTHER *et al.*, 2001b). O efeito negativo do estradiol na liberação do FSH é bem estabelecido (GINTHER *et al.*, 1999; KULICK *et al.*, 1999) e tem sido amplamente utilizado em protocolos de sincronização da emergência da onda folicular tanto em *Bos taurus* (DISKIN *et al.*, 2002) quanto em *Bos indicus* (BO *et al.*, 2003). Também existem evidências para apoiar o papel do LH na divergência folicular: a aquisição de receptores de LH (LHR) antes da divergência pelas células da granulosa no futuro folículo dominante; a falta de crescimento folicular entre 7 e 9 mm na ausência de secreção de LH; e uma elevação transitória da secreção de LH durante a divergência (GINTHER *et al.*, 2001b, 2003).

A expressão de LHR desempenha importante papel na transição de um folículo dependente de FSH para um dependente de LH e no desenvolvimento morfológico e funcional subsequente dos folículos ovulatórios (BEG *et al.*, 2001). O LHR é membro da família de receptores ligados à proteína G. A ligação do hormônio luteinizante (LH) ao receptor ativa as vias de transdução de sinal da adenilil ciclase e fosfatidilinositol (ZHANG *et al.*, 1998). Estas vias são responsáveis pela produção de AMPc, que regula a conversão de colesterol em esteroides sexuais, e pela produção de inositol, que irá atuar na liberação de cálcio pelo retículo endoplasmático. O transcrito do gene (mRNA) contém 11 éxons: um codificando os domínios transmembrana e intracelular e os outros 10

codificando os domínios extracelulares. A avaliação do perfil transcricional do gene *LHR* mostrou a existência de várias isoformas de *LHR* (derivadas de *splicing* alternativo) em humanos (MINEGISHI *et al.*, 1997; MADHRA *et al.*, 2004), em ratos (AATSINKI *et al.*, 1992), em suínos (LOOSFELT *et al.*, 1989), em ovinos (BACICH *et al.*, 1994; ABDENNEBI *et al.*, 2002) e em bovinos (HASTINGS *et al.*, 2006; ROBERT *et al.*, 2003), incluindo raças de *Bos indicus* (NOGUEIRA *et al.*, 2007). Algumas das isoformas geradas por *splicing* alternativo podem resultar em afinidade de ligação alterada do hormônio ou até mesmo em perda de função. Contudo, a relevância fisiológica da expressão das isoformas de *LHR* durante a dinâmica ou divergência folicular permanece pouco clara.

As raças de *Bos indicus* apresentam algumas diferenças marcantes na fisiologia reprodutiva, comparadas com raças de *Bos taurus*. Estas incluem o número de ondas foliculares por ciclo; o número de folículos emergindo no conjunto de cada onda folicular; a taxa de crescimento folicular; e o tamanho máximo atingido pelo folículo dominante (revisado por SARTORI e BARROS, 2011). Mais recentemente, diferentes estudos demonstraram que o tamanho do folículo dominante na divergência em raças de *Bos indicus* de corte (SARTORELLI *et al.*, 2005; CASTILHO *et al.*, 2007) e leiteiras (VIANA *et al.*, 2010) são menores do que as relatadas para *Bos taurus* (KULICK *et al.*, 2001). A divergência precoce em raças de *Bos indicus* provavelmente está associada com uma capacidade ovulatória adquirida mais cedo (SIMÕES *et al.*, 2012), com um menor diâmetro na ovulação (GIMENES *et al.*, 2008), e possivelmente com uma maior alternância das ondas foliculares (VIANA *et al.*, 2000). Paradoxalmente, entretanto, pouco se sabe sobre o contexto e mecanismos fisiológicos que determinam a divergência precoce em *Bos indicus*. Desta forma, o objetivo deste estudo foi caracterizar o papel das diferenças quantitativas e temporais na produção do estradiol intrafolicular e no padrão de expressão de *Cyp19A1*, *inibina A*, e em isoformas de *LHR* em células da granulosa antes, durante, e depois da divergência folicular em raças leiteiras de *Bos indicus* e de *Bos taurus*, utilizando um modelo *in vivo*. A hipótese elaborada foi a de que o estradiol intrafolicular atua paralelamente com a expressão do *LHR* e suas isoformas para determinar o momento da divergência, e que este mecanismo ocorre em diferentes diâmetros foliculares em raças de *Bos indicus* e de *Bos taurus*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 População animal e localização

Este estudo foi realizado nos Laboratórios de Reprodução Animal e de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite, localizada em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Novilhas maduras reprodutivamente e não gestantes das raças Gir (*Bos indicus*; n=10, peso corporal 352,1±9,2 kg) e Holandês (*Bos taurus*; n=10, peso corporal 404,2±16,6 kg) foram utilizadas para coletas *in vivo* de fluido folicular (FF) e de células da granulosa (CG). Exames ginecológicos por ultrassonografia constataram que todos os animais ciclavam e não apresentavam anormalidades reprodutivas. As novilhas foram mantidas em sistema de pastagem (*Brachiaria decumbens*) suplementado com silagem de milho e concentrado para atender aos requisitos NRC. Água e minerais estavam disponíveis *ad libitum*. Todos os procedimentos realizados nos animais experimentais foram conduzidos de acordo com as diretrizes da Comissão de Ética, Bioética e Bem-Estar Animal (CEBEA) e foram aprovados pelo Comitê de ética no uso de animais da Embrapa Gado de Leite (Protocolos CEUA-CNPGL #02/2011 e #03/2013; Anexo I).

3.2 Delineamento experimental

Antes do início dos experimentos, a dinâmica folicular foi avaliada tanto em novilhas Gir quanto em Holandês para determinar as diferenças nos tamanhos dos folículos dominantes na divergência em ambas as raças. A emergência da onda foi sincronizada pela inserção de um dispositivo intravaginal de liberação de progesterona (1,0 g de progesterona, Sincrogest, Ourofino Agronegócio, São Paulo, Brasil) e injeção de 2 mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol, Ourofino Agronegócio) e de 0,526 mg de cloprostenol sódico (Sincrocio, Ourofino Agronegócio) por via intramuscular. O dispositivo foi mantido até a caracterização da divergência folicular na onda subsequente. As novilhas foram avaliadas diariamente por ultrassonografia transretal em modo B utilizando um transdutor linear de 7,5 MHz para monitorar o crescimento de folículos pequenos e a emergência da onda. Uma vez que a onda emergia para uma determinada novilha, a dinâmica do crescimento folicular era monitorada a cada 12 h até que ocorresse o

estabelecimento de um folículo dominante. Os dados foram então analisados retrospectivamente para determinar o diâmetro do folículo dominante na divergência, seguindo metodologia descrita previamente (GINTHER *et al.*, 1997). Com base nestas análises, os folículos foram divididos em três categorias (6, 8, e 10 a 12 mm em Holandês; e 4, 6, e, 8 a 10 mm em Gir) e classificados como segue: pré-divergência, divergência, e pós-divergência, respectivamente. A emergência da onda foi então re-sincronizada utilizando o mesmo protocolo baseado em progesterona e estradiol descrito anteriormente. A dinâmica folicular foi monitorada diariamente, o maior folículo em crescimento foi mensurado a cada exame, e individualmente aspirado nos diâmetros específicos que correspondiam aos períodos de pré- divergência, divergência, e pós-divergência em cada raça. As amostras de FF e CG foram coletadas e processadas como descrito a seguir. Após cada aspiração de folículos de um determinado diâmetro, a onda folicular era re-sincronizada novamente, para assegurar que todos os supostos folículos dominantes eram coletados durante suas fases de crescimento, independente do período de desenvolvimento (pré-, divergência, e pós-).

3.3 Coleta e processamento do fluido folicular e de células da granulosa

As amostras de FF e CG foram coletadas *in vivo* utilizando um sistema de aspiração intrafolicular guiado por ultrassonografia, adaptado para pequenos volumes e previamente descrito (ARASHIRO *et al.*, 2013). De forma breve, a aspiração folicular foi guiada por um equipamento de ultrassonografia (MyLab30 Vet Gold, Esaote, Genova, Itália), equipado com um transdutor transvaginal micro convexo de 7,5 MHz conectado ao guia da agulha (WTA Tecnologia Aplicada, Cravinhos, Brasil). Para folículos ≥ 8.0 mm, um sistema convencional de tubo de Teflon descartável (WTA Tecnologia Aplicada) foi utilizado e as amostras foram recuperadas em tubos de 1,5 mL. Após a aspiração de cada folículo, o sistema de Teflon e a agulha foram descartados e substituídos por novos para evitar contaminação cruzada entre as amostras. Para folículos < 8.0 mm, as amostras foram coletadas em palhetas de 0,25 mL acopladas diretamente ao suporte da agulha no sistema de aspiração. Todas as amostras foram mantidas sob refrigeração (4 a 5 °C) até o processamento, que ocorreu em um intervalo máximo de 1 h após a aspiração.

A amostra recuperada foi inspecionada para a presença de complexo *cumulus*-oócito e quando confirmada, este era removido. Foi então centrifugada a 600 X g por 10

min para separar o fluido e a fração de células. O sobrenadante (FF) foi removido e armazenado a -20 °C para análise hormonal. O *pellet* restante contendo CG foi lavado duas vezes em solução salina (NaCl 0.9%) e preservada em *RNA Later* (Ambion, Austin, TX, EUA) a -20°C até a extração do RNA. Se hemácias eram visualizadas em uma determinada amostra após a centrifugação, a amostra era descartada. Todas as análises estatísticas consideraram apenas amostras foliculares recuperadas a partir de folículos viáveis, que foram determinados retrospectivamente pelos arquivos de ultrassom e pela concentração de estradiol:progesterona (E2:P4) >2:1 no FF.

3.4 Ensaios hormonais

As concentrações intrafoliculares de estradiol (E2if) e progesterona (P4if) foram determinadas por radioimunoensaio solid-phase I¹²⁵ (RIA), utilizando kits comerciais (*TKE22 Coat-A-Count Estradiol* e *TKPG5 Coat-A-Count Progesterone*, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, EUA). Os procedimentos do RIA foram realizados de acordo com descrição de Viana *et al.* (2010). A sensibilidade dos kits comerciais eram 0,02 ng/mL e 10,0 pg/mL para progesterona e estradiol, respectivamente. Os coeficientes de variação intra- e inter-ensaios foram de 2,75% e 1,87% para progesterona e de 6,0% e 12,7% para estradiol.

3.5 Extração de RNA e Transcrição reversa

A extração do RNA total foi realizada utilizando o kit comercial *RNeasy Micro Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante, e tratadas com DNase. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (ND-100 Nanodrop, Wilmington, EUA) e a qualidade foi avaliada utilizando o equipamento Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent, Palo Alto, EUA). A transcrição reversa foi realizada utilizando o kit comercial *Superscript III First-Strand Synthesis Supermix kit* (Invitrogen, Carlsbad, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram armazenadas a -80 °C até a PCR.

3.6 Desenho dos *Primers*

Os *primers* foram desenhados utilizando como sequência de referência o mRNA de *LHR* de *Bos taurus* disponível no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov; *accession number* NM_174381.1). O programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) ou referência bibliográfica (Tabela 1) foram usados para a obtenção das sequências dos oligonucleotídeos iniciadores.

Tabela 1. *Primers* utilizados para PCR, PCR-RFLP, e PCR em Tempo Real das isoformas de *LHR*, *Cyp19A1*, *Inibina A*, e controles.

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	Fragmento (bp)	AT (°C)	Referência
LHR1	F - ATGGGACGGCCGTCCTCGCGCTGAGG R - CCGAGGGAGATTTGTAAACG	378	65 50	Kawate <i>et al.</i> , 2004 --
LHR2	F - ATGCCTTTGACAACCTCCTC R - GAATGGACTCTAGCCCGTAGG	462	52	-- --
LHR3	F - CTGGAGCTGAAGGAAAATGC R - ATCCCAGCCACTCAGTTCAC	387	50	-- Robert <i>et al.</i> , 2003
LHR4	F - GAAAGCACAGCAAGGAGACC R - GTCTGCAAAGGCGAGGTTGC	281	53	-- --
LHR S10	F - CGATTATTCTGCCATCTTTGC R - CCTGTCTGCCAGTCTATG	363	53	-- Mamluk <i>et al.</i> , 1998
LHR S10+11	F - CTTGCCAACAACGAGACTTC REVERSE LHR S10	110	53	-- --
LHR S11	F - CCAAATAATGAAACACTGACTTCTGC REVERSE LHR S10	112	60	-- --
<i>Beta-actina</i>	F - GACATCCGCAAGGACCTCTA R - ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	205	53	Camargo <i>et al.</i> , 2011
<i>H2a</i>	F - GCCATCCTGGAGTACCTCAC R - TGGATGTGTGGAATGACACC	176	52	Wohlres-Viana <i>et al.</i> , 2011
<i>GAPDH</i>	F - GAGCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG R - CCAACGTGTCTGTTGTGGATCTGA	237	53	Mourot <i>et al.</i> , 2006
<i>Cyp17A1</i>	F - GAATGCCTTTGCCCTGTTCA R - CGCGTTTGAACACAACCCTT	329	56	Lehmann <i>et al.</i> , 2000
<i>Cyp19A1</i>	F - CGCCACTGAGTTGATTTTTGCTGAGA R - TAAGGCTTTGCGCATGACCAGGTC	300	60	Kayani <i>et al.</i> , 2009
<i>Inibina A</i>	F - CCTCGGATGGAGGTTACTCTTTT R - CGGGATTCCCTTAGATGCAA	83	56	Mihm <i>et al.</i> , 2006

AT: *Annealing Temperature* – Temperatura de ligação dos *primers*.

--: Sequência de *primer* desenhada especificamente para este estudo.

3.7 PCR-RFLP

O procedimento de digestão enzimática dos fragmentos amplificados por PCR (RFLP-*Restriction Fragment Length Polymorphism*) foi realizado para identificar todas as possíveis isoformas do receptor do LH considerando todos os éxons do transcrito (do éxon 1 ao éxon 11). As amostras utilizadas nesta análise foram CG de folículos de 10 mm de Holandês e de 8 mm de Gir. Inicialmente, os cDNAs foram submetidos à PCR, utilizando *primer* para o gene CYP17A1 como marcador para contaminação com células da teca. As amostras contaminadas (n=3) foram descartadas.

Cada PCR era composto por tampão de PCR (1X), MgCl₂ (2 mM), dNTPs (0,2 mM), *primers* (200 nM para LHR3 e LHR S1, 300 nM para os demais *primers*; Tabela 1), Hot Start Taq Polymerase (1U, Promega, Madison, WI, EUA), cDNA (equivalente a 8 ng de RNA), e água até um volume final de 20 µL. Uma vez que o conteúdo GC e consequentemente a temperatura de ligação dos *primers* LHR1 *forward* (F) e *reverse* (R) LHR1 eram muito diferentes, a condição para esta reação foi 94°C por 2 min; 40 ciclos de 94°C por 45 seg; 65°C por 30 seg (ligação do *primer* LHR1 F) seguida de 50°C por 30 seg (ligação do *primer* LHR1 R); e 72°C por 1 min. Para os demais *primers* (LHR2, LHR3, e LHR4) as reações foram realizadas utilizando protocolo de PCR *Touchdown* (KORBIE e MATTICK, 2008), que consistiam de 94°C por 2 min; 10 ciclos de 94°C por 45 seg, com a etapa de anelamento dos *primers* iniciando a 10°C acima da temperatura específica de ligação do *primer* e decrescendo 1°C a cada ciclo subsequente, por 30 seg e 72°C por 1 min; seguidos de 30 ciclos a 94°C por 45 seg; temperatura específica de anelamento dos *primers* (Tabela 1) por 30 seg; e 72°C por 1 min. Antes da digestão com enzimas, todos os produtos de PCR foram observados por eletroforese em gel de poliacrilamida nativa (8%) para confirmar a amplificação dos fragmentos.

A Tabela 2 descreve os *primers* e as enzimas utilizados para tentar identificar cada produto de *splicing* alternativo possível no *LHR*. A única exceção foi o *primer* LHR4, pois os fragmentos amplificados podiam ser diferenciados pelo tamanho por eletroforese, sem a necessidade de digestão enzimática. As digestões foram realizadas de acordo com as instruções dos fabricantes: para HinfI e AluI (ambas Promega), a digestão ocorreu a 37°C por 180 min e a inativação da enzima a 60°C por 20 min; para MspI (Promega) e HindIII (Fermentas, Vilnius, Lituânia), a digestão ocorreu a 37°C por 180 min e a inativação da

enzima a 80°C por 20 min. Os fragmentos foram observados por eletroforese em gel de poliacrilamida nativa (8%) corado com nitrato de prata.

Tabela 2. *Primers* e enzimas de restrição utilizados para identificar a ocorrência de *splicing* alternativo no mRNA do receptor de LH.

<i>Primer</i>	Enzima	<i>Splicing</i> Alternativo
LHR1	Hind III	Éxon 2 e Éxon 3
LHR2	AluI	Éxon 4, Éxon 5 e Éxon 8
	Hinf I	Éxon 6 e Éxon 7
LHR3	MspI	Éxon 9 e Éxon 10
LHR4	---	Éxon 10, Parcial do Éxon 11, Éxon 10 + Parcial do Éxon 11

3.8 Sequenciamento das isoformas

As isoformas identificadas por PCR-RFLP foram sequenciadas para confirmar a posição do éxon removido e a exata sequência de nucleotídeos dos fragmentos. Todas as PCR foram realizadas com os reagentes e condições descritas anteriormente. Os *primers* LHR S10, LHR S11, e LHR S10+11 (Tabela 1) foram utilizados para amplificar as isoformas específicas identificadas por PCR-RFLP. Após a PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1%) e visualizadas sob luz ultravioleta. Os fragmentos foram cortados e purificados utilizando o kit comercial *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram então quantificadas e armazenadas a -20°C até a reação de sequenciamento.

Cada reação de sequenciamento era composta por 4µL de mix contendo nucleotídeos marcados incluso no kit comercial *DYEnamic Etdye Terminator Kit MegaBACE* (GE Healthcare), 1µL de *primer* (apenas *forward* ou apenas *reverse*, permitindo a amplificação de apenas uma fita), 200ng de DNA purificado, e água ultrapura para atingir um volume final de 10µL. Além disso, o DNA (M13) fornecido com o kit de sequenciamento foi utilizado como controle. Neste caso, a reação consistia de 1µL de DNA, 2,5µL de água, 2,5µL de *primer* e 4µL de mix.

As reações de sequenciamento foram incubadas em termociclador (Verity; Applied Biosystems, Foster City, EUA), o DNA foi precipitado, 10µL de *loading solution* para

MegaBACE (também presente no kit) foram adicionados, e as amostras foram mantidas a 4°C por pelo menos 2 h. As amostras foram então injetadas no equipamento MegaBACE 1000 utilizando parâmetros de corrida pré-estabelecidos. Os cromatogramas resultantes foram avaliados utilizando o programa *DNA Baser* (DNA Baser Sequence Assembler v3.5.4., Heracle BioSoft SRL, www.DnaBaser.com). As sequências foram alinhadas utilizando o programa MEGA5 (TAMURA *et al.*, 2011).

Após o sequenciamento e alinhamento das isoformas, as sequências de nucleotídeos foram virtualmente traduzidas em aminoácidos (<http://web.expasy.org/translate/>) e alinhadas contra a sequência completa do *LHR*.

3.9 PCR em Tempo Real

Esta metodologia foi utilizada para avaliar a expressão relativa das isoformas de mRNA do *LHR* identificadas por PCR-RFLP (isoformas de *LHR* com *splicing* do éxon 10, *splicing* do éxon 10 e *splicing* parcial do éxon 11, e *splicing* parcial do éxon 11) e para avaliar a quantidade dos transcritos para *Cyp19A1* (P450 aromatase) e *inibina A* nas células da granulosa de folículos de 6, 8, 10, e 12 mm de Holandês; e 4, 6, 8, e 10 mm de Gir. Os mRNA para Beta-actina, GAPDH e H2a (Tabela 1) foram utilizados com controles endógenos e para a avaliação da expressão, foi utilizado aquele que apresentou menor coeficiente de variação entre todas as amostras.

O *primer* LHR4 foi utilizado para avaliar a expressão do receptor de LH sem diferenciar as isoformas (*LHR* total). Os *primers* para o *splicing* do éxon 10 (LHR S10), *splicing* parcial do éxon 11 (LHR S11), e *splicing* do éxon 10 e *splicing* parcial do éxon 11 juntos (LHR S10+11) foram utilizados para avaliar o comportamento destas isoformas durante o desenvolvimento folicular.

As reações foram realizadas utilizando o kit comercial *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. A quantidade de cDNA e de *primers* foram definidas como aquelas que atingiram maior eficiência no processo de otimização (valores entre 1,80 e 2,00). Esta eficiência foi calculada considerando-se a fluorescência emitida durante cada ciclo utilizando o programa LinRegPCR (RAMAKERS *et al.*, 2003). Os controles negativos consistiam de reações sem cDNA (controle sem amostra). As amostras foram incubadas no

equipamento ABI PRISM 7300 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems) em duplicatas.

3.10 Análise dos dados

Os dados de tamanho folicular e das concentrações intrafoliculares de estradiol e progesterona foram avaliados para normalidade e homocedasticidade utilizando os testes de Lilliefors e de Cochran e Bartlett. Os efeitos do diâmetro folicular e raça nas concentrações de esteroides foram analisados pelo teste de Wilcoxon. Os dados estão apresentados com média \pm erro padrão (EPM) e um valor de P de $<0,05$ foi considerado significativo. Nos experimentos de PCR, os cálculos de quantificação relativa foram realizados pelo método do Ct comparativo. Para a análise do *LHR* total (sequências sem distinção entre as formas de *LHR*), folículo na fase de pré-divergência (4 mm em Gir e 6 mm em Holandês) foram utilizados como referência (valor de expressão = 1) dentro de cada raça. Para a análise individual das isoformas, folículos com o valor de expressão máxima para *LHR* total em cada raça (8 e 10 mm em Gir e Holandês, respectivamente) foram utilizados como referência (valor de expressão = 1). Para a análise da expressão de *inibina A* e *Cyp19A1*, folículos com o tamanho esperado para divergência (6 e 8 mm em Gir e Holandês, respectivamente) foram utilizados como referência. O controle endógeno utilizado foi a Beta-actina, que apresentou coeficiente de variação de 1,84. Os valores de quantificação relativa em folículos em desenvolvimento estão apresentados como valores múltiplos em relação à amostra controle. A análise de expressão relativa foi realizada utilizando o teste *pair-wise fixed reallocation randomization* no programa REST (PFAFFL *et al.*, 2002), que é baseado em teste de permutação. Estes testes de permutação são uma alternativa aos testes paramétricos, uma vez que não realizam pressuposições de distribuição sobre os dados, enquanto permanecem tão poderosos quanto qualquer outro teste. Os valores de expressão relativa estão apresentados como média \pm EPM e um valor de P de $<0,05$ foi considerado significativo. O tamanho dos fragmentos foi confirmado por eletroforese em gel de poliacrilamida nativa (8%) corado com nitrato de prata.

4 RESULTADOS

O diâmetro folicular na divergência foi menor em novilhas Gir do que em Holandês ($6,4 \pm 0,3$ vs. $8,6 \pm 0,2$ mm, respectivamente; $P < 0,0001$), portanto os períodos associados à pré-divergência, divergência, e pós-divergência foram associados com categorias de folículos apresentando diferenças de 2 mm no diâmetro entre as raças (Figura 1).

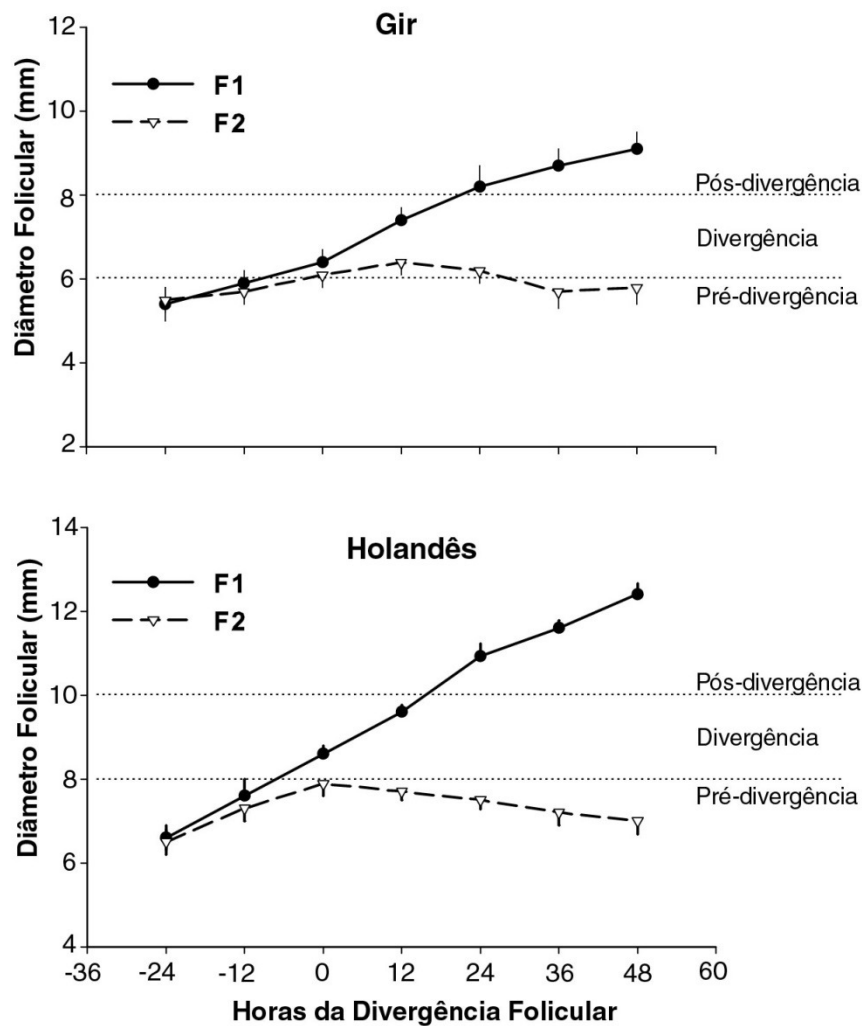


Figura 1. Divergência folicular em novilhas Gir e Holandês. Representação gráfica dos dois maiores folículos em crescimento em uma onda folicular e o momento no qual a taxa de crescimento diverge entre os dois folículos, determinando que um se torna dominante (F1) e o outro subordinado (F2). As linhas pontilhadas dividem a variação do diâmetro folicular que caracteriza os períodos de pré-divergência, divergência, e pós-divergência em cada raça.

As concentrações intrafoliculares de estradiol e de progesterona, e as proporções estradiol:progesterona estão apresentadas na Tabela 3 de acordo com raça, diâmetro folicular, e período relativo ao diâmetro folicular dominante esperado na divergência. Para a raça Gir, foram utilizadas amostras de fluido folicular de 10 folículos coletados no momento antes da divergência, 7 no momento esperado da divergência, e 14 no momento após a divergência folicular. Foram descartadas, por serem consideradas inviáveis, uma amostra no momento esperado e três no momento após a divergência. Para a raça Holandês, foram utilizadas amostras de fluido folicular de 11 folículos coletados no momento antes da divergência, 8 no momento esperado da divergência, e 10 no momento após a divergência folicular. Nenhuma amostra foi considerada inviável. Em ambas as raças, as concentrações de estradiol e a proporção de estradiol:progesterona no fluido folicular aumentaram ($P < 0,001$) ao longo do desenvolvimento folicular. As concentrações intrafoliculares de estradiol foram maiores em novilhas Holandês quando comparadas com Gir antes ($P = 0,0007$), no momento esperado ($P = 0,013$), e após a divergência folicular ($P = 0,0001$). Entretanto, quando as comparações foram realizadas considerando-se apenas o diâmetro folicular, as concentrações de estradiol no fluido folicular foram similares entre as raças em folículos de 6 mm ($58,5 \pm 11,7$ vs. $78,9 \pm 21,0$ ng/mL; $P > 0,05$) e de 8 mm ($226,0 \pm 49,9$ vs. $202,4 \pm 34,3$ ng/mL para Holandês e Gir, respectivamente; $P > 0,05$). De forma coerente, em ambas as raças a expressão dos transcritos de *Cyp19A1* (P450 Aromatase) aumentaram ($P < 0,05$) nos mesmos diâmetros foliculares (folículos de 6 a 8 mm, ou seja, pós-divergência em Gir e divergência em Holandês; Figura 2A e 2B). A expressão dos transcritos de *inibina A*, contudo, aumentaram ($P < 0,05$) durante o desenvolvimento folicular em Gir, mas apenas após a divergência em folículos de Holandês.

Tabela 3. Concentrações de estradiol (E2) and progesterona (P4), e proporção E2:P4, em amostras de fluido folicular coletadas *in vivo* de raças bovinas leiteiras (Holandês - *Bos taurus*, e Gir – *Bos indicus*), em três momentos distintos relacionados ao diâmetro esperado da divergência do folículo dominante

Período da divergência	Categoria de folículo/diâmetro (mm)		E2 (ng/mL)		P4 (ng/mL)		E2:P4	
	Holandês	Gir	Holandês	Gir	Holandês	Gir	Holandês	Gir
	Antes	6 (6,0±0,5)	4 (4,6±0,2)	58,5±11,7 ^{a,A}	8,8±2,0 ^{d,B}	21,9±4,9 ^{f,C}	6,6±0,3 ^{g,D}	3,8±0,9 ^{i,E}
Esperado	8 (8,6±0,4)	6 (6,3±0,2)	226,0±49,9 ^{b,G}	78,9±21,0 ^{de,H}	29,5±8,0 ^{f,I}	10,3±1,0 ^{gh,J}	8,5±2,0 ^{i,K}	7,9±2,4 ^{kl,K}
Após	10 (10,2±0,2)	8 (8,5±0,6)	579,1±45,0 ^{c,L}	202,4±34,3 ^{e,M}	21,9±1,6 ^{f,N}	15,4±1,7 ^{h,O}	29,0±4,7 ^{j,P}	11,3±1,7 ^{l,Q}

Médias com diferentes letras minúsculas sobrescritas dentro da mesma coluna são diferentes: ^{abc} P<0,00001; ^{de} P<0,001; ^f P>0,05; ^{gh} P<0,002; ^{ij} P<0,00001; ^{kl} P<0,001

Para cada parâmetro (E2, P4, E2:P4), medias com diferentes letras maiúsculas sobrescritas dentro de uma linha são diferentes: ^{AB} P<0,001; ^{CD} P<0,01; ^{EF} P<0,05; ^{GH} P<0,02; ^{IJ} P<0,02; ^K P>0,05; ^{LM} P<0,0001; ^{NO} P<0,05; ^{PQ} P<0,0001

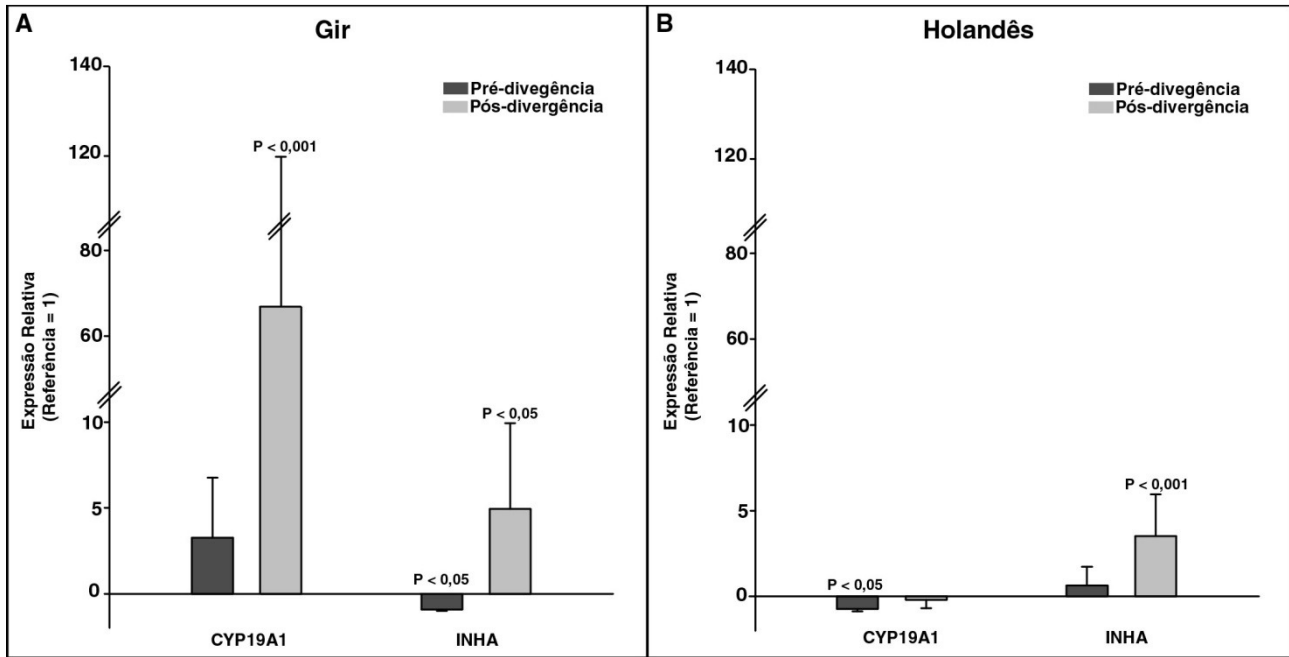


Figura 2. Expressão dos transcritos de *Cyp19A1* e *inibina A* nos períodos de pré- e pós-divergência em novilhas Gir (A) e Holandês (B). Os valores de expressão relativa foram comparados com as referências (folículos com o diâmetro esperado na divergência: 6 mm em Gir, 8 mm em Holandês).

Pico de expressão de *LHR* total em folículos de 8 mm em Gir ($10,70 \pm 7,96$; $P < 0,001$) e de 10 mm em Holandês ($10,96 \pm 5,85$; $P < 0,001$), ou seja, a expressão máxima foi observada nas categorias de folículos imediatamente após a divergência (Figura 3A e 3B).

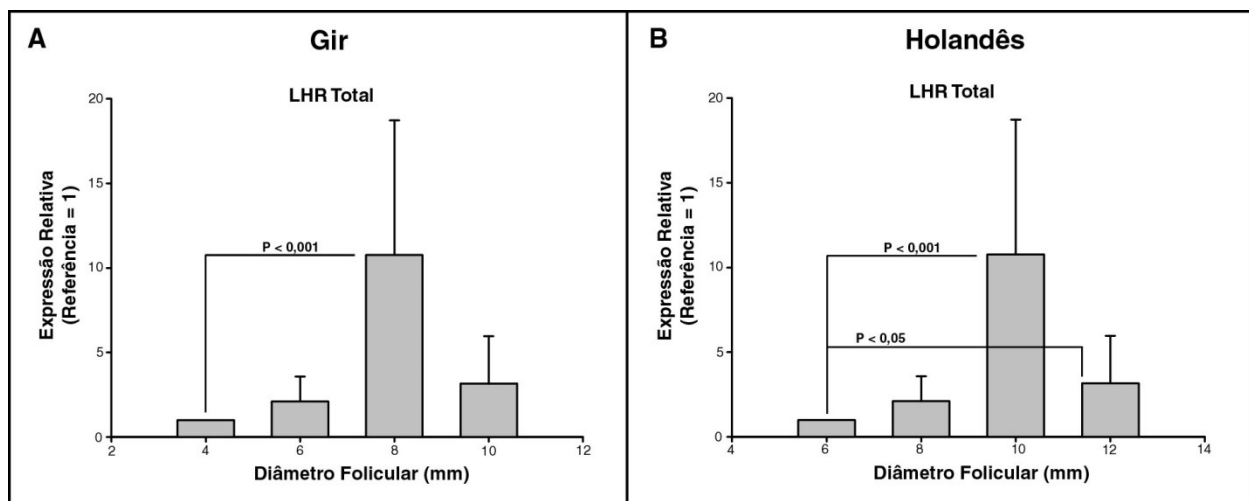


Figura 3. Expressão relativa do Receptor do Hormônio Luteinizante (*LHR*) total em células da granulosa (GC) durante o desenvolvimento do maior folículo em novilhas Gir (A) e Holandês (B). Os valores de expressão relativa foram comparados às referências (os menores folículos avaliados para cada raça: 4 mm em Gir, 6 mm em Holandês).

Três isoformas de *LHR* foram detectadas em GC recuperadas de folículos aspirados: *splicing* do éxon 10 (S10), *splicing* do éxon 10 e *splicing* parcial do éxon 11 (S10+11), e *splicing* parcial do éxon 11 (S11) (Figura 4).

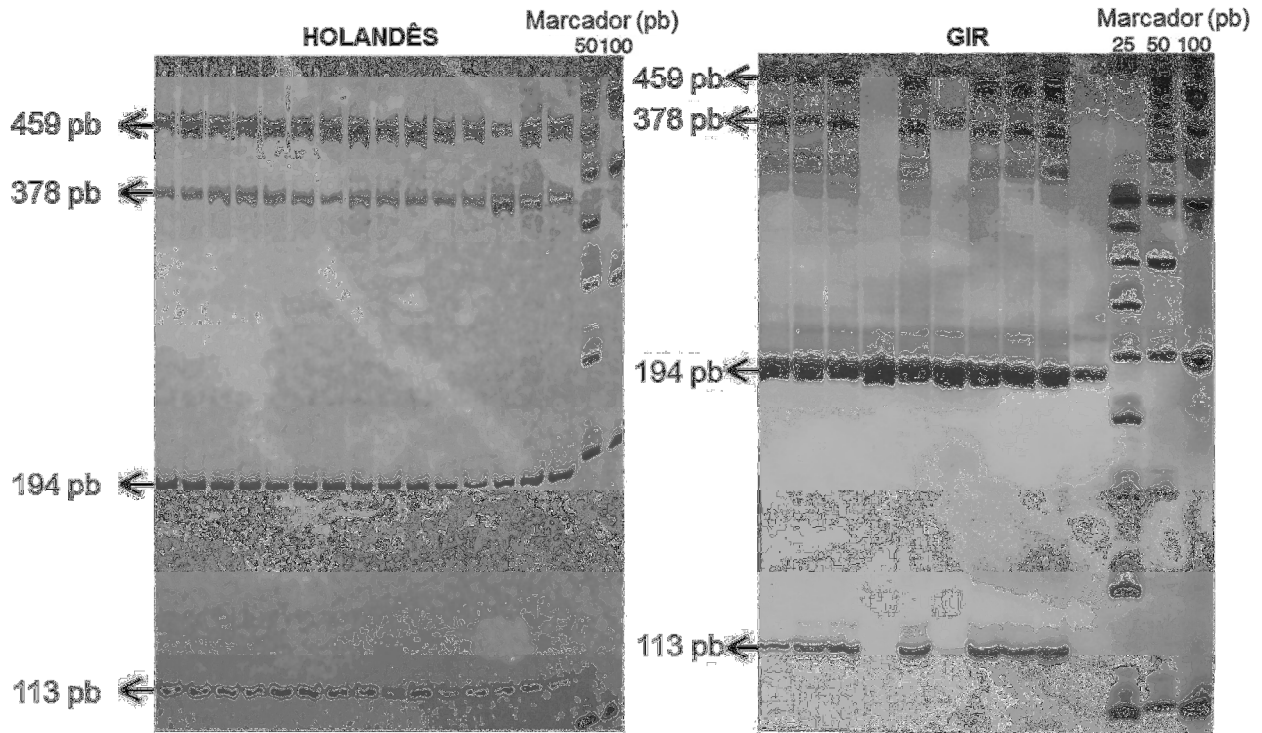


Figura 4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (8%) dos produtos de PCR para a identificação das isoformas pelo tamanho dos fragmentos. Fragmento de 459 bp –*LHR* integral; fragmento de 378 bp – *Splicing* do éxon 10; fragmento de 194 bp – *Splicing* parcial do éxon 11; fragmento de 113 bp – *Splicing* do éxon 10 e *splicing* parcial do éxon 11; bp, pares de base. Os padrões de peso molecular (Ladder) identificavam intervalos de 25, 50 e 100 bp.

As três isoformas de *LHR* estavam presentes tanto em amostras de Gir quanto de Holandês, e foram detectadas em todas as categorias de folículos (Figura 5 A-C e 5 D-F), incluindo durante o período de pré-divergência (4 mm em Gir e 6 mm em Holandês).

Quando a expressão de cada isoforma foi avaliada individualmente, um padrão similar foi observado em ambas as raças. Em Gir, se comparado com o momento de expressão máxima do *LHR* total (folículos >8 mm), a isoforma S11 foi sobre-expressa em folículos de 6 mm e de 10 mm ($33,11 \pm 32,88$ e $787,99 \pm 848,43$, respectivamente; $P < 0,001$). A isoforma S10+11 foi sobre-expressa em folículos de 6 mm ($4,85 \pm 2,13$; $P < 0,05$), mas não nos de 10 mm ($5,54 \pm 3,39$, $P > 0,05$), enquanto que não houve diferença na expressão da isoforma S10 tanto em folículos de 6 mm quanto de 10 mm ($3,52 \pm 1,70$ e $11,06 \pm 7,00$, $P > 0,05$). A expressão das isoformas em folículos na pré-divergência (4 mm) foi similar ($0,36 \pm 0,11$ e $0,14 \pm 0,05$ para S10 e S10+11, respectivamente; $P > 0,05$) ou mesmo maior

($57,97 \pm 56,00$ para S11; $P < 0,05$) quando comparada com folículos de 8 mm (Figura 5 A-C).

Em Holandês, não houve diferença ($P > 0,05$) de expressão na isoforma S11 antes (folículos de 8 mm, $7,73 \pm 4,98$) e após (folículos de 12 mm, $14,27 \pm 8,32$) o pico de expressão do *LHR* total, que ocorreu em folículos de 10 mm. A expressão das outras isoformas também não foi diferente ($P > 0,05$) tanto em folículos de 8 mm ($0,47 \pm 0,41$ para S10 e $0,91 \pm 0,99$ para S10+11) quanto de 12 mm ($1,78 \pm 1,12$ para S10 e $4,75 \pm 2,98$ para S10+11). A expressão de todas as isoformas durante a pré-divergência (6 mm) foi similar aos folículos de 10 mm ($0,41 \pm 0,31$ para S10; $1,08 \pm 0,83$ para S10+11 e $1,00 \pm 0,83$ para S11; $P > 0,05$) (Figura 5 D-F).

O impacto dos diferentes eventos de *splicing* na sequência de aminoácidos do *LHR* está apresentado na Figura 6. Na isoforma S10, o evento de *splicing* remove o terceiro nucleotídeo do códon imediatamente antes do sítio de *splicing*. Desta forma, o códon é alterado modificando o aminoácido (E-291-D) de Ácido Glutâmico para Ácido Aspártico, ou seja, sem mudança no grupo do aminoácido (grupo R negativamente carregado). O *splicing* parcial do éxon 11 muda a matriz de leitura no sítio de *splicing*, alterando a sequência subsequente de aminoácidos e produzindo um códon de parada 45 aminoácidos após o local do *splicing*. Isto resulta na ausência dos domínios transmembrana e intracelular do receptor. Na isoforma S10+11, o mesmo terceiro nucleotídeo de S10 é removido, mas após a remontagem não ocorre mudança no aminoácido codificado. Entretanto, a sequência subsequente continua produzindo um códon de parada, como observado para S11.

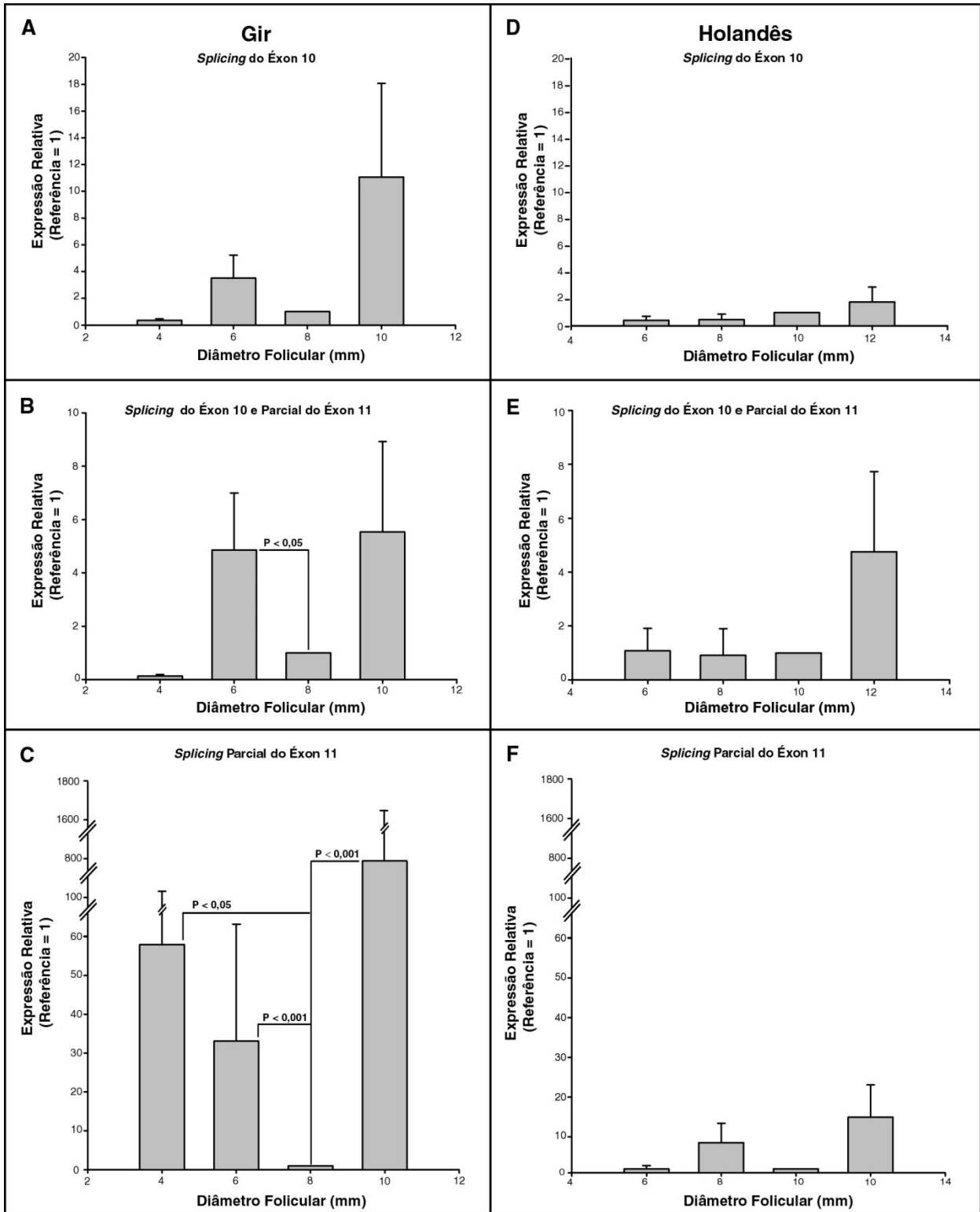


Figura 5. Expressão relativa das isoformas de *LHR* em células da granulosa (GC) durante o desenvolvimento do maior folículo em novilhas Gir (A-C) e Holandês (D-F). A-C: *splicing* do éxon 10 (S10), *splicing* do éxon 10 e *splicing* parcial do éxon 11 (S10+11), e *splicing* parcial do éxon 11 (S11), respectivamente, em Gir. D-F *splicing* do éxon 10 (S10), *splicing* do éxon 10 e *splicing* parcial do éxon 11 (S10+11), e *splicing* parcial do éxon 11 (S11), respectivamente, em Holandês. Para as comparações, os valores de expressão dos folículos com a maior expressão de *LHR* total (8 mm em Gir, 10 mm em Holandês) foram utilizados como referência.

```

LHR      1  MGRPSLALRLLLALLLLPPAPLLWALRPAPCEPCSCPPDGALRCPGPQAGLSRSLTYLPIKVIPSQAFRGLNEVIKIEISQ
S10      MGRPSLALRLLLALLLLPPAPLLWALRPAPCEPCSCPPDGALRCPGPQAGLSRSLTYLPIKVIPSQAFRGLNEVIKIEISQ
S11      MGRPSLALRLLLALLLLPPAPLLWALRPAPCEPCSCPPDGALRCPGPQAGLSRSLTYLPIKVIPSQAFRGLNEVIKIEISQ
S10+11   MGRPSLALRLLLALLLLPPAPLLWALRPAPCEPCSCPPDGALRCPGPQAGLSRSLTYLPIKVIPSQAFRGLNEVIKIEISQ

LHR      85  SDSLEKIEANAFDNLNLSSEILIQNTKNLVHIEAGAFNLPRLKYLCSICNTGIHKLDPVTKIFSSEFNFILEICDNLHITIPRNA
S10      SDSLEKIEANAFDNLNLSSEILIQNTKNLVHIEAGAFNLPRLKYLCSICNTGIHKLDPVTKIFSSEFNFILEICDNLHITIPRNA
S11      SDSLEKIEANAFDNLNLSSEILIQNTKNLVHIEAGAFNLPRLKYLCSICNTGIHKLDPVTKIFSSEFNFILEICDNLHITIPRNA
S10+11   SDSLEKIEANAFDNLNLSSEILIQNTKNLVHIEAGAFNLPRLKYLCSICNTGIHKLDPVTKIFSSEFNFILEICDNLHITIPRNA

LHR      171 FQGMNNEsitlKLYGNgfEeiQshafngTtlisLelkenarLEKMHndafRgatGpsildisStklQalptyGlesIQtlIat
S10      FQGMNNEsitlKLYGNgfEeiQshafngTtlisLelkenarLEKMHndafRgatGpsildisStklQalptyGlesIQtlIat
S11      FQGMNNEsitlKLYGNgfEeiQshafngTtlisLelkenarLEKMHndafRgatGpsildisStklQalptyGlesIQtlIat
S10+11   FQGMNNEsitlKLYGNgfEeiQshafngTtlisLelkenarLEKMHndafRgatGpsildisStklQalptyGlesIQtlIat

LHR      254  SSYSLKKLPSREKFTNLLDAtLTYPshCCaFRNLPTNEQNFSfSfKfNfSKQCEstARRPNNetLYsaifaEeSelsGwDyDy
S10      SSYSLKKLPSREKFTNLLDAtLTYPshCCaFRNLPTNEQNFSfSfKfNfSKQCEstARRPNNetLYsaifaEeSelsGwDyDy
S11      SSYSLKKLPSREKFTNLLDAtLTYPshCCaFRNLPTNEQNFSfSfKfNfSKQCEstARRPNNetLYsaifaEeSelsGwDyDy
S10+11   SSYSLKKLPSREKFTNLLDAtLTYPshCCaFRNLPTNEQNFSfSfKfNfSKQCEstARRPNNetLYsaifaEeSelsGwDyDy

LHR      336  GFCLPKTLQCAPEPDAFNPCEDIMGYNflRvLIwLinilaITgnvTVlFvLLTSryKlTVPRfLMcNLSfADfCMGLYLLlIA
S10      GFCLPKTLQCAPEPDAFNPCEDIMGYNflRvLIwLinilaITgnvTVlFvLLTSryKlTVPRfLMcNLSfADfCMGLYLLlIA
S11      -----LLHGALPAAHc
S10+11   -----LLHGALPAAHc

LHR      419  SVDAQTKGQYyNHaidwQtGSGCSaAGffTVfaSelsvYtLTVitlerWhTityaIQldQkLRLkhaIPVmlGGwLfstL
S10      SVDAQTKGQYyNHaidwQtGSGCSaAGffTVfaSelsvYtLTVitlerWhTityaIQldQkLRLkhaIPVmlGGwLfstL
S11      LSRCPDQRpVLQpChRLADREwVQRGwLfhCvCKStop
S10+11   LSRCPDQRpVLQpChRLADREwVQRGwLfhCvCKStop

LHR      499  IAVLPLVgvsNyMKvSicLpMDvestLSQvYilTililNvMafIIICaCYiKiyfAVQNPelMatnKdTKiAKKMAVlIFtdfT
S10      IAVLPLVgvsNyMKvSicLpMDvestLSQvYilTililNvMafIIICaCYiKiyfAVQNPelMatnKdTKiAKKMAVlIFtdfT
S11      -----
S10+11   -----

LHR      583  CMAPISFFAISaAFKvPlITvTNSKvLLVlFYPvNSCaNPfLYaIFtKafQRdFFllLSKfGcCKyRAELyRRKDFsAYISnCK
S10      CMAPISFFAISaAFKvPlITvTNSKvLLVlFYPvNSCaNPfLYaIFtKafQRdFFllLSKfGcCKyRAELyRRKDFsAYISnCK
S11      -----
S10+11   -----

LHR      667  NGFTGSnKPSRSTfKLTTLQcQySAVLDKtCYKecStop
S10      NGFTGSnKPSRSTfKLTTLQcQySAVLDKtCYKecStop
S11      -----
S10+11   -----

```

Figura 6. Alinhamento do *LHR* integral e das isoformas. As caixas em cinza mostram mudanças de aminoácidos. Caixas em preto mostram os códons de parada. **LHR** – Receptor do Hormônio Luteinizante integral; **S10** – Receptor do Hormônio Luteinizante com *splicing* do éxon 10; **S10+11** – Receptor do Hormônio Luteinizante com *splicing* do éxon 10 e *splicing* parcial do éxon 11; **S11** – Receptor do Hormônio Luteinizante com *splicing* parcial do éxon 11.

5 DISCUSSÃO

Os mecanismos fisiológicos e endócrinos associados com a seleção do folículo dominante e consequente divergência folicular têm sido amplamente estudados em *Bos taurus* (MIHM *et al.*, 1997; GINTHER *et al.*, 1999; KULICK *et al.*, 1999; MIHM *et al.*, 2000; GINTHER *et al.*, 2001a,b; BEG *et al.*, 2001). As raças de *Bos indicus*, entretanto, apresentam diferenças marcantes em um número de parâmetros relacionados ao crescimento folicular e à divergência (SARTORI e BARROS, 2011), mas os mecanismos subjacentes ainda são pouco compreendidos. O objetivo deste estudo foi investigar o papel das diferenças quantitativas e temporais na produção intrafolicular de estradiol e no padrão de expressão de *inibina A*, *Cyp19A1*, e das isoformas de *LHR* em células da granulosa durante os períodos que compreendem o estabelecimento da divergência (pré-, durante, e pós-divergência) em duas raças leiteiras: Holandês (*Bos taurus*) e Gir (*Bos indicus*). A abordagem experimental utilizada, um modelo *in vivo*, permitiu a coleta de dados e a análise em base individual, além do controle de folículos específicos que foram utilizados como fontes de CG e de FF. O presente estudo identificou evidências de uma relação entre a divergência folicular fisiológica em diâmetro inferior em *Bos indicus* com a expressão de transcritos de *LHR*, *inibina A* e *Cyp19A1*; além da capacidade de produção de estradiol folicular. A hipótese inicial foi então sustentada pelos resultados apresentados neste capítulo.

A transição da dependência do FSH para o LH desempenha um papel central no estabelecimento do folículo dominante e subsequente atresia dos folículos subordinados dentro do mesmo conjunto, em espécies monovulatórias. Este fenômeno possui dois componentes principais: (1) a depressão da secreção endógena de FSH causada pela produção aumentada de estradiol e *inibina*; e (2) a concomitante expressão aumentada de *LHR* pelas CG apenas no futuro folículo dominante, não nos subordinados (GINTHER *et al.*, 2001b). O estradiol é um importante indicador do estado funcional folicular e é sintetizado exclusivamente pelas CG. Como era esperado, considerando dados já relatados (MIHM *et al.*, 2000), no presente estudo a concentração de E2if e a expressão de *Cyp19A1* nas CG aumentou em ambas as raças durante o crescimento folicular. O estradiol intrafolicular foi maior em Holandês quando comparado com Gir antes, durante, e após a divergência. Contudo, as concentrações foram similares em folículos de mesma

escala de diâmetro nas duas raças. A produção de estradiol é crítica para manter o desenvolvimento dos folículos porque este esteroide possui um importante papel no crescimento, diferenciação, e como fator antiapoptótico (BAO e GAVERICK, 1998). Portanto, o aumento progressivo no E2if observado durante o desenvolvimento folicular é coerente com a viabilidade esperada dos folículos amostrados. Em relação ao momento da divergência, a sequência temporal dos eventos fisiológicos envolvidos na síntese de esteroides pelos folículos ovarianos foi similar entre as raças neste estudo. Este resultado sugere que a divergência em um menor diâmetro no folículo dominante, como ocorre fisiologicamente em raças de *Bos indicus*, não é induzida por um aumento precoce da produção de estradiol pelo folículo. Na verdade, um aumento significativo da expressão de *Cyp19A1* ocorreu em folículos dominantes de diâmetros similares (8 mm) tanto em Holandês quanto em Gir, embora este aumento tenha sido observado em diferentes momentos relacionados com a divergência nas duas raças (pós-divergência em Gir e divergência em Holandês).

No presente estudo, apenas novilhas púberes foram utilizadas. Portanto, a variação nas concentrações de esteroides resultantes de diferenças nas categorias dos animais ou de níveis de ingestão de matéria seca, como previamente relatado na literatura (SANGSRITAVONG *et al.*, 2002), não devem ter afetado a relação entre a produção de IF-E₂ e a divergência folicular observada no presente estudo. Os resultados indicaram que uma produção similar de estradiol pode ter direcionado a divergência folicular em um diâmetro menor em Gir quando comparado com Holandês. Uma explicação para este fenômeno seria uma possível sensibilidade aumentada do eixo hipotalâmico-hipofisário ao *feedback* negativo do estradiol sobre a secreção de FSH em raças de *Bos indicus*. Esta hipótese é sustentada por evidência descrita anteriormente de que as concentrações plasmáticas de FSH em vacas de *Bos indicus* (Brahman) eram menores do que em *Bos taurus* (Angus), apesar de concentrações basais e pré-ovulatórias de estradiol similares (ALVAREZ *et al.*, 2000). Entretanto, ainda é controverso se *Bos indicus* são mais sensíveis ou não a tratamento com estradiol exógeno (RHODES *et al.*, 1978; SCHOENEMANN *et al.*, 1985; RODRIGUES *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2008). Uma maior sensibilidade do eixo hipotalâmico-hipofisário ao *feedback* do estradiol poderia induzir a expressão precoce de receptores de LHRH na hipófise e antecipar as ondas de LH (SCHOENEMANN *et al.*, 1985). Isto explicaria o fato de que folículos dominantes adquirem capacidade ovulatória em diâmetros menores em *Bos indicus* (SARTORI e BARROS, 2011; SIMÕES *et al.*, 2012). Desta maneira, diferenças no diâmetro dos

folículos ovulatórios podem ser modulados por ajuste nos mecanismos endócrinos, ao invés de capacidade reduzida de secreção de LH pela hipófise, como sugerido por Bo *et al.* (2003).

A divergência precoce em Gir também sugere um mecanismo envolvendo a expressão antecipada do LHR, uma vez que este receptor é essencial para o folículo dominante progredir em seu desenvolvimento na presença de concentrações circulantes de FSH decrescentes (KULICK *et al.*, 1999). Da mesma forma, a ausência de LHR determina a atresia dos folículos subordinados (BODENSTEINER *et al.*, 1996). De forma coerente, no presente estudo o pico de transcritos de *LHR* total (*LHR* integral e isoformas) ocorreu em folículos de Gir 2 mm menores do que os de Holandês (8 mm vs. 10 mm, respectivamente); no entanto isto ocorreu imediatamente após o diâmetro esperado para o início da divergência em ambas as raças. Como o estradiol induz a expressão de receptores de LH nas células foliculares (GINTHER *et al.*, 1996), é possível que, além de induzir uma redução antecipada do FSH circulante, este esteroide também leve à sobre-regulação precoce da expressão do gene para LHR em *Bos indicus*.

Em bovinos, o LH desempenha papel bem estabelecido na divergência folicular (GINTHER *et al.*, 2001b), mas o início exato da expressão do LHR nas células da granulosa permanece controverso. De forma similar ao presente estudo, a expressão de *LHR* em CG foi identificada anteriormente em folículos antrais pequenos (4 mm) (SIRARD *et al.*, 2000; ROBERT *et al.*, 2003). Outros autores, entretanto, apenas detectaram o *LHR* em GC de folículos maiores :7 mm (NOGUEIRA *et al.*, 2007), 8 mm (BAO *et al.*, 1997) e 9 mm (XU *et al.*, 1995). A aquisição de LHR por células da granulosa do futuro folículo dominante foi demonstrada como ocorrendo antes da divergência em Holandês (BEG *et al.*, 2001; GINTHER *et al.*, 2001b; 2003). Assumindo que os mecanismos básicos de divergência descritos para *Bos taurus* também irão ocorrer em *Bos indicus* e considerando que a divergência folicular ocorre quando o folículo dominante atinge aproximadamente 5 a 6 mm em raças de *Bos indicus* (SARTORELLI *et al.*, 2005; CASTILHO *et al.*, 2007; GIMENES *et al.*, 2008; VIANA *et al.*, 2010), é razoável esperar a presença de transcritos de *LHR* em folículos de 4 mm em novilhas Gir, como demonstrado pela primeira vez no presente estudo. Assim, os resultados discrepantes entre os estudos para a identificação da expressão do *LHR* em pequenos folículos antrais parecem estar relacionados com diferenças nas metodologias adotadas, particularmente nos critérios de seleção dos folículos (inspeção visual, proporção E2:P4, monitoramento por ultrassonografia), agrupamento dos folículos (diâmetro, categoria de tamanho, dias a

partir da emergência da onda), preparação das CG (suspensão de células, *in situ*, cultivo *in vitro*); e também na sensibilidade das técnicas de identificação (ensaio rádio-receptor, hibridização *in situ*, PCR, PCR em tempo real) ou protocolos de amplificação. Tem sido demonstrado, por exemplo, que o cultivo *in vitro* reduz drasticamente os transcritos de *LHR*, que se torna indetectável apenas após 2 h para folículos <4 mm, mas não para folículos >8 mm (ROBERT *et al.*, 2003).

No presente estudo, as CG foram coletadas diretamente de folículos de doadoras vivas e as amostras foram processadas no intervalo máximo de 1 h a partir da coleta, para minimizar eventuais alterações da expressão gênica e/ou degradação do RNA. Com esta abordagem experimental, contudo, é provável que as CG recuperadas pela aspiração sejam as mais próximas do antro folicular. As células da granulosa são formadas por duas subpopulações: CG antrais (ou luminais), formadas pelas camadas de células mais próximas ao antro; e CG murais, formadas pelas camadas de células próximas à membrana basal (AMSTERDAM *et al.*, 1989). Poderia-se supor que a recuperação de CG murais seria maior com a escarificação da parede folicular durante a aspiração. Entretanto, uma escarificação mais profunda também aumenta o risco de contaminação do FF com células da teca e com sangue, devido à presença de diversos capilares na camada interna da teca, especialmente em folículos antrais maiores (JIANG *et al.*, 2003). Tal contaminação pode prejudicar análises subsequentes e levar a um maior descarte de amostras. Apesar desta limitação, estudos anteriores mostraram que CG antrais produzem maiores quantidades de estradiol e progesterona, independente do diâmetro folicular (ROBERTS e ECHTERNKAMP, 1994); além de mostrar uma maior capacidade de produção de esteroides em resposta à estimulação com FSH e LH *in vitro* (ROUILLIER *et al.*, 1996; 1998) quando comparadas com CG murais. Desta forma, uma possível prevalência desta subpopulação de CG nas amostras do presente estudo não afetaria a comparação da expressão do *LHR* entre raças e entre os diâmetros foliculares.

Realizou-se uma busca ampla em todo o transcrito para identificar as possíveis isoformas de *LHR*, utilizando PCR-RFLP. Esta metodologia foi usada anteriormente para identificar uma grande variedade de isoformas de *LHR* em ratos, como o *splicing* dos éxons 3, 4, e 5, *splicing* parcial do éxon 9, e *splicing* parcial do éxon 11 (AATSINKI *et al.*, 1992). De forma interessante, o *splicing* do éxon 3, previamente relatado para uma raça de corte de *Bos indicus* (Nelore) (NOGUEIRA *et al.*, 2007), não foi detectada em nenhuma das amostras. As outras três isoformas de *LHR* identificadas no presente estudo (S10, S10+11, e S11) já haviam sido descritas tanto em *Bos taurus* (KAWATE *et al.*, 2002;

ROBERT *et al.*, 2003) quanto em *Bos indicus* (NOGUEIRA *et al.*, 2007; SIMÕES *et al.*, 2012). A novidade do presente estudo foi a descrição da dinâmica da expressão destas isoformas durante o período peri-divergência. Isto só foi possível por causa do modelo *in vivo* utilizado, no qual os folículos foram monitorados em tempo real durante seu desenvolvimento e puderam ser coletados por aspiração guiada por ultrassom em diâmetros específicos, permitindo uma avaliação longitudinal da expressão das isoformas de *LHR* de acordo com o tamanho e estágio de desenvolvimento (pré-, divergência, pós-) do folículo individualmente em cada novilha. Os resultados do presente estudo demonstram que, no intervalo esperado para a ocorrência da divergência, a expressão das isoformas de *LHR* em CG dos folículos dominantes foi baixa (em Holandês) ou reduzida (em Gir), enquanto o nível de expressão de *LHR* total foi máximo e a produção de estradiol intrafolicular aumentou progressivamente. Embora não seja possível desenhar *primers* específicos para identificar exclusivamente a forma integral, a tendência do padrão de expressão das isoformas sugere que a forma integral seja a principal responsável pelo pico observado em *LHR* total. Estes resultados corroboram com uma observação anterior de que a expressão das isoformas de *LHR* é regulada de forma específica dependendo do diâmetro folicular (ROBERT *et al.*, 2003).

A identificação consistente de isoformas de *LHR* em bovinos sugere que elas devem desempenhar um papel na regulação da função deste receptor, como proposto para ratos (AATSINKI *et al.*, 1992). O efeito da expressão de cada isoforma, contudo, ainda não é totalmente compreendido. Em humanos, o *splicing* do éxon 10 causa maior afinidade do LHR à gonadotrofina coriônica humana (hCG) do que ao LH (MÜLLER *et al.*, 2003), mas diminui a proporção de receptores ligados à superfície celular indicando prejuízo na exteriorização desta proteína (ZHANG *et al.*, 1998). A tradução virtual desta forma mostra que S10 resulta na mudança de um aminoácido, mas não no grupo do mesmo. Todavia, os efeitos desta mudança no dobramento, estabilidade, e estrutura tridimensional desta proteína ainda precisa ser elucidado. Além disso, pouco se sabe sobre a estrutura tridimensional do sítio de ligação no ectodomínio do LHR (PUETT *et al.*, 2010), e portanto não é possível fazer inferências sobre os potenciais efeitos do S10 na função do LHR em bovinos. Para as formas S11 e S10+11, a tradução virtual confirmou que a proteína resultante não apresenta as porções transmembrana e intracelular. Esta mudança prejudica o transporte e a integração do receptor à membrana celular (KAWATE, 1998) e, conseqüentemente, sua funcionalidade. Vale ressaltar que, no presente estudo, S11 foi a isoforma com maior alteração nos níveis de expressão em

ambas as raças, de acordo com o diâmetro folicular, e que sua expressão foi inversamente proporcional à expressão do *LHR* total no momento esperado da divergência do folículo dominante dentro de cada raça. Juntos, estes resultados nos levam a formular a hipótese de que para atingir a capacidade máxima de resposta ao LH durante a transição da dependência de FSH para LH, o folículo dominante sobre-expressa a forma integral de *LHR* e sub-expressa as isoformas não ou menos funcionais. Além disso, a alta contribuição da isoforma S11 no *LHR* total em folículos menores que 8 mm de diâmetro pode explicar a baixa resposta de AMPc ao estímulo de LH relatada previamente em CG de folículos pequenos (JOLLY *et al.*, 1994; RHODES *et al.*, 2001).

Propõe-se um modelo para explicar o mecanismo de divergência precoce que ocorre em gado *Bos indicus*. Este modelo associaria a alta sensibilidade do eixo hipotalâmico-hipofisário ao estradiol circulante com o aumento antecipado da expressão do *LHR*, que poderia levar à divergência folicular em um diâmetro menor, em comparação com o que é observado em raças de *Bos taurus*.

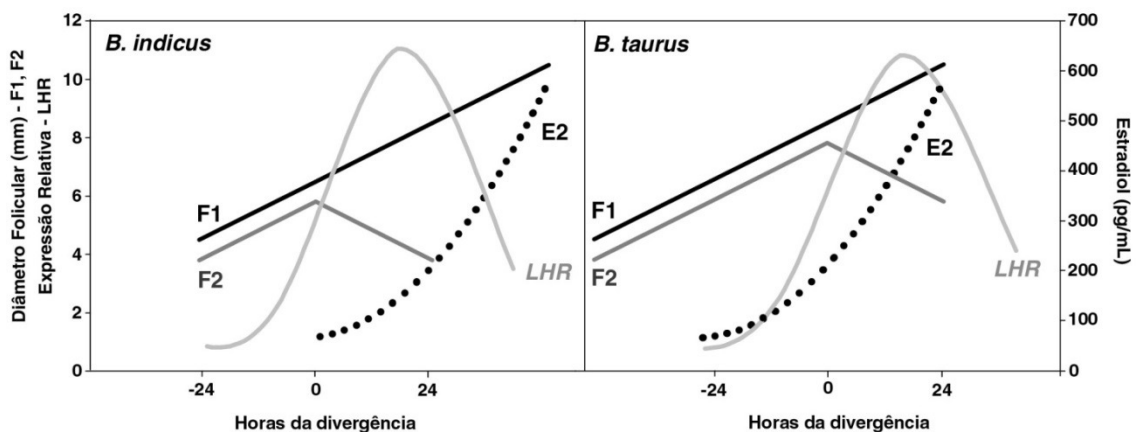


Figura 7. Ilustração esquemática das diferenças no progresso da produção de estradiol intrafolicular e expressão de *LHR* pelas células da granulosa durante o período de divergência folicular entre *B. indicus* e *B. taurus*. F1: folículo dominante; F2: maior folículo subordinado; E2: estradiol intrafolicular. A divergência folicular ocorre em *B. indicus* quando o folículo dominante apresenta cerca de 2 mm de diâmetro a menos que *B. taurus*. Um pico de expressão de *LHR* ocorre durante a divergência em ambas as subespécies, independente do diâmetro folicular, enquanto a produção de estradiol está associada principalmente com o diâmetro do folículo.

Em conclusão, os resultados do presente estudo indicam que a divergência do folículo dominante em um menor diâmetro, em *Bos indicus*, não ocorre devido a um aumento antecipado da produção de estradiol, mas sim à um pico da expressão de *LHR* durante a divergência. Além disso, mudanças sequenciais no padrão de expressão das isoformas de *LHR* atuam na regulação fina da função do *LHR* durante a divergência folicular em bovinos.

6 REFERÊNCIAS

- AATSINKI, J.T.; PIETILG, 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. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 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.
- ALVAREZ, P.; SPICER, L.J.; CHASE JR, C.C.; PAYTON, M.E.; HAMILTON, T.D.; STEWART, R.E.; HAMMOND, A.C.; OLSON, T.A.; WETTEMANN, R.P. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. **Journal of Animal Science**, v.78, n.5, p.1291-1302, 2000.
- AMSTERDAM, A.; ROTMENSCH, S.; BEN-ZE'EV, A. Coordinated regulation of morphological and biochemical differentiation in a steroidogenic cell: the granulosa cell model. **Trends in Biochemical Sciences**, v.14, p.377-382, 1989.
- ARASHIRO, E.K.N.; PALHAO, M.P.; WOHLRES-VIANA, S.; SIQUEIRA, L.G.B.; CAMARGO, L.S.A.; HENRY, M.; VIANA, J.H.M. In vivo collection of follicular fluid and granulosa cells from individual follicles of different diameters in cattle by adapted ovum pick-up system. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.11, p.73-80, 2013.
- BACICH, D.J.; ROHAN, R.M.; NORMAN, R.J.; RODGERS, R.J. Characterization and relative abundance of alternatively spliced luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid in the ovine ovary. **Endocrinology**, v.135, p.735-744, 1994.
- BAO, B.; GARVERICK, A.; SMITH, G.W.; SMITH, M.F.; SALFEN, B.E.; YOUNGQUIST, R.S. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. **Biology of Reproduction**, v.56, p.1158-1168, 1997.
- BAO, B.; GARVERICK, H.A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **Journal of Animal Science**, v.76, p.1903-1921, 1998.
- BEG, M.A.; BERGFELD, 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.
- BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MARTÍNEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.307-326, 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.
- CAMARGO, L.S.A.; BOITE, M.C.; WOHLRES-VIANA, S.; MOTA, G.B.; SERAPIAO, R.V.; SA, W.F.; VIANA, J.H.M.; NOGUEIRA, L.A.G. Osmotic Challenge and expression of aquaporin 3 and Na/K ATPase genes in bovine embryos produced in vitro. **Cryobiology**, v.63, p.256-262, 2011.
- CASTILHO, C.; GARCIA, J.M.; RENESTO, A.; NOGUEIRA, G.P.; BRITO, L.F. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction Science**, v.98, p.189–196, 2007.
- CARVALHO, J.B.; CARVALHO, N.A.; REIS, E.L.; NICHI, M.; SOUZA, A.H.; BARUSELLI, P.S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v.69, p.167-175, 2008.
- DISKIN, M.G.; AUSTIN, E.J.; ROCHE, J.F. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.211-228, 2002.
- GIMENES, L.U.; SÁ FILHO, M.F.; CARVALHO, N.A.; TORRES-JÚNIOR, J.R.; SOUZA, A.H.; MADUREIRA, E.H.; TRINCA, L.A.; SARTORELLI, E.S.; BARROS, C.M.; CARVALHO, J.B.; MAPLETOFT, R.J.; BARUSELLI, P.S. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v.69, p.852-858, 2008.
- 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.1187-1194, 1996.
- GINTHER, O.J.; KOT, K.; KULICK, L.J.; WILTBANK, M.C. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v.48, p.75-87, 1997.
- GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R.; KULICK, L.J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations. **Theriogenology**, v.52, p.1079-1093, 1999.
- GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; DONADEU, F.X.; KOT, K. Follicle selection in monovular species. **Biology of Reproduction**, v.65, p.638-647, 2001a.
- 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, 2001b.
- GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; DONADEU, F.X.; BERGFELT, D.R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.239-257, 2003.
- HASTINGS, N.; DONN, S.; DERECKA, K.; FLINT, A.P.; WOOLLIAMS, J.A. Polymorphisms within the coding region of the bovine luteinizing hormone receptor gene and their association with fertility traits. **Animal Genetics**, v.37, p.583-585, 2006.

JIANG, J.Y.; MACCHIARELLI, G.; TSANG, B.K.; SATO, E. Capillary angiogenesis and degeneration in bovine ovarian antral follicles. **Reproduction**, v.125, p.211-223, 2003.

JOLLY, P.D.; TISDALL, D.J.; HEATH, D.A.; LUN, S.; MCNATTY, K.P. Apoptosis in bovine granulosa cells in relation to steroid synthesis, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response to follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and follicular atresia. **Biology of Reproduction**, v.51, p.934-944, 1994.

KAYANI, R.A.; GLISTER, C.; KNIGHT, P.G. Evidence for an inhibitory role of bone morphogenetic protein(s) in the follicular–luteal transition in cattle. **Reproduction**, v.137, p.67-78, 2009.

KAWATE, N.; OKUDA, K. Coordinated expression of splice variants for luteinizing hormone receptor messenger RNA during the development of bovine corpora lutea. **Molecular Reproduction and Development**, 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. **Journal of Reproduction and Development**, v.48, n.5, 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. **Journal of Reproduction and Development**, v.50, n.1, p.1-8, 2004.

KORBIE, D.J.; MATTICK, J.S. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. **Nature Protocols**, v.3, n.9, p.1452-1456, 2008.

KULICK, L.J.; KOT, K.; WILTBANK, M.C.; GINTHER, O.J. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. **Theriogenology**, v.52, p.913-921, 1999.

KULICK, L.J.; BERGFELT, D.R.; KOT, K.; GINTHER, O.J. Follicle selection in cattle: follicle deviation and codominance within sequential waves. **Biology of Reproduction**, v.65, p.839-846, 2001.

LEHMANN, T.; BIERNACKA-LUKANTY, J.; TRZECIAK, W.H. Expression of three negative regulators of CYP17 gene transcription in adrenocortical cells. **Endocrine Research**, v.26, n.4, p.1019-1026, 2000.

LOOSFELTM, H.; MISRAHI, M.; ATGER, M.; SALESSE, R.; THI, M.T.V.H-L.; JOLIVET, A.; GUIOCHON-MANTEL, A.; SAR, S.; JALLAL, B.; GARNIER, J.; MILGRON, E. Cloning and Sequencing of porcine LH-hCG receptor cDNA: Variants lacking transmembrane domain. **Science**, v.245, p.525-528, 1989.

MADHRA, M.; GAY, E.; FRASER, H.M.; DUNCAN, W.C. Alternative splicing of the human luteal LH receptor during luteolysis and maternal recognition of pregnancy. **Molecular Human Reproduction**, v.10, n.8, p.599–603, 2004.

MAMLUK, R.; WOLFENSON, D.; MEIDAN, R. LH receptor mRNA and cytochrome P450 side-chain cleavage expression in bovine theca and granulosa cells luteinized by LH or forskolin. **Domestic Animal Endocrinology**, v.15, n.2, p.103-114, 1998.

MIHM, M.; GOOD, T.E.; IRELAND, J.L.; IRELAND, J.J.; KNIGHT, P.G.; ROCHE, J.F. Decline in serum follicle-stimulating hormone concentrations alters key intrafollicular growth factors involved in selection of the dominant follicle in heifers. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1328-1337, 1997.

MIHM, M.; AUSTIN, E.J.; GOOD, T.E.; IRELAND, J.L.; KNIGHT, P.G.; ROCHE, J.F.; IRELAND, J.J. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. **Biology of Reproduction**, v.63, p.811-819, 2000.

MIHN, M.; BAKER, P.J.; IRELAND, J.L.H.; SMITH, G.W.; COUSSENS, P.M.; EVANS, A.C.O.; IRELAND, J.J. Molecular evidence that growth of dominant follicles involves a reduction in follicle-stimulating hormone dependence and a increase in luteinizing hormone dependence in cattle. **Biology of Reproduction**, v.74, p.1051-1059, 2006.

MINEGISHI, T.; TANO, M.; ABE, Y.; NAKAMURA, K.; IBUKI, Y.; MIYAMOTO, K. Expression of luteinizing hormone/human chorionic gonadotrophin (LH/HCG) receptor mRNA in the human ovary. **Molecular Human Reproduction**, v.3, n.2, p.101-107, 1997.

MOUROT, M.; DUFORT, I.; GRAVEL, C.; ALGRIANY, O.; DIELEMAN, S.; SIRARD, M. A. The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, n.11, p.1367-1379, 2006.

MÜLLER, T.; GROMOLL, J.; SIMONI, M. Absence of exon 10 of the human luteinizing hormone (LH) receptor impairs LH, but not human chorionic gonadotropin action. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.88, p.2242-2249, 2003.

NOGUEIRA, M.F.G.; BURATINI, J.R. J.; PRICE, C.A.; CASTILHO, A.C.S.; PINTO, 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. **Molecular Reproduction and Development**, v.74, p.680-686, 2007.

PFÄFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v.30, n.9, p.e36, 2002.

PUETT, D.; ANGELOVA, K.; DA COSTA, M.R.; WARRENFELTZ, S.W.; FANELLI, F. The luteinizing hormone receptor: insights into structure-function relationships and hormone-receptor-mediated changes in gene expression in ovarian cancer cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.329, p.47-55, 2010.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREZ, R.H.; MOORMAN, A.F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v.339, p.62-66, 2003.

RHODES 3RD, R.C.; RANDEL, R.D.; HARMS, P.G. Reproductive studies of brahman cattle iv. Luteinizing hormone levels in ovariectomized Brahman, Brahman x Hereford and Hereford cows following a 20 mg dose of estradiol-17beta. **Theriogenology**, v.10, p.429-437, 1978.

- RHODES, F.M.; PETERSON, A.J.; JOLLY, P.D. Gonadotrophin responsiveness, aromatase activity and insulin-like growth factor binding protein content of bovine ovarian follicles during the first follicular wave. **Reproduction**, v.122, n.4, p.561-569, 2001.
- ROBERT, C.; GAGNÉ, D.; LUSSIER, J.G.; BOUSQUET, D.; BARNES, F.L.; SIRARD, M-A. Presence of LH receptor mRNA in granulosa cells as a potential marker of oocyte developmental competence and characterization of the bovine splicing isoforms. **Reproduction**, v.125, p.437-446, 2003.
- ROBERTS, A.J.; ECHTERNKAMP, S.E. In vitro production of estradiol by bovine granulosa cells: evaluation of culture condition, stage of follicular development, and location of cells within follicles. **Biology of Reproduction**, v.51, p.273-282, 1994.
- RODRIGUES, H.D.; KINDER, J.E.; FITZPATRICK, L.A. Estradiol regulation of luteinizing hormone secretion in heifers of two breed types that reach puberty at different ages. **Biology of Reproduction**, v.66, p.603-609, 2002.
- ROUILLIER, P.; MATTON, P.; SIRARD, M.A.; GUILBAULT, L.A. Follicle-stimulating hormone-induced estradiol and progesterone production by bovine antral and mural granulosa cells cultured in vitro in a completely defined medium. **Journal of Animal Science**, v.74, p.3012-3019, 1996.
- ROUILLIER, P.; MATTON, P.; DUFOUR, M.; SIRARD, M.A.; GUILBAULT, L.A. Steroid production, cell proliferation, and apoptosis in cultured bovine antral and mural granulosa cells: development of an in vitro model to study estradiol production. **Molecular Reproduction and Development**, v.50, p.170-177, 1998.
- SANGSRITAVONG, S.; COMBS, D.K.; SARTORI, R.; ARMENTANO, L.E.; WILTBANK, M.C. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17beta in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.2831-2842, 2002.
- SARTORELLI, E.S.; CARVALHO, L.M.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J.; BARROS, C.M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v.63, p.2382-2394, 2005.
- SARTORI, R.; BARROS, C.M. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v.124, p.244-250, 2011.
- SCHOENEMANN, H.M.; HUMPHREY, W.D.; CROWDER, M.E.; NETT, T.M.; REEVES, J.J. Pituitary luteinizing hormone-releasing hormone receptors in ovariectomized cows after challenge with ovarian steroids. **Biology of Reproduction**, v.32, p.574-583, 1985.
- SIMÕES, R.A.L.; SATRAPA, R.A.; ROSA, F.S.; PIAGENTINI, M.; CASTILHO, A.C.S.; ERENO, R.L.; TRINCA, L.A.; NOGUEIRA, M.F.G.; BURATINI JR, J.; BARROS, C.M. Ovulation rate and its relationship with follicle diameter and gene expression of the LH receptor (LHR) in Nelore cows. **Theriogenology**, v.77, p.139-147, 2012.
- SIRARD, M.A.; ROBERT, C.; GAGNE, D.; BOUSQUET, D.; BARNES, F.L. Splicing isoforms of the bovine LH receptor in granulosa cells of follicles with oocytes of different developmental competencies. **Theriogenology**, v.53, p.412 (abstract). 2000.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, p.2731-2739, 2011.

VIANA, J.H.M.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F.; CAMARGO, L.S.A. Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.2501–2509, 2000.

VIANA, J.H.; PALHAO, M.P.; SIQUEIRA, L.G.; FONSECA, J.F.; CAMARGO, L.S. Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. **Theriogenology**, v.73, n.7, p.966-972, 2010.

WOHLRES-VIANA, S.; PEREIRA, M.M.; VIANA, J.H.M.; MACHADO, M.A.; CAMARGO, L.S.A. Comparison of gene expression in *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced in vivo or in vitro. **Livestock Science**, v.140, p.62-67, 2011.

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. **Biology of Reproduction**, v.53, p.951-957, 1995.

ZHANG, F.P.; KERO, J.; HUHTANIEMI, I. The unique exon 10 of the human luteinizing hormone receptor is necessary for expression of the receptor protein at the plasma membrane in the human luteinizing hormone receptor, but deleterious when inserted into the human follicle-stimulating hormone receptor. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.142, p.165-174, 1998.

CAPÍTULO 3: VARIABILIDADE DE RESPOSTA À SUPEROVULAÇÃO EM BOVINOS E RELAÇÃO COM A EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE ISOFORMAS DO RECEPTOR DO HORMÔNIO LUTEINIZANTE

1 RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão das isoformas do *LHR* em novilhas Gir caracterizadas com boa ($10,3 \pm 1,2$ embriões/coleta, N=5) ou má ($1,1 \pm 0,3$ embriões/coleta, N=5) resposta a protocolos de superovulação. Em ambos os grupos, células da granulosa (CG) foram coletadas por ultrassonografia de folículos de 8 mm em crescimento ou de onda folicular sincronizada, mas não estimulada (tratamento Controle) ou no quarto dia da superovulação (tratamento SOV), induzida com 200 UI de FSHp. O fluido folicular recuperado foi centrifugado e as células foram lavadas com NaCl 0,9% e mantidas em RNA Later. O RNA total foi extraído e o cDNA sintetizado por transcrição reversa. As amostras de cDNA foram amplificadas por PCR em tempo real utilizando um *primer* para o receptor do LH não seletivo para as isoformas (*LHR* total) e quatro *primers* específicos para as isoformas (S1, S10, S10+11, e S11). As análises dos resultados foram realizadas utilizando o programa REST e os valores de expressão estão apresentados como média \pm EPM. No grupo de boa resposta, não houve diferença ($P > 0,05$) na expressão de *LHR* total entre as amostras de CG dos tratamentos Controle e SOV. Entretanto, a isoforma S10+11 estava sub-expressa ($0,4 \pm 0,1$; $P < 0,01$) em SOV quando comparado com Controle. No grupo de má resposta, a expressão de *LHR* total estava menor ($0,2 \pm 0,1$; $P < 0,01$) em SOV em comparação com Controle, mas não houve diferença na expressão das isoformas ($P > 0,05$). Comparando os grupos de resposta (boa e má), o *LHR* total ($15,1 \pm 7,6$; $P < 0,001$) e as isoformas S10 ($5,7 \pm 2,7$; $P < 0,01$), S10+11 ($1,9 \pm 0,6$; $P < 0,01$), e S11 ($5,1 \pm 2,5$; $P < 0,01$) estavam sobre-expressos no Controle dos animais com má resposta, mas não houve diferença ($P > 0,05$) em nenhuma forma de *LHR* durante o SOV. Em conclusão, o *LHR* é diferencialmente expresso em folículos dominantes de novilhas Gir caracterizadas com boa ou má resposta a superovulação; mas o tratamento com FSH exógeno modula e reduz as diferenças originais observadas em ciclos não estimulados.

2 INTRODUÇÃO

A estimulação exógena para o desenvolvimento folicular é um procedimento amplamente utilizado em reprodução assistida (seja para a produção *in vivo* de embriões ou para a preparação de doadoras para aspiração folicular). Contudo, este processo é caracterizado por uma alta variabilidade (revisado por KAFI e MCGOWAN, 1997), que resulta em uma produção de embriões imprevisível e, conseqüentemente, em falta de eficiência no manejo das receptoras e altos custos por gestação. A variabilidade na resposta a superovulação é evidenciada pelos resultados observados em animais com idade similar e mantidos na mesma condição de manejo, tratados com os mesmos hormônios e protocolos (GREYLING *et al.*, 2002). Além disso, alguns animais eventualmente não irão responder aos protocolos com hormônio folículo estimulante (FSH), independentemente da ausência de qualquer anormalidade reprodutiva. Este fenótipo, conhecido como “síndrome da má respondedora”, tem sido bem caracterizado em humanos (TARLATZIS *et al.*, 2003, WEI *et al.*, 2010). Em bovinos, espécie na qual a superovulação é muito utilizada, cerca de um terço das potenciais doadoras falham em responder ao tratamento (DESAULNIERS *et al.*, 1995; THIBIER, 2008). No gado Gir, a principal raça zebuína utilizada para a produção de rebanhos mestiços no Brasil, a produção de embriões após superovulação é menor do que em *Bos taurus* e do que em raças de corte de *Bos indicus*, com uma média de 3,5 embriões por coleta (VIANA *et al.*, 2007). Esta baixa produção de embriões está associada com um alto percentual de animais não responsivos e à observação de distúrbios no progresso da esteroidogênese folicular (VIANA *et al.*, 2007). Desta forma, a raça Gir representa um possível modelo para o estudo do contexto fisiológico envolvido em falhas na resposta a tratamentos com FSH relacionadas com o desenvolvimento folicular.

A indução de múltiplas ovulações em espécies uníparas requer uma estratégia que supere os efeitos prejudiciais da dominância folicular sobre os folículos subordinados na mesma onda folicular. O principal mecanismo de estabelecimento dos folículos dominantes é a redução das concentrações de FSH endógeno (GINTHER *et al.*, 1989); desta maneira, uma terapia com FSH iniciada antes da divergência folicular suporta o crescimento de múltiplos folículos. A eficiência dos tratamentos superovulatórios com doses decrescentes de FSH mostra que estes folículos são progressivamente menos

dependentes do suporte de FSH. Na verdade, os folículos dominantes apresentam uma transição na dependência primária de FSH para o hormônio luteinizante (LH) (GINTHER *et al.*, 2001), e o crescimento folicular subsequente e a ovulação não irão ocorrer na ausência de um estímulo apropriado de LH (GINTHER *et al.*, 2003).

A divergência folicular durante o estabelecimento do folículo dominante está associada com uma elevação na expressão de receptores de LH tanto nas células da granulosa quanto da teca no momento da seleção (GINTHER *et al.*, 2001). Existem evidências de que a expressão de *LHR* e suas isoformas (produtos de *splicing* alternativo) possuem um papel central no controle dos efeitos do LH no crescimento folicular e na ovulação. Recentemente, foi sugerida a hipótese de que a expressão de uma destas isoformas, o *splicing* parcial do éxon 11, poderia afetar os resultados de superovulação (BARROS *et al.*, 2010). Contudo, pouco se sabe sobre esta relação ou sobre uma possível diferença no padrão de expressão das isoformas entre as doadoras com diferentes performances de produção de embriões. O objetivo do presente estudo foi investigar diferenças na expressão de transcritos para *LHR* e suas isoformas em células da granulosa de folículos em crescimento após a estimulação com FSH exógeno em novilhas Gir previamente caracterizadas com boa ou má resposta à superovulação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 População animal e localização

Este estudo foi realizado nos Laboratórios de Reprodução Animal e de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite, localizada em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. Novilhas maduras reprodutivamente e não gestantes da raça Gir (*Bos indicus*; n=10, peso corporal $358,6 \pm 11,1$ kg) foram utilizadas para coletas *in vivo* de células da granulosa (CG). Exames ginecológicos por ultrassonografia constataram que todos os animais ciclavam e não apresentavam anormalidades reprodutivas. As novilhas foram mantidas em sistema de pastagem (*Brachiaria decumbens*) suplementado com silagem de milho e concentrado para atender aos requisitos NRC. Água e minerais estavam disponíveis *ad*

libitum. Todos os procedimentos realizados nos animais experimentais foram conduzidos de acordo com as diretrizes da Comissão de Ética, Bioética e Bem-Estar Animal (CEBEA) e foram aprovados pelo Comitê de ética no uso de animais da Embrapa Gado de Leite (Protocolo CEUA-CNPGL 03/2013; Anexo I).

3.2 Desenho experimental

Um grupo de 15 novilhas foram superovuladas com o mesmo protocolo, hormônios e doses. A população folicular foi avaliada diariamente por ultrassonografia do dia anterior (Dia 0) ao último dia da superovulação (Dia 4). Os dados de desenvolvimento folicular durante a superovulação, e o número de corpos lúteos e estruturas recuperadas, foram utilizados para classificar retrospectivamente a novilhas de acordo com a resposta ao protocolo. Quatro meses depois, uma amostra controle de células da granulosa de folículos dominantes de cerca de 8 mm que se desenvolveram sem estimulação exógena foi coletada de todas as novilhas após a sincronização da onda folicular, e uma segunda superovulação foi realizada, quando uma amostra de células de granulosa de um folículo de 8 mm foi coletada de cada novilha no Dia 4. Do grupo inicial, 5 animais foram descartados por inconsistência de resposta, e os demais 10 foram utilizados para avaliação da expressão relativa do *LHR* total e das isoformas do *LHR*. Os dados foram comparada entre os folículos que se desenvolveram com (tratamento SOV) ou sem (tratamento Controle) estimulação exógena com FSH, e entre animais com boa e má resposta à superovulação.

3.3 Sincronização e monitoramento do desenvolvimento folicular, superovulação, e recuperação de embriões

As ondas foliculares foram sincronizadas utilizando benzoato de estradiol (EB; Sincrodiol, Ourofino Agronegocio, Ribeirão Preto, Brasil) e implantes intravaginais de progesterona (1,0 g de progesterona; Sincrogest, Ourofino). As superovulações foram induzidas com oito doses decrescentes de FSHp (Pluset, Hertape Calier Saúde Animal, Juatuba, Brasil) injetadas a cada 12 h, em um total de 200 IU por doadora. A luteólise foi induzida com cloprostenol sódico (0,526 mg i.m.; Sincrocio, Ourofino) e remoção do implante com P₄ no Dia 4 da superovulação. Os ovários foram avaliados por

ultrassonografia do dia anterior (Dia 0) até o final da superovulação (Dia 4). As avaliações foram realizadas a cada 24 h com um equipamento portátil de ultrassonografia equipado com uma probe retal linear de 8 MHz (Aquila Vet, Esaote, Genova, Itália). O número e diâmetro de todos os folículos presentes foram determinados e gravados. As ovulações foram induzidas no Dia 5, com 100 mcg de acetato de buserelina (Sincroforte, Ouro Fino). As doadoras foram inseminadas depois de 12 e 24 h por um único técnico, com sêmen de touros Gir. A coleta dos embriões foi realizada não-cirurgicamente sete dias após a inseminação. Imediatamente após a coleta, o número de corpos lúteos presentes nos ovários foi contado por ultrassonografia.

3.4 Caracterização da resposta superovulatória

Para estabelecer critérios para a avaliação da resposta superovulatória, os dados de todos os tratamentos foram analisados para determinar a relação entre o diâmetro folicular e probabilidade de ovulação, utilizando um modelo polimomial. A maior correlação entre um diâmetro mínimo e o número de corpos lúteos e estruturas recuperadas foi observada para folículos ≥ 7 mm ($P < 0,001$). Desta forma, a eficiência da superestimulação foi determinada de acordo com o número de pequenos folículos que atingiram pelo menos este diâmetro no Dia 4. Os bovinos são tipicamente monovulatórios, mas ovulações duplas são observadas com frequência. Portanto, novilhas produzindo uma média menor que duas estruturas por coleta foram classificadas com má resposta. Novilhas com média de mais de cinco estruturas por coleta foram selecionadas para o subgrupo de boa resposta.

3.5 Recuperação e processamento das células da granulosa

As amostras de CG foram coletadas utilizando a metodologia descrita anteriormente por Arashiro *et al.* (2013) nas novilhas classificadas com boa ou má resposta. O RNA total foi extraído utilizando o kit comercial *RNeasy Micro Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram quantificadas por espectrofotometria (Nanodrop, Thermo Scientific, Walham, MA, EUA), e a qualidade foi determinada utilizando o Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent, Palo Alto, CA, EUA). A transcrição reversa foi realizada utilizando o kit comercial *SuperScript III First-*

Stand Synthesis Supermix (Invitrogen, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram armazenadas a -70 °C até a PCR.

3.6 *Primers* utilizados para identificação dos polimorfismos, sequenciamento e expressão relativa das isoformas

Os *primers* foram desenhados utilizando o programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>), de acordo com a sequência do Receptor do Hormônio Luteinizante de *Bos taurus* disponível no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov; *accession number* NM_174381.1) ou da literatura referenciada (Tabela 1). Todas as amostras utilizadas neste experimento foram testadas para contaminação com células da teca utilizando um *primer* para o gene *CYP17A1*. Amostras apresentando contaminação foram descartadas.

Tabela 1. *Primers* utilizados para identificação dos polimorfismos, PCR-RFLP, e PCR em tempo real das isoformas de *LHR* e dos controles.

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	Fragmento (bp)	AT (°C)	Referência
LHR1	F - ATGGGACGGCCGTCCCTCGCGCTGAGG R - CCGAGGGAGATTTGTAAACG	378	65 50	Kawate <i>et al.</i> , 2004 --
LHR2	F - ATGCCTTTGACAACCTCCTC R - GAATGGACTCTAGCCCGTAGG	462	52	-- --
LHR3	F - ATGCCTTTGACAACCTCCTC R - GAATGGACTCTAGCCCGTAGG	462	52	-- --
LHR4	F - CTGGAGCTGAAGAAAATGC R - ATCCCAGCCACTCAGTTCAC	387	50	-- Robert <i>et al.</i> , 2003
LHR5	F - AAAGCTGCCAACAAACGA R - CCTGTCTGCCAGTCTATG	459	50	Nogueira <i>et al.</i> , 2007 Mamluk <i>et al.</i> , 1998
LHR6	F - CAAACTGACAGTCCCCGCTTT R - GCAACACGGCAATGAGAGTA	335	52	Marson <i>et al.</i> 2008 Hastings <i>et al.</i> 2006
LHR7	F - CAAAAGCTGCGACTGAAACA R - CAACAGAAAGAAATCCCTTTGG	484	48	-- Robert <i>et al.</i> 2003
LHR8	F - ATCCAGAGCTGATGGCTACC R - ATAGCAAGTCTTGCCAGGA	425	50	-- Nogueira <i>et al.</i> 2007
LHR9	F - AAAGGCATTCCAAAGGGATT R - TACTACCCAAAGCAATTTATAGATTC	462	47	-- --

LHR S1	F - TGCAGCTGCCCGCAGGCC R - CCGAGGGAGATTTGTAAACG	243	60	--
LHR S10	F - CGATTATTCTGCCATCTTTGC R - CCTGTCTGCCAGTCTATG	363	53	-- Mamluk <i>et al.</i> , 1998
LHR S10+11	F - CTTGCCAACAAACGAGACTTC REVERSE LHR S10	110	53	--
LHR S11	F - CCAAATAATGAAACACTGACTTCTGC REVERSE LHR S10	112	60	--
<i>Beta-actina</i>	F - GACATCCGCAAGGACCTCTA R - ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	205	53	Camargo <i>et al.</i> , 2011
<i>H2a</i>	F - GCCATCCTGGAGTACCTCAC R - TGGATGTGTGGAATGACACC	176	52	Wohlres-Viana <i>et al.</i> , 2011
<i>GAPDH</i>	F - GAGCTTGACAAAAGTGGTCGTTGAG R - CCAACGTGTCTGTTGTGGATCTGA	237	53	Mourot <i>et al.</i> , 2006
<i>Cyp17A1</i>	F - GAATGCCTTTGCCCTGTTCA R - CGCGTTTGAACACAACCCTT	329	56	Lehmann <i>et al.</i> , 2000

AT: *Annealing Temperature* – Temperatura de ligação dos *primers*.

--: Sequência de *primer* desenhada especificamente para este estudo.

3.7 Identificação dos polimorfismos e das isoformas

Para a identificação dos polimorfismos foram utilizados os *primers* de LHR1 ao LHR9. Para amplificar a região inicial do transcrito o par de *primer* LHR1 foi utilizado na seguinte condição: tampão de PCR (1X), MgCl₂ (2 mM), dNTPs (0,2 mM), *primers* (*forward* e *reverse*, Tabela 1), Hot Start Taq Polymerase (1U, Promega, Madison, WI, EUA), cDNA (equivalente a 8 ng de RNA), Betaína (2M) e água até um volume final de 20 µL. Devido ao conteúdo GC dos *primers* e subsequente diferença na temperatura de anelamento, a condição de PCR para este conjunto de *primers* foi: 94°C por 2 min seguidos de 40 ciclos de 94°C por 45 seg, 65°C por 30 seg (anelamento do *primer* LHR1 *forward*) seguido de 50°C por 30 seg (anelamento do *primer* LHR1 *reverse*) (Tabela 1), e 72°C por 1 min. Para os demais *primers* (LHR2, LHR3, LHR4, LHR5, LHR6, LHR7, LHR8 e LHR9), cada PCR era composta por tampão de PCR (1X), MgCl₂ (2 mM), dNTPs (0,2 mM), *primers* (*forward* e *reverse*, Tabela 1), Hot Start Taq Polymerase (1U, Promega, Madison, WI, EUA), cDNA (equivalente a 8 ng de RNA), e água até um volume final de 20 µL. A condição de corrida para estes *primers* foi elaborada utilizando o protocolo de PCR *Touchdown* (KORBIE e MATTICK, 2008) como segue: 94°C por 2 min seguidos de 10 ciclos de 94°C por 45 seg, 10°C acima da temperatura específica do *primer* (Tabela 1) por

30 seg (decrecendo 1°C a cada ciclo), e 72°C por 1 min; 30 ciclos de 94°C por 45 seg, temperatura específica do *primer* (Tabela 1) por 30 seg, e 72°C por 1 min.

A metodologia de PCR-RFLP foi utilizada para a identificação das isoformas. Inicialmente, cada PCR era composta por tampão de PCR (1X), MgCl₂ (2 mM), dNTPs (0,2 mM), *primers* (200 nM para LHR3 e LHR S1, 300 nM para os demais, Tabela 1), Hot Start Taq Polymerase (1U, Promega, Madison, WI, EUA), cDNA (equivalente a 8 ng de RNA), e água até um volume final de 20 µL. Uma vez que o conteúdo GC e consequentemente a temperatura de ligação dos *primers* LHR1 *forward* (F) e *reverse* (R) LHR1 eram muito diferentes, a condição para esta reação foi 94°C por 2 min; 40 ciclos de 94°C por 45 seg; 65°C por 30 seg (ligação do *primer* LHR1 F) seguida de 50°C por 30 seg (ligação do *primer* LHR1 R); e 72°C por 1 min. Para os demais *primers* (LHR2, LHR3, e LHR5) as reações foram realizadas utilizando protocolo de PCR *Touchdown* (KORBIE e MATTICK, 2008), que consistiam de 94°C por 2 min; 10 ciclos de 94°C por 45 seg, com a etapa de anelamento dos *primers* iniciando a 10°C acima da temperatura específica de ligação do *primer* e decrescendo 1°C a cada ciclo subsequente, por 30 seg e 72°C por 1 min; seguidos de 30 ciclos a 94°C por 45 seg; temperatura específica de anelamento dos *primers* (Tabela 1) por 30 seg; e 72°C por 1 min. Antes da digestão com enzimas, todos os produtos de PCR foram observados por eletroforese em gel de poliacrilamida nativa (8%) para confirmar a amplificação dos fragmentos.

A Tabela 2 mostra os conjuntos de *primers* e enzimas utilizados para identificar cada possível *splicing* alternativo no *LHR* das amostras obtidas dos animais com e sem estimulação hormonal exógena. A única exceção foi o *primer* LHR5, uma vez que os fragmentos amplificados não necessitavam de digestão enzimática para diferenciar seus tamanhos.

Tabela 2. *Primers* e enzimas de restrição utilizados para identificar a ocorrência de *splicing* alternativo no receptor de LH.

<i>Primer</i>	Enzima	<i>Splicing</i> Alternativo
LHR1	Hind III	Éxon 2 e Éxon 3
LHR2	AluI	Éxon 4, Éxon 5 e Éxon 8
	Hinf I	Éxon 6 e Éxon 7
LHR3	MspI	Éxon 9 e Éxon 10
LHR4	---	Éxon 10, Partial do Éxon 11, Éxon 10 + Partial do Éxon 11

As digestões foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. Para HinfI e AluI (ambas Promega), a digestão ocorreu a 37°C por 180 min e a inativação da enzima a 60°C por 20 min. Para MspI e HindIII (Promega e Fermentas, respectivamente), a digestão ocorreu a 37°C por 180 min e a inativação da enzima a 80°C por 20 min. Os fragmentos foram observados por eletroforese em gel de poliacrilamida nativa (8%) e corados com nitrato de prata.

3.8 Sequenciamento

Os polimorfismos e as isoformas identificadas por PCR-RFLP foram sequenciados para confirmar a posição do éxon removido e a sequência exata de nucleotídeos dos fragmentos. As PCRs foram realizadas como descrito anteriormente em relação aos componentes das reações e número de ciclos. Os *primers* LHR S1, LHR S10, LHR S11 e LHR S10+11 (Tabela 1) foram utilizados para amplificar as isoformas específicas identificadas na PCR-RFLP. Após as PCRs, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1%) e visualizados sob luz ultravioleta. Os fragmentos foram cortados e purificados utilizando o *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram então quantificadas e armazenadas a -20°C até a reação de sequenciamento.

Cada reação de sequenciamento era composta por 4µL de mix contendo nucleotídeos marcados incluso no kit comercial *DYEnamic Etdye Terminator Kit MegaBACE* (GE Healthcare), 1µL de *primer* (apenas forward ou apenas reverse, permitindo a amplificação de apenas uma fita), 200ng de DNA purificado, e água ultrapura para atingir um volume final de 10µL. Além disso, o DNA (M13) fornecido com o kit de sequenciamento foi utilizado como controle. Neste caso, a reação consistia de 1µL de DNA, 2,5µL de água, 2,5µL de *primer* e 4µL de mix.

As reações de sequenciamento foram incubadas em termociclador (Verity; Applied Biosystems, Foster City, EUA), o DNA foi precipitado, 10µL de *loading solution* para MegaBACE (também presente no kit) foram adicionados, e as amostras foram mantidas a 4°C por pelo menos 2 h. As amostras foram então injetadas no equipamento MegaBACE 1000 utilizando parâmetros de corrida pré-estabelecidos. Os cromatogramas resultantes foram avaliados utilizando o programa *DNA Baser* (DNA Baser Sequence Assembler

v3.5.4., Heracle BioSoft SRL, www.DnaBaser.com). As sequências foram alinhadas utilizando o programa MEGA5 (TAMURA *et al.*, 2011).

3.9 Análise de expressão relativa

Esta metodologia foi utilizada para avaliar a concentração das isoformas de mRNA do LHR. Os mRNA para Beta-actina, GAPDH e H2a (Tabela 1) foram utilizados com controles endógenos e para a avaliação da expressão, foi utilizado aquele que apresentou menor coeficiente de variação entre todas as amostras. Os *primers* para o *splicing* de 30 bp no éxon 1 (LHR S1), *splicing* do éxon 10 (LHR S10), *splicing* parcial do éxon 11 (LHR S11) e *splicing* do éxon 10 e parcial do éxon 11 juntos (LHR S10+11) foram utilizados para avaliar o comportamento destas isoformas em amostras obtidas de animais com e sem estimulação hormonal exógena. As reações foram realizadas utilizando o kit comercial Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. A quantidade de cDNA e *primers* foi definida como aquelas que atingiram a maior eficiência no processo de otimização (valores entre 1,80 E 2,00). A eficiência foi calculada considerando a fluorescência emitida em cada ciclo e utilizando o programa LinRegPCR (RAMAKERS *et al.*, 2003). Os controles negativos consistiram de reações sem cDNA. As amostras foram incubadas no equipamento ABI PRISM 7300 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems) em duplicatas.

3.10 Análise dos dados

Os números de folículos de cada categoria de tamanho, de corpos lúteos, de estruturas e de embriões viáveis recuperados, assim como os índices de eficiência superovulatória, foram comparados entre as doadoras classificadas com boa ou má resposta à superovulação utilizando o teste t de Student. Os cálculos de quantificação relativa foram realizados pelo método do Ct comparativo, utilizando as seguintes comparações: Controle vs. SOV em animais com boa resposta; Controle vs. SOV em animais com má resposta; Controle em boa resposta vs. má resposta; SOV em boa resposta vs. má resposta. O mRNA para o gene Beta-actina foi utilizado como controle endógeno por apresentar o menor coeficiente de variação (1,54) entre todas as amostras. O Controle foi utilizado como referência (valores de expressão igual a 1) nas

comparações com SOV; e o grupo de boa resposta foi utilizado como referência nas comparações com o grupo de má resposta. Os valores de quantificação relativa estão apresentados como diferença em valores múltiplos em relação à referência. As análises de expressão gênica relativa foram realizadas com o programa REST[®] utilizando o teste pair-wise fixed reallocation randomization (PFAFFL *et al.*, 2002), que é baseado em testes de permutação. Os valores de expressão relativa estão apresentados como média \pm erro padrão (EPM) e diferenças de $P < 0,05$ foram consideradas significativas. O tamanho dos fragmentos amplificados foi confirmado por eletroforese em gel de poliacrilamida nativa (8%) corado com nitrato de prata.

4 RESULTADOS

Os resultados de superovulação nos grupos de doadoras classificadas com boa ou má resposta estão resumidos na Tabela 3. O grupo de boa resposta (novilhas produzindo >5 estruturas por coleta) apresentou mais folículos totais no início do tratamento, mais folículos > 7 mm após a superestimulação, formou mais corpos lúteos, e produziu mais embriões viáveis ($P < 0,01$) do que o grupo de má resposta (novilhas produzindo <2 estruturas por coleta). Tanto a eficiência superestimulatória quanto a eficiência geral da superovulação também foram maiores no grupo de boa resposta. Entretanto, as taxas de ovulação foram similares ($P > 0,05$) entre os grupos.

Tabela 3. Parâmetros superovulatórios das doadoras classificadas com boa resposta ou com má resposta ao tratamento com FSH exógeno para induzir múltiplas ovulações.

Parâmetro	Resposta superovulatória		P
	Boa (n=5)	Má (n=5)	
Folículos < 4 mm no Dia 0	46,1 \pm 5,9	25,7 \pm 3,3	0,0161
Folículos > 7 mm no Dia 4	31,7 \pm 4,2	6,3 \pm 2,0	0,0006
Eficiência superestimulatória ¹	68,9 \pm 3,9	28,7 \pm 9,5	0,0044
Corpos lúteos	20,8 \pm 2,8	4,5 \pm 1,4	0,0008
Taxa de ovulação ²	66,6 \pm 7,1	79,6 \pm 9,9	N.S.
Estruturas por coleta	10,3 \pm 1,2	1,1 \pm 0,3	0,0001
Embriões viáveis	5,2 \pm 1,9	0,8 \pm 0,3	0,0013
Eficiência superovulatória geral ³	23,6 \pm 3,7	4,8 \pm 1,4	0,0479

¹ Número de folículos > 7 mm no Dia 4 por folículo < 4 mm no Dia 0

² Número de corpos lúteos por folículos > 7 mm no Dia 4

³ Número de estruturas recuperadas por folículo presente no início do tratamento

Quatro isoformas do *LHR* foram detectadas em CG dos folículos amostrados com e sem estímulo hormonal, uma com *splicing* de 30 pares de base no éxon 1, uma com *splicing* do éxon 10 (S10), uma com *splicing* do éxon 10 e *splicing* parcial do éxon 11 (S10+11), e uma com *splicing* parcial do éxon 11 (S11) (Anexo II).

Quinze polimorfismos (SNPs) foram identificados ao todo nos animais dos grupos de boas e má resposta à superovulação (Tabela 4). Estes SNPs apresentaram uma distribuição relativamente uniforme em ambos os grupos.

A expressão dos transcritos de *LHR* total em CG de folículos com e sem estímulo hormonal está apresentada na Figura 1. Comparando as CG de folículos obtidos de animais com boa resposta sem estímulo hormonal (Controle) e com estímulo (SOV), não foram encontradas diferenças na quantidade de *LHR* total ($P > 0,05$). Entretanto, quando comparados às respectivas amostras obtidas do grupo de má resposta, foi possível detectar uma expressão menor em amostras SOV ($0,20 \pm 0,11$; $P < 0,01$). A comparação entre as amostras de animais com boa e má resposta sem estímulo hormonal (Controle) apresentou maior expressão de *LHR* total nas amostras de animais com má resposta ($15,15 \pm 7,58$; $P < 0,001$). Quando a mesma comparação foi feita para as amostras com estimulação (SOV), não foram observadas diferenças na quantidade de *LHR* total ($P > 0,05$).

Tabela 4. Polimorfismos identificados por sequenciamento nos grupos de Boa e Má resposta à superovulação.

SNP		28	54	413	496	539	703	726	876	1084	1131	1210	1328	1501	1666	1770
referência do <i>GenBank</i>		C	C	A	A	C	A	C	A	A	G	T	C	G	C	T
Boa Resposta	Animal 1	G	--	A ou G	A ou G	C ou T	--	--	--	A ou G	--	--	C ou T	G ou A	--	--
	Animal 2	**	**	A ou G	--	--	--	--	**	G	A	T ou G	--	A	--	--
	Animal 3	G	--	--	--	--	--	T	G	A ou G	--	T ou G	--	G ou A	--	--
	Animal 4	**	**	A ou G	A ou G	C ou T	--	--	G	--	--	--	--	G ou A	--	--
	Animal 5	G	**	--	--	--	--	--	--	G	A	T ou G	T	A	--	T ou G
Má Resposta	Animal 1	**	**	--	--	--	C	--	G	G	--	G	--	G ou A	--	--
	Animal 2	G	T	A ou G	A ou G	C ou T	--	--	G	--	A	T ou G	C ou T	--	A	--
	Animal 3	**	**	A ou G	A ou G	C ou T	--	**	**	--	A	T ou G	--	G ou A	--	--
	Animal 4	**	**	--	--	--	C	**	**	--	--	--	--	G ou A	--	--
	Animal 5	**	**	A ou G	--	--	C	**	**	A ou G	G ou A	G	--	--	--	--

** Dados perdidos

-- Sem alteração no nucleotídeo encontrado em relação à sequência de referência

SNP - Posição definida a partir do ATG iniciador

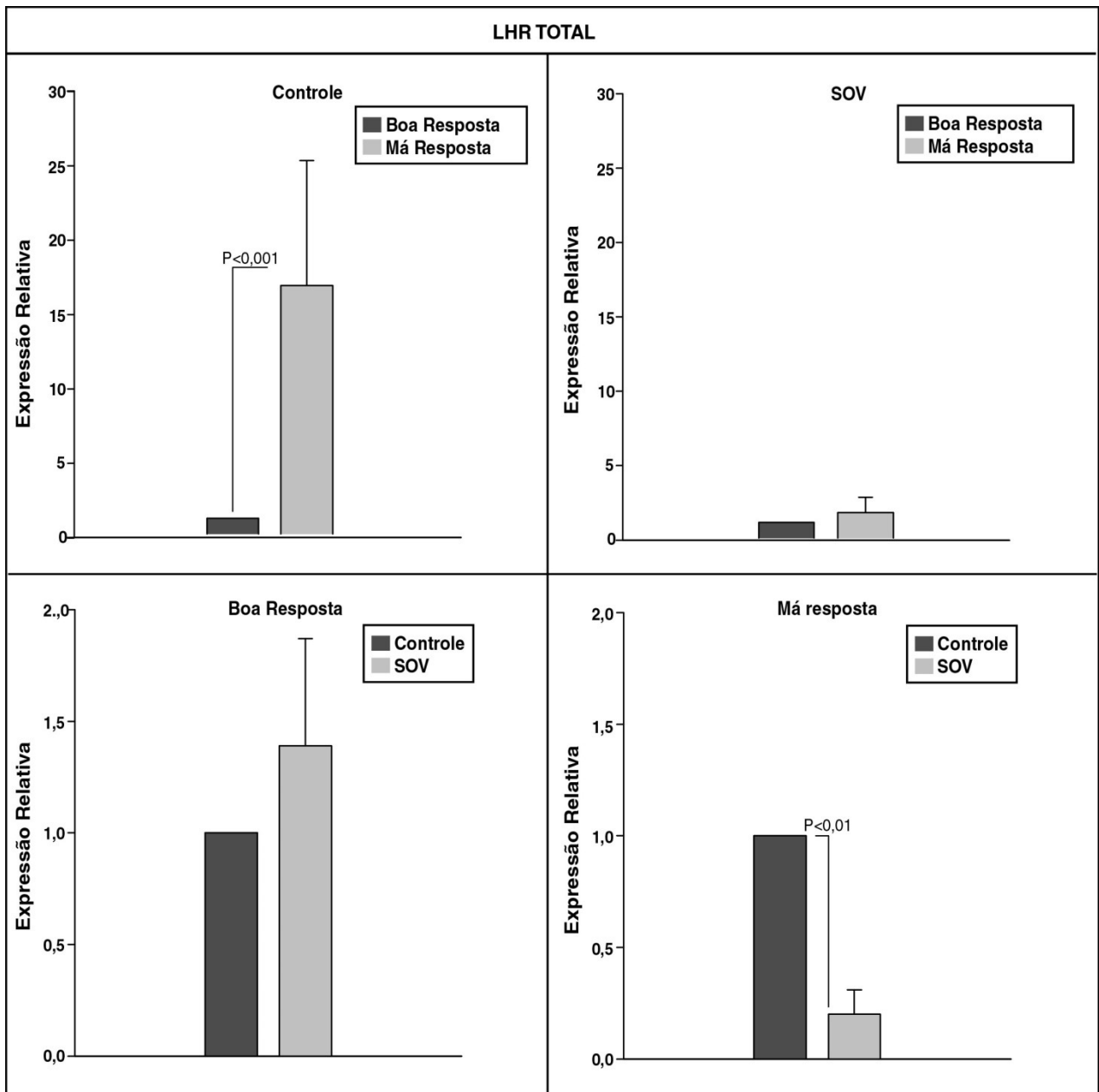


Figura 1. Expressão relativa do receptor do hormônio luteinizante (*LHR*) total em células da granulosa recuperadas de folículos de 8 mm de novilhas Gir de acordo com a presença ou não de estimulação com FSH exógeno (SOV) e com o fenótipo de resposta ao FSH (boa ou má resposta).

A análise de expressão dos transcritos com isoformas estão apresentadas na Figura 2. Comparando as CG obtidas de folículos de animais com boa resposta sem estímulo hormonal (Controle) e com estímulo (SOV), foi possível detectar uma maior expressão da isoforma S10 ($2,23 \pm 0,67$; $P < 0,05$), uma redução na quantidade de S10+11 e de S1 ($0,40 \pm 0,14$; $P < 0,01$ e $0,41 \pm 0,12$; $P < 0,05$, respectivamente) e nenhum efeito da superovulação na expressão da isoforma S11 ($P > 0,05$). Entretanto, quando comparamos as respectivas amostras obtidas de animais com má resposta, nenhuma das isoformas

apresentou expressão alterada ($P > 0,05$). A comparação entre amostras dos grupos de boa e má resposta sem estimulação hormonal foi utilizada para identificar a ocorrência natural de diferenças na expressão destas isoformas. Exceto para S1, as isoformas S10, S10+11 e S11 mostraram uma sobre-expressão nas amostras de CG de animais com má resposta ($5,75 \pm 2,70$; $P < 0,01$, $1,88 \pm 0,56$; $P < 0,05$ e $5,10 \pm 2,50$; $P < 0,01$, respectivamente). Quando a mesma comparação foi realizada utilizando as amostras com estimulação, nenhuma das isoformas apresentou expressão alterada ($P > 0,05$).

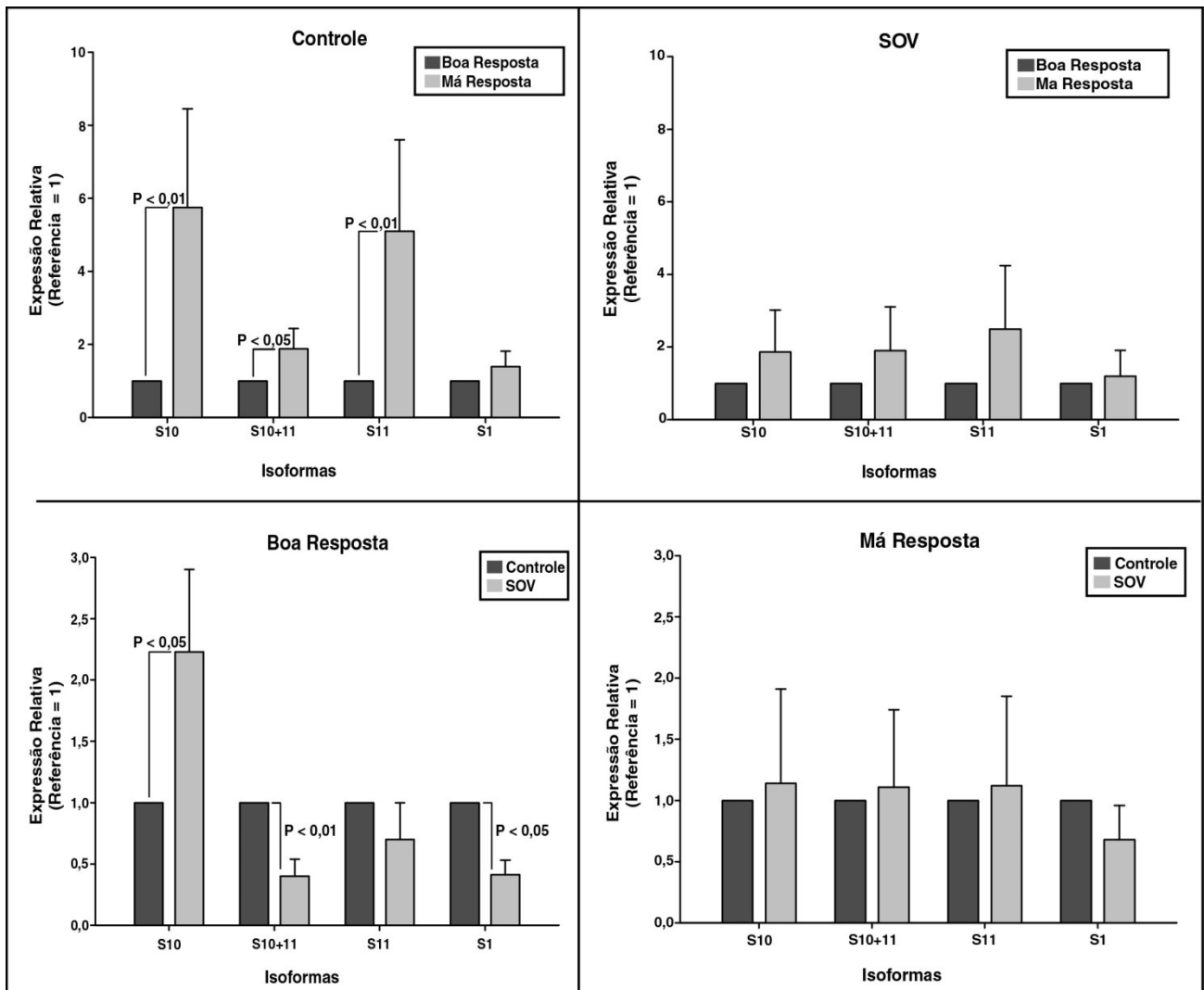


Figura 2. Expressão relativa de isoformas do receptor do hormônio luteinizante (*LHR*) em células da granulosa recuperados de folículos de 8 mm de novilhas Gir de acordo com a presença ou não de estimulação com FSH exógeno (SOV) e com fenótipo de resposta ao FSH (boa ou má resposta).

5 DISCUSSÃO

A caracterização de animais que falham em produzir embriões após protocolos convencionais de superovulação oferece um importante modelo experimental para investigar o contexto fisiológico da síndrome da má respondedora. O objetivo deste estudo foi investigar diferenças no padrão de expressão de *LHR* e de suas isoformas em células da granulosa de folículos que se desenvolveram após estimulação com FSH em novilhas da raça Gir previamente caracterizadas com boa ou má resposta à superovulação. Este é o primeiro estudo a avaliar um possível papel do padrão de expressão de isoformas de *LHR* sobre a variabilidade nos resultados de superovulação.

A análise parcial das superovulações mostrou que a maior correlação entre o diâmetro mínimo dos folículos no último dia do tratamento e o número de corpos lúteos ou estruturas recuperadas ocorreu em 7,0 mm. Estudos anteriores demonstraram que a probabilidade de ovulação após protocolo de superovulação estava relacionada com o diâmetro do folículo (YADAV *et al.*, 1986). Entretanto, a divergência folicular e a consequente transição da dependência de FSH para LH, assim como a aquisição da capacidade ovulatória, ocorrem em um folículo dominante de menor tamanho em raças zebuínas (SARTORI *et al.*, 2001). Desta forma, também era esperado que a relação entre o diâmetro do folículo após a estimulação com FSH exógeno e a taxa de ovulação fossem variar dependendo da raça avaliada. Como a ovulação foi induzida 24 h horas após a última injeção de FSH, os folículos de cerca de 7,0 mm podem ter crescido para 8,0 a 9,0 mm antes da ovulação.

O grupo caracterizado com boa resposta mostrou um número maior de folículos menores (<4 mm) um dia antes da superovulação. Na verdade, existe uma relação entre a população folicular e a produção de embriões após superovulação (ROMERO *et al.*, 2001). Contudo, a eficiência da superestimulação também foi maior no grupo de boa resposta, demonstrando que a população folicular não foi o único fator afetando a produção dos embriões. Uma hipótese já foi elaborada considerando que vacas com reduzida população folicular também poderiam apresentar uma capacidade reduzida de resposta ao FSH, mas neste estudo a contagem de folículos antrais baixa foi definida como animais com menos de 15 folículos por ovário (SCHEETZ *et al.*, 2012). No presente estudo, a população folicular no grupo de má resposta, apesar de ser menor do que no

grupo de boa resposta, foi maior do que a média da população folicular relatada para a raça Holandês (MOSSA *et al.*, 2012), na qual a média de produção de embriões por superovulação é maior do que em Gir.

Foi possível identificar 15 SNPs na sequência do receptor do hormônio luteinizante dos animais avaliados neste estudo. Contudo, como o número de indivíduos caracterizado fenotipicamente em cada grupo foi limitado, a associação destes polimorfismos com os fenótipos de resposta ao protocolo de estimulação hormonal é pouco informativa. Para que seja possível associar as alterações genéticas identificadas e os fenótipos avaliados faz-se necessário aumentar o número de animais em cada grupo. Os resultados do presente estudo apresentam uma possibilidade para aprofundar o conhecimento sobre a relação genótipo/fenótipo em trabalhos futuros.

A análise da expressão relativa do *LHR* mostrou ser de difícil interpretação. A expressão do *LHR* total (*LHR* integral e suas isoformas) foi reduzida após o estímulo com FSH exógeno, quando comparada com folículos que se desenvolveram naturalmente, no grupo de má resposta. Entretanto, não houve diferença na taxa de ovulação entre animais com boa e má resposta, ou seja, um percentual similar de folículos que atingiram pelo menos 7 mm foram capazes de ovular em ambos os grupos. Portanto, a expressão de *LHR* em folículos grandes não foi um fator chave para a baixa produção de embriões no grupo de má resposta. Poderia-se considerar a hipótese de que a expressão reduzida de *LHR* pode ter limitado o número de folículos capazes de crescer além de 7 mm, por que a divergência folicular ocorre na raça Gir quando o folículo dominante atinge cerca de 6,5 mm (VIANA *et al.*, 2010). No presente estudo, a expressão do *LHR* em folículos com 8-9 mm foi avaliada por que este é o diâmetro no qual foi possível observar um pico de expressão de *LHR* caracterizado previamente (Capítulo 2). Desta forma, para confirmar esta hipótese, estudos adicionais são necessários para avaliar a expressão de *LHR* em folículos no tamanho esperado para a divergência, provavelmente no Dia 3 da superovulação.

O grupo de má resposta apresentou um maior nível de expressão de *LHR* total em folículos sem estímulo, mas também uma maior expressão das isoformas S10, S10+11, e S11, mas não de S1. As primeiras três isoformas já haviam sido descritas tanto para *Bos taurus* (KAWATE *et al.*, 2002; ROBERT *et al.*, 2003) quanto para *Bos indicus* (NOGUEIRA *et al.*, 2007; SIMÕES *et al.*, 2012). O *splicing* do éxon 10 reduz a proporção de receptores ligados à superfície celular (ZHANG *et al.*, 1998), e as formas S11 e S10+11 não possuem os domínios transmembrana e intracelular (KAWATE, 1998). Assim, estas

formas são consideradas como menos e/ou não funcionais. A maior expressão de *LHR* total em animais com má resposta não estimuladas pode, conseqüentemente, ser causada por um maior nível de expressão da isoformas não funcionais, e, portanto sugere um menor potencial de resposta à estimulação exógena.

O tratamento superovulatório parece equalizar o padrão de expressão de *LHR* entre animais com boa e má resposta. Existem algumas evidências de que a superovulação afeta o padrão de crescimento folicular, a síntese de estradiol, a qualidade dos oócitos, e o potencial de desenvolvimento dos embriões (HYTTEL *et al.*, 1989; GREVE e CALLESEN, 2001; DISKIN *et al.*, 2002). Entretanto, o presente estudo mostrou pela primeira vez que o FSH exógeno pode alterar a expressão do gene do receptor do LH. A ausência de diferenças na expressão do *LHR* induzida pela superovulação é coerente com a falta de diferenças nas taxas de ovulação, e sugere que a capacidade de resposta à superovulação pode estar relacionada com características intrínsecas das doadoras, como a diferença no padrão de expressão do *LHR* observada em folículos não estimulados.

Em conclusão, o *LHR* é diferencialmente expresso em folículos dominantes de novilhas da raça Gir caracterizadas com boa e má resposta à superovulação, mas o tratamento com FSH exógeno modula e reduz as diferenças observadas naturalmente em ciclos não estimulados.

6 REFERÊNCIAS

- ARASHIRO, E.K.N.; PALHAO, M.P.; WOHLRES-VIANA, S.; SIQUEIRA, L.G.B.; CAMARGO, L.S.A.; HENRY, M.; VIANA, J.H.M. In vivo collection of follicular fluid and granulosa cells from individual follicles of different diameters in cattle by adapted ovum pick-up system. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.11, p.73-80, 2013.
- BARROS, C.M.; ERENO, R.L.; SIMÕES, R.A.; FERNANDES, P.; BURATINI, J.; NOGUEIRA, M.F. Use of knowledge regarding LH receptors to improve superstimulatory treatments in cattle. **Reproduction Fertility and Development**, v.22, n.1, p.132-137, 2010.
- CAMARGO, L.S.A.; BOITE, M.C.; WOHLRES-VIANA, S.; MOTA, G.B.; SERAPIAO, R.V.; SA, W.F.; VIANA, J.H.M.; NOGUEIRA, L.A.G. Osmotic Challenge and expression of

aquaporin 3 and Na/K ATPase genes in bovine embryos produced in vitro. **Cryobiology**, v.63, p.256-262, 2011.

DESAULNIERS, D.M.; LUSSIER, J.G.; GOFF, A.K.; BOUSQUET, D.; GUILBAULT, L.A. Follicular development and reproductive endocrinology during and after superovulation in heifers and mature cows displaying contrasting superovulatory responses. **Theriogenology**, v.44, n.4, p.479-497, 1995.

DISKIN, M.G.; AUSTIN, E.J.; ROCHE, J.F. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.211-228, 2002.

GINTHER, O.J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal association among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.87, n.1, p.223-230, 1989.

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.; DONADEU, F.X.; GERFELT, D.R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.239-257, 2003.

GREVE, T.; CALLESEN, H. Rendez-vous in the oviduct: implications for superovulation and embryo transfer. **Reproduction Nutrition Development**, v.41, n.5, p.451-459, 2001.

GREYLING, J.P.C.; VAN DER NEST, M.; SCHWALBACH, L.M.J.; MULLER, T. Superovulation and embryo transfer in South African Boer and Indigenous feral goats. **Small Ruminant Research**, v.43, p.45-51, 2002.

HASTINGS, N.; DONN, S.; DERECKA, K.; FLINT, A.P.; WOOLLIAMS, J.A. Polymorphisms within the coding region of the bovine luteinizing hormone receptor gene and their association with fertility traits. **Animal Genetics**, v.37, p.583-585, 2006.

HYTTEL, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.38, p.35-47, 1989.

KAFI, M.; MCGOWAN, M.R. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. **Animal Reproduction Science**, v.48, n.2-4, p.137-157, 1997.

KAWATE, N.; OKUDA, K. Coordinated expression of splice variants for luteinizing hormone receptor messenger RNA during the development of bovine corpora lutea. **Molecular Reproduction and Development**, 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. **Journal of Reproduction and Development**, v.48, n.5, 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. **Journal of Reproduction and Development**, v.50, n.1, p.1-8, 2004.

KORBIE, D.J.; MATTICK, J.S. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. **Nature Protocols**, v.3, n.9, p.1452-1456, 2008.

LEHMANN, T.; BIERNACKA-LUKANTY, J.; TRZECIAK, W.H. Expression of three negative regulators of CYP17 gene transcription in adrenocortical cells. **Endocrine Research**, v.26, n.4, p.1019-1026, 2000.

MAMLUK, R.; WOLFENSON, D.; MEIDAN, R. LH receptor mRNA and cytochrome P450 side-chain cleavage expression in bovine theca and granulosa cells luteinized by LH or forskolin. **Domestic Animal Endocrinology**, v.15, n.2, p.103-114, 1998.

MARSON, E.P.; FERRAZ, J.B.S.; MEIRELLES, F.V.; BALIEIRO, J.C.C.; ELER, J.P. Effects of polymorphisms of LHR and FSHR genes on sexual precocity in a *Bos Taurus* x *Bos indicus* beef composite population. **Genetics and Molecular Research**, v.7, p. 243-51, 2008.

MOSSA, F.; WALSH, S.W.; BUTLER, S.T.; BERRY, D.P. CARTER, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G.W.; IRELAND, J.J.; EVANS, A.C. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.95, n.5, p.2355-2361, 2012.

MOUROT, M.; DUFORT, I.; GRAVEL, C.; ALGRIANY, O.; DIELEMAN, S.; SIRARD, M. A. The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, n.11, p.1367-1379, 2006.

NOGUEIRA, M.F.G.; BURATINI, J.R. J.; PRICE, C.A.; CASTILHO, A.C.S.; PINTO, 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. **Molecular Reproduction and Development**, v.74, p.680-686, 2007.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFFLE, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v.30, n.9, p.e36, 2002.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREZ, R.H.; MOORMAN, A.F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v.339, p.62-66, 2003.

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

ROMERO, A.; ALBERT, J.; BRINK, Z.; SEIDEL JR, G.E. Numbers of small follicles in ovaries affect superovulation response in cattle. **Theriogenology**, v.35, p.265, 1991.

SARTORI, R.; FRICKE, P.M.; FERREIRA, J.C.; GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v.65, n.5, p.1403-1409, 2001.

SCHEETZ, D.; FOLGER, J.K.; SMITH, G.W.; IRELAND, J.J. Granulosa cells are refractory to FSH action in individuals with a low antral follicle count. **Reproduction Fertility and Development**, v.24, n.2, p.327-336, 2012.

SIMÕES, R.A.L.; SATRAPA, R.A.; ROSA, F.S.; PIAGENTINI, M.; CASTILHO, A.C.S.; ERENO, R.L.; TRINCA, L.A.; NOGUEIRA, M.F.G.; BURATINI JR, J.; BARROS, C.M. Ovulation rate and its relationship with follicle diameter and gene expression of the LH receptor (LHR) in Nelore cows. **Theriogenology**, v.77, p.139-147, 2012.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, p.2731-2739, 2011.

TARLATZIS, B.C.; ZEPHIRIDIS, L.; GRIMBIZIS, G.; BONTIS, J. Clinical management of low ovarian response to stimulation for IVF: a systematic review. **Human Reproduction Update**, v.9, n.1, p.61-76, 2003.

THIBIER, M. International Embryo Transfer Society: Data Retrieval Committee Annual Report. **Embryo Transfer Newsletter**, v.26, n.4, p.4-9, 2008.

VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A.; SIQUEIRA, L.G.B.; SOUZA, E.D.; FREITAS, C.; FERNANDES, C.A.C. Characteristics of the superovulatory response in Gyr (*Bos indicus*) cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v.17, p.311-312, 2007.

VIANA, J.H.; PALHAO, M.P.; SIQUEIRA, L.G.; FONSECA, J.F.; CAMARGO, L.S. Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. **Theriogenology**, v.73, p.966-972, 2010.

WEI, Z.; CHENG, X.; LI, H.; CAO, Y.; CONG, L.; ZHOU, P.; LI, J. Effects of prolonging administration gonadotropin on unexpectedly poor ovarian responders undergoing in vitro fertilization. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.8, p.26, 2010.

WOHLRES-VIANA, S.; PEREIRA, M.M.; VIANA, J.H.M.; MACHADO, M.A.; CAMARGO, L.S.A. Comparison of gene expression in *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced in vivo or in vitro. **Livestock Science**, v.140, p.62-67, 2011.

YADAV, M.C.; WALTON, J.S.; LESLIE, K.E. Timing of the onset and duration of ovulation in superovulated beef heifers. **Theriogenology**, v.26, p.509-521, 1986.

ZHANG, F.P.; KERO, J.; HUHTANIEMI, I. The unique exon 10 of the human luteinizing hormone receptor is necessary for expression of the receptor protein at the plasma membrane in the human luteinizing hormone receptor, but deleterious when inserted into the human follicle-stimulating hormone receptor. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.142, p.165-174, 1998.

CONCLUSÕES GERAIS

- A sequência do gene *LHR* em bovinos leiteiros apresenta uma alta frequência de polimorfismos e múltiplas isoformas;
- A divergência do folículo dominante em um menor diâmetro em *Bos indicus* não está relacionada à produção antecipada de estradiol, mas sim a um pico de expressão de LHR neste período;
- Mudanças sequenciais na expressão das isoformas de *LHR* ao longo do desenvolvimento folicular regulam a função do LHR durante da divergência folicular em bovinos;
- Estimulação hormonal exógena afeta a expressão do *LHR* em animais com perfis distintos de resposta a protocolos de superovulação (boa e má resposta).

ANEXO I - Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Gado de Leite



PARECER

PROTOCOLO CEUA-CNPGL Nº: 02/2011	Data de entrada: 24/02/2011 Data sessão: 02/03/2011
---	--

TÍTULO: Estabelecimento de modelos de referência in vivo para o desenvolvimento de sistemas de maturação oocitária in vitro

PESQUISADOR (A) RESPONSÁVEL: João Henrique Moreira Viana

CONSIDERAÇÕES APROVADAS PELO PLENÁRIO:		
A CEUA/CNPGL aprova os procedimentos adotados para o uso de animais do referido projeto.		
RETORNAR AO PESQUISADOR	SIM ()	NÃO (X)
CONCLUSÃO: APROVADO (X) COM PENDÊNCIA () NÃO APROVADO ()		
Nome e Assinatura do Presidente/Secretário da CEUA-CNPGL:		
<hr style="border: 0; border-top: 1px solid black;"/>		



RESOLUÇÃO DA COMISSÃO

Protocolo nº: 03/2013

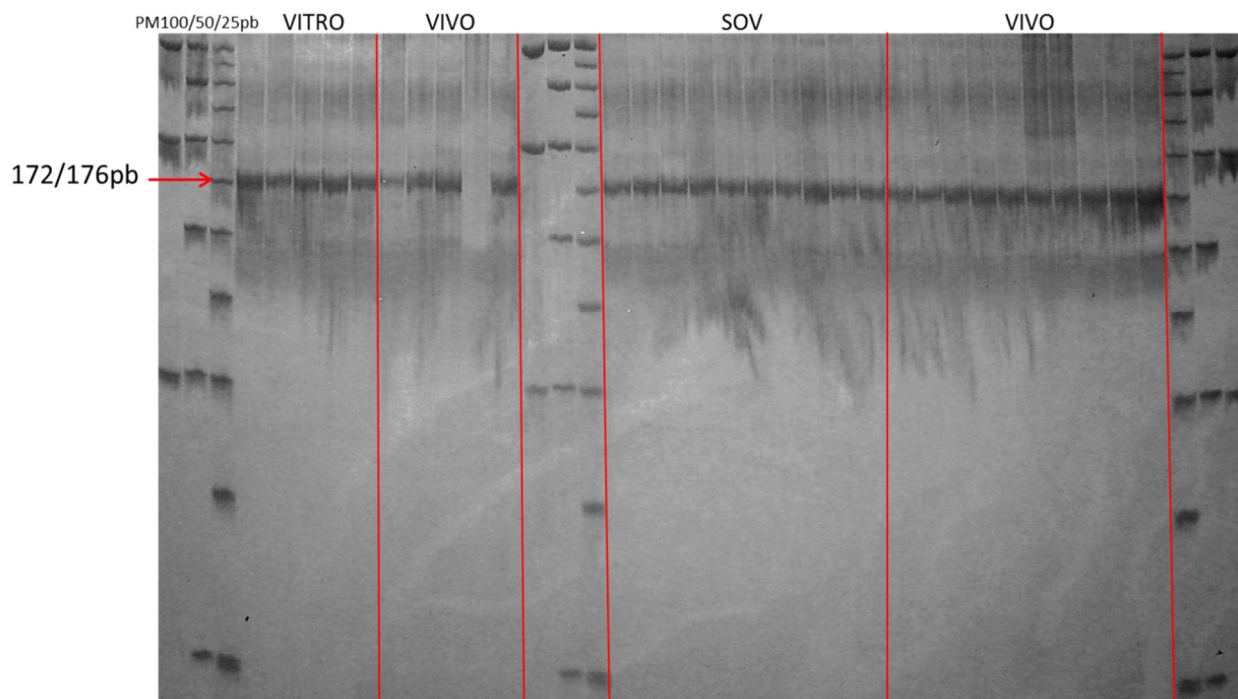
A Comissão de Ética No Uso de Animais da Embrapa Gado de Leite **APROVOU** os procedimentos éticos apresentados neste Protocolo, referente ao projeto/experimento:

“Estrutura do transcrito e ocorrência de splicing alternativo no receptor de hormônio luteinizante em vacas Gir com diferentes perfis de resposta a superovulação”.

Presidente/Secretário da CEUA-EGL

ANEXO II - Resultados de RFLP (imagens de gel de poliacrilamida 8%)

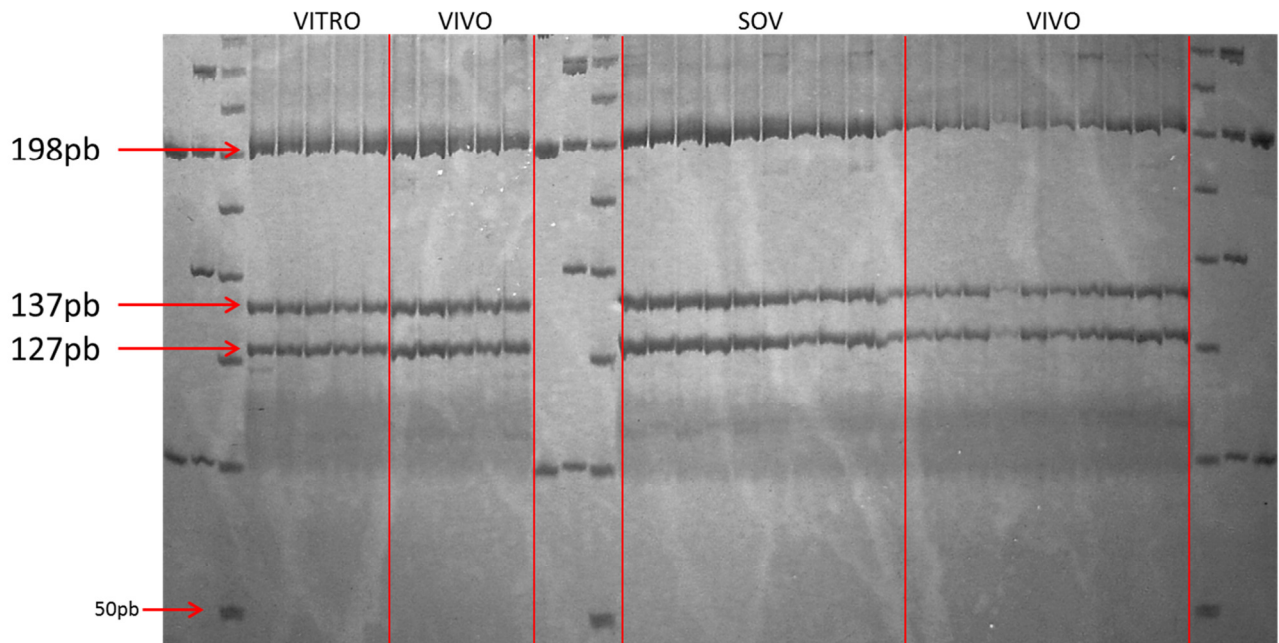
1.1. LHR1 + HindIII

Teste para *splicing* dos éxons 2 e 3

- Presença de bandas de 172 e 176 pb, que marcam a digestão do fragmento com ausência de *splicing* alternativo dos éxons 2 e 3, que deveriam gerar bandas diferenciais de 276 e 92 pares de base, respectivamente.

1.2. LHR2 + AluI

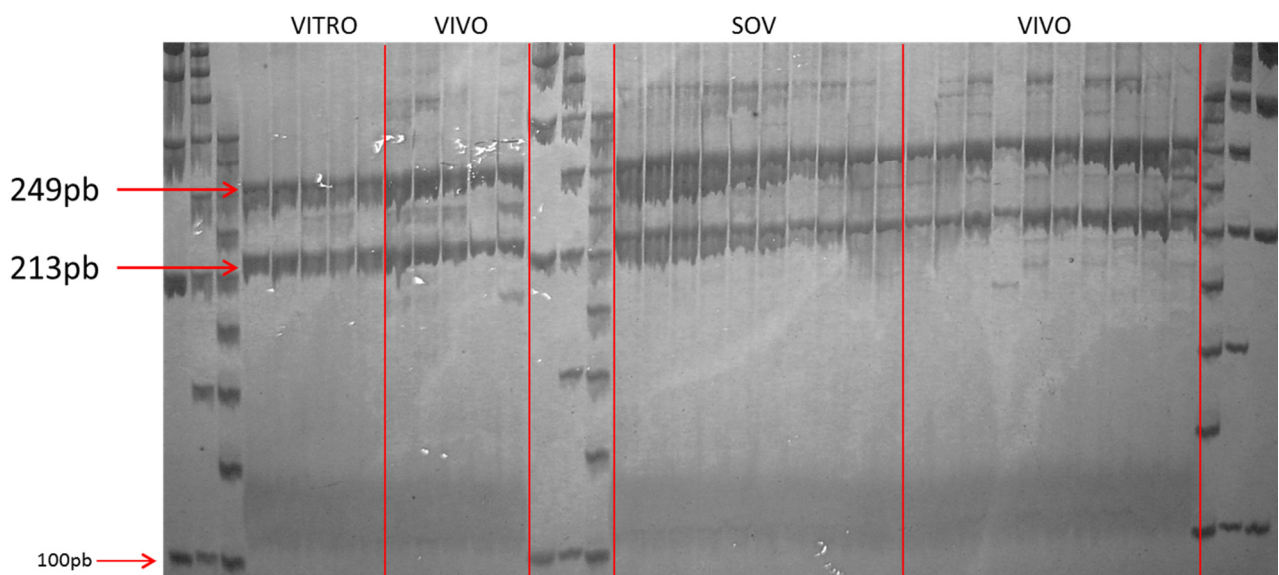
Teste para *splicing* dos éxons 4, 5 e 8



- Ausência de bandas de 250 e 260 pb, que marcariam o *splicing* alternativo dos éxons 8 e 5, respectivamente;
- Ausência de banda de 62 pb que marcaria o *splicing* alternativo do éxon 4

1.3. LHR2 + HinfI

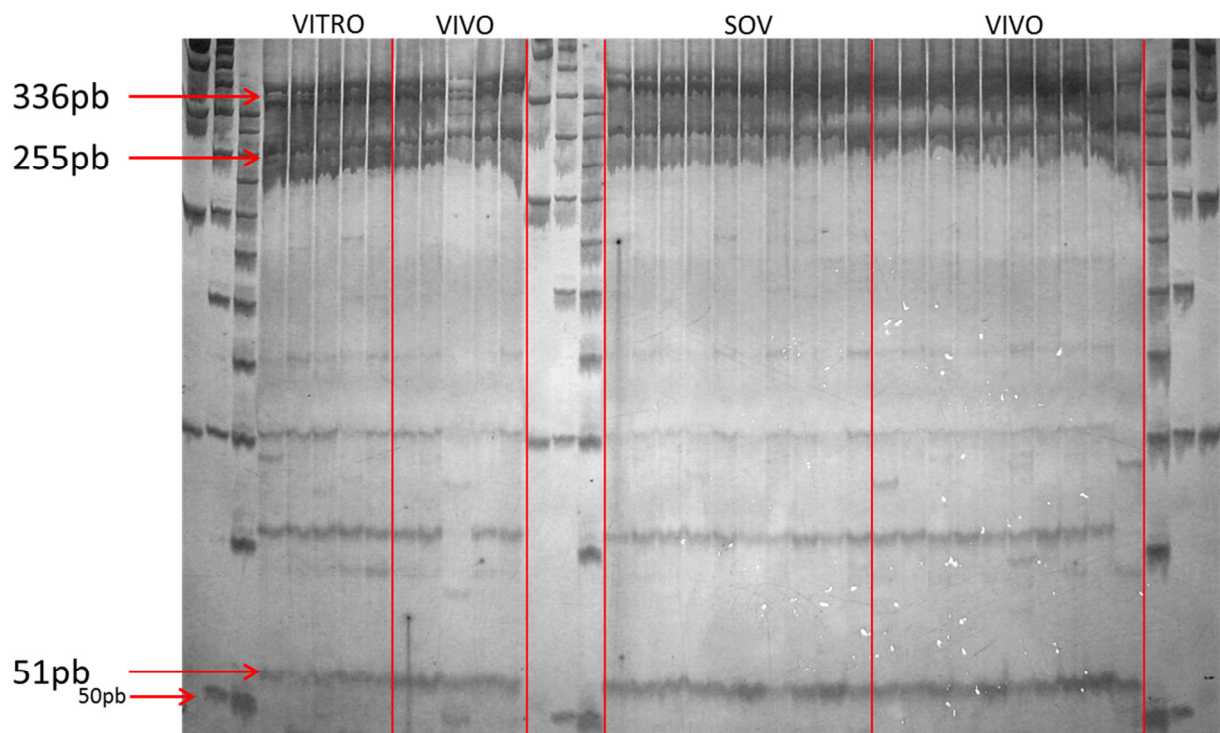
Teste para *splicing* dos éxons 6 e 7. Confirmatório para *splicing* dos éxons 4, 5 e 8.



- Ausência de bandas de 138 e 144, que marcariam o *splicing* alternativo dos éxons 8 e 7, respectivamente;
- Ausência de banda de 174 pb que marcaria o *splicing* alternativo dos éxons 4 e 5, respectivamente;
- Ausência de banda de 334 pb que marcaria o *splicing* alternativo do éxon 6.

1.4. LHR3 + MspI

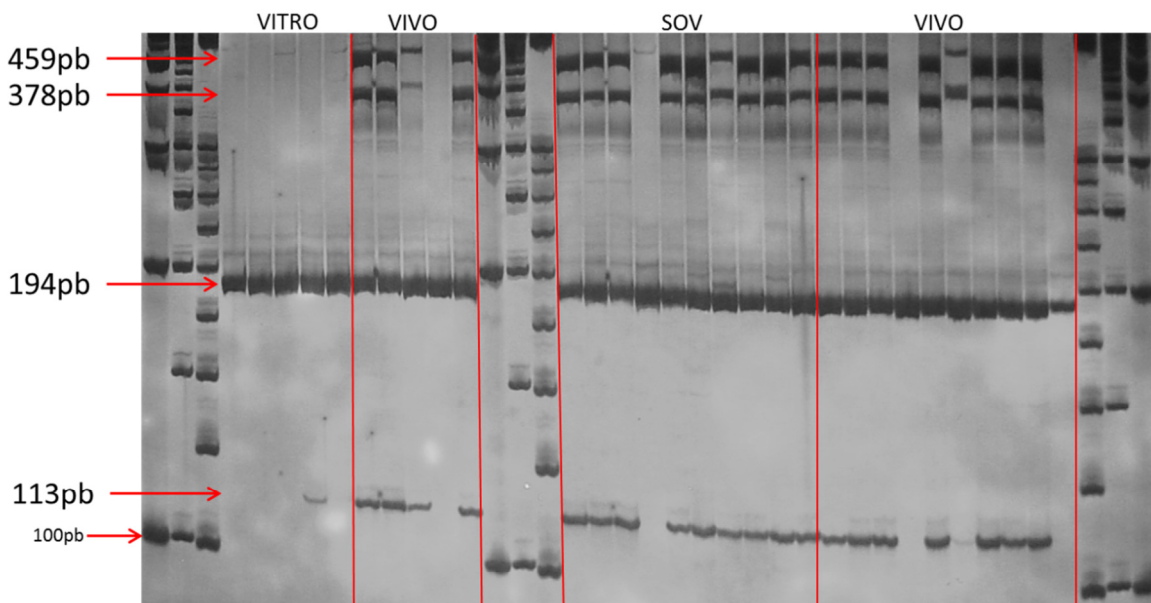
Teste para *splicing* dos éxons 9 e 10



- Presença de bandas de 255 pb, que marca o *splicing* alternativo do éxon 10;
- Ausência de banda de 150 pb que marcaria o *splicing* alternativo do éxon 9.

1.5. LHR4

Teste para *splicing* dos éxons 10, 10+11 e 11



- Presença de bandas de 378, 194 e 113 pb, que marcam o *splicing* alternativo dos éxons 10, 10+parcial do 11 e parcial do 11, respectivamente;
- Para as amostras de cultivo, somente o *splicing* alternativo do éxon 10 foi observado.

ANEXO III - PROTOCOLOS

1 - EXTRAÇÃO DE RNA (RNEASY MICRO KIT – QIAGEN)

Pontos importantes:

- O tampão RLT pode precipitar quando estocado. Se necessário redissolver aquecendo, e então deixar a temperatura ambiente.
- O tampão RLT e RW1 contêm sal de guanidina e, portanto não são compatíveis com agentes desinfetantes contendo água sanitária (não adicionar, altamente reativo). Tomar cuidado e utilizar luvas.
- Todos os passos do protocolo, incluindo a centrifugação, devem ser realizados a temperatura ambiente. Durante o procedimento trabalhar rápido.

Antes de começar:

- Ao utilizar o kit pela primeira vez, preparar o etanol 80%, misturando 24mL de etanol (96-100%) e 6mL de água RNase-free (presente no kit).
- Adicionar 10 μ L β -Mercaptoetanol (β -ME) a 1 mL do tampão RLT (após a adição é estável por um mês a temperatura ambiente). Tubo 1,5 mL.
- Adicionar 4 volumes de etanol (96-100%) como indicado no frasco do tampão RPE.
- Preparar a solução estoque de DNase1 utilizando DNase livre de RNase pela primeira vez. Dissolver a DNase1 sólida em Água RNase-free (550 μ L). Tomar cuidado para não perder DNase1 quando abrir o vial. Misturar gentilmente invertendo o tubo. **Não vortexar!**
- Adicionar 5 μ L de poly-A dissolvido em 34 μ L de RLT (tubo 0,2mL) misturando por pipetagem. Utilizar 6 μ L desta mistura para misturar com 54 μ L de RLT (tubo 0,2mL). A concentração final é de 4 ng/ μ L. Utilizar 5 μ L por amostra.

Procedimento:

- Lisar as células pela adição de 350 μ L de RLT (c/ β -ME) no criotubo. Vortexar ou pipetar por +/- 1 min para homogeneizar.

- quando processar um número > 5000 células, adicionar 20ng de RNA carreador (5 μ L de uma solução de 4ng/ μ L - poly-A) ao lisado antes de homogeneizar.

- Adicionar 1 volume de etanol 70% (350 μ L) ao lisado homogeneizado, e misturar bem pipetando. **Não centrifugar!**
- Transferir a amostra, incluindo qualquer precipitado que possa ter se formado, para uma *MinElute Spin Column* em um tubo de coleta 2mL. Fechar o tudo com cuidado, e centrifugar por 15s a $\geq 8000 \times g$ (≥ 10000 rpm). Descartar o conteúdo do tubo de coleta.
- Recoloque o *SpinColumn* no tubo de coleta e adicione 350 μ L de RW1. Centrifugar por 15s a $\geq 8000 \times g$ (≥ 10000 rpm) para lavar a coluna. Descartar o conteúdo do tubo de coleta.
- Adicionar 10 μ L de DNase 1 estoque (stock) a 70 μ L de RDD (tubo 0,2mL). Misturar pipetando gentilmente invertendo o tubo (DNase é sensível a desnaturação física). **Não vortexar!**
- Pipetar o mix de incubação DNase1 (80 μ L) diretamente sobre uma membrana de sílica-gel *MinElute*, e coloque no tubo de coleta. Deixe em temperatura ambiente por 15 min.

- Adicionar 350 μ L de RW1 na *SpinColumn*, e centrifugar por 15s a $\geq 8000 \times g$ (≥ 10000 rpm) para lavar a coluna. Descartar o conteúdo e o tubo de coleta.
- Transferir a *SpinColumn* para um novo tubo de coleta (2mL). Adicionar 500 μ L de RPE à coluna. Centrifugar por 15s a $\geq 8000 \times g$ (≥ 10000 rpm) para lavar a coluna. Descartar o conteúdo do tubo de coleta.
- Adicionar 500 μ L de etanol 80% à *SpinColumn*. Feche o tubo gentilmente e centrifugue por 2 min a $\geq 8000 \times g$ (≥ 10000 rpm) para secar a membrana de sílica-gel. Descartar o conteúdo e o tubo de coleta.
- Transferir a *SpinColumn* para um novo tubo de coleta (2mL). Abrir a tampa da *SpinColumn*, e centrifugar por 5min na maior velocidade. Descartar o conteúdo e o tubo de coleta. (secar a membrana).
- Para eluição, transferir a *SpinColumn* para um novo tubo de coleta (1,5mL). Pipetar 14 μ L de água RNase-free diretamente no centro da membrana de sílica-gel. Fechar o tubo gentilmente, e centrifugar por 1 min na velocidade máxima para eluir. O volume final deve ser de 13 μ L.

2 - TRANSCRIÇÃO REVERSA (SuperScript[™] III First-Strand Synthesis SuperMix-Invitrogen)

Observações:

- Manter todo o material em gelo;
- Após o preparo da mistura de anelamento, transferi-la para o termociclador pré-aquecido (65°C);

Procedimento:

- Misturar e centrifugar rapidamente cada um dos componentes antes de utilizar. Pré-aquecer o termociclador a 65°C;
- Preparar a seguinte mistura em um tubo de 0,2 mL (PCR) no gelo.

<i>Mix de Reação 1 (para cada reação)</i>	
Primer (oligodT)	1 µL
Annealing buffer	1 µL
RNA total (até 5 µg)	4 µl (~ 0,28 µg de RNA)
Água RNase/DNase free	2 µL
Volume final: 8 µL (20 µL = +/- 4 tubos de reação)	

- Incubar em termociclador a 65°C por 5 min, e então colocar imediatamente em gelo por pelo menos 1 min. Centrifugar rapidamente;
- Adicionar ao tubo no gelo:

<i>Mix de Reação 2 (para cada reação)</i>	
2X first-strand Reaction Mix	10 µL
SuperScript [™] III/RNaseOUT [™] Enzyme Mix	2 µL
Volume final: 20 µL	

- Misturar o tubo gentilmente (pipetando) e centrifugar rapidamente;
- Incubar a 50°C por 50 min; e terminar a reação a 85°C por 5 min, e então colocar em gelo;
- Estocar a -20°C até a utilização.

3 - EXTRAÇÃO DE DNA (modificado de Sambrook *et al.*, 2001)

Procedimento:

- Coletar 2 tubos vacutainer (4,5 mL com EDTA) de sangue, por via endovenosa. Homogeneizar devagar e armazenar em geladeira até o uso.
- Retirar 500 µL de leucócitos cuidadosamente, utilizando uma ponteira de 1000 µL com a ponta cortada, e transferir para um tubo eppendorf de 2,0 mL.
- Adicionar 1 mL de **Tampão de Lise**, agitar levemente no vórtex por 25 seg.
- Centrifugar a 14.000 rpm por 15 seg.
- Descartar o sobrenadante.
- Adicionar 1 mL de **Tampão de Lise**, homogeneizar utilizando uma ponteira de 1000 µL, até dissolver o *pellet*.
- Repetir os passos 4 e 5. Repetir este processo por mais duas vezes ou até obter um *pellet* bem claro.
- Adicionar 850 µL de **Tampão de Extração de DNA com RNase** e 16 µL de **DTT 10%** dissolvendo o *pellet* com a pipeta (gentilmente).
- Incubar a 37°C por 2 horas, agitando o tubo de 30 em 30 min.
- Adicionar 20 µL de **Proteinase K** (10 mg/mL) e incubar a 50°C *overnight*.
- Preparar 2 tubos de 1,5 mL e 1 tubo de 2,0 mL para cada amostra para as próximas etapas, sendo que o tubo de 2,0 mL será utilizado na etapa final.
- Acrescentar 300 µL de **Fenol** e 300 µL de **Clorofórmio:Isoamil (24:1)** a cada amostra.
- Vortexar por 1 min até ficar leitoso.
- Centrifugar a 14.000 rpm por 5 min.
- Transferir a fase aquosa (DNA) para um novo tubo.
- Acrescentar 600 µL **Clorofórmio:Isoamil (24:1)** a cada amostra.
- Vortexar por 1min até ficar leitoso.
- Centrifugar a 14.000 rpm por 5 min.
- Transferir a fase aquosa (DNA) para um novo tubo.
- Acrescentar 800 µL **Clorofórmio:Isoamil (24:1)** a cada amostra.
- Vortexar por 2 min até ficar leitoso.
- Centrifugar a 14.000 rpm por 5 min.
- Transferir a fase aquosa (DNA) para um novo tubo.
- Adicionar 80 µL de **Acetato de Sódio (NaOAc 3 M)** e misturar levemente.
- Adicionar 600 µL de **Isopropanol** -20°C e inverter o tubo até precipitar o DNA.
- Deixar as amostras à -20°C por 2 horas.
- Centrifugar a 14.000 rpm por 10 min.
- Descartar o sobrenadante com cuidado para não soltar o *pellet*.
- Adicionar 400 µL de **Etanol 70%**.
- Centrifugar a 14.000 rpm por 1 min.
- Descartar o sobrenadante com cuidado para não soltar o *pellet*.
- Secar o *pellet* a temperatura ambiente por 30 min.
- Ressuspender o *pellet* em 500 µL de **TE**.
- Deixar na geladeira *overnight* para dissolver o *pellet*, logo após agitar levemente com a pipeta. Armazenar a -20°C até quantificar.
- Quantificar o DNA em espectrofotômetro e depois armazenar a -20°C até o uso.

4 - PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO DE DNA A PARTIR DE GEL DE AGAROSE (GFX PCR DNA and GEL Band Purification Kit – GE Healthcare)

Pontos importantes:

- Verificar se 100 mL (no kit de 100 reações) ou 250 mL (no kit de 250 reações) de etanol absoluto foi adicionado ao *Wash Buffer type 1*.
- Utilizar o *Elution Buffer type 6* para eluir amostras que serão utilizadas para sequenciamento. → Na verdade este “tampão” é **água nuclease-free estéril**.
- O kit recupera aproximadamente 80% dos fragmentos a partir do gel de agarose quando o gel cortado for de ~300mg.
- Separar uma lâmina nova (estilete) para cortar o gel.

Procedimento:

- **Captura da amostra:**

- Pesar um tubo de 1,5 mL Dnase-free e anotar o valor;
- Utilizando uma lâmina, luz ultravioleta e o mínimo de tempo de exposição, cortar a banda com o fragmento de interesse do gel de agarose no menor tamanho possível. Colocar no tubo de 1,5 mL previamente pesado;

- o ideal é que o fragmento obtido não seja maior que 300 mg, para que se realize uma única lavagem no filtro.

- Pesar o tubo de 1,5 mL com o gel contendo o fragmento de interesse e calcular o peso do recuperado;
- Adicionar 10 µL do *Capture Buffer type 3* para cada 10 mg do gel recuperado;
-

*Ex: peso inicial do tubo – 1,03g
 peso final – 1,52g
 recuperado – 0,49g (ou 490 mg)
 adicionar 490 µL de Capture Buffer type 3*

** Sempre adicionar no mínimo 300µL do Capture Buffer, mesmo que o peso do recuperado indique um valor menor!*

- Misturar por inversão e incubar a 60°C por 15-30 min até que a agarose tenha dissolvido completamente. Misturar por inversão a cada 3 minutos;
- Uma vez que a agarose tenha se dissolvido completamente, verificar a cor da mistura (gel+DNA+Tampão) para, se necessário, corrigir o pH;

- Se a cor da mistura for rosa escuro ou vermelho, adicionar um pequeno volume (~10µL) de acetato de sódio a 3M com pH 5.0 para corrigir. Assegurar que a cor voltou a ser amarelo pálido ou laranja antes de colocar a mistura na coluna.

- Para cada purificação utilizar uma *GFX MicroSpin Column* em um *Collection Tube*.

- **Ligação da amostra:**

- Centrifugar a mistura da amostra com o *Capture Buffer* rapidamente para coletar o líquido no fundo do tubo;

- Transferir até 800µL da mistura da amostra com o *Capture Buffer* para o centro da coluna já encaixado no tubo de coleta;
- Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto;
- Centrifugar a 16000xg por 30s;
- Descartar o líquido do tubo e recolocar a coluna no lugar;
- Repetir o procedimento caso o volume inicial seja maior que 800µL.

- Lavar e Secar:

- Adicionar 500µL de *Wash Buffer type 1* na coluna;
- Centrifugar a 16000xg por 30s;

- *Se necessário (contaminação) repetir a lavagem e a centrifugação, porém a quantidade de DNA pode ser reduzida em ~4%.*

- Descartar o Collection Tube e transferir a coluna para um tubo DNase-free de 1,5 mL novo;

- Eluição:

- Adicionar 10-50µL do *Elution Buffer type 6* no centro da membrana;

- *50µL fornece uma recuperação ótima.*

- Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto;
- Centrifugar a 16000xg por 1 minuto para eluir o DNA;
- Armazenar a -20°C.

ANEXO IV – RESUMOS

1. RESUMO PUBLICADO: Resumos do 58º Congresso Brasileiro de Genética, p.63, 2012.

IDENTIFICATION OF SNPS IN THE LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR TRANSCRIPT OF GYR (*BOS INDICUS*) GRANULOSA CELLS

Wohlres-Viana, S¹; Bernardo, KB²; Cunha, ACLM³; Reis, DRL²; Arashiro, EKN⁴;
Machado, MA^{1,2}; Viana, JHM²

¹Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Juiz de Fora, MG; ²Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG; ³Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora, CESJF, Juiz de Fora, MG;

⁴Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, MG.

Keywords: Bovine, Folliculogenesis, Point mutations, LHR, Transcript.

The final steps of follicular development and ovulation are LH dependent. Variations in the LH receptor (LHR) structure could be related to failures or deficient outcomes observed in cows undergoing reproductive protocols, especially in Zebu breeds. Gyr breed is mostly used to produce crossbreed dairy herds in Brazil and it is known to produce a low number of embryos after superovulation, regardless presenting a high number of follicles per follicular wave. The aim of this study was to identify variations in the mRNA of the LHR in mural granulosa cells recovered from dominant follicles of fertile Gyr cows. Cells from four previously selected cows were collected in vivo, washed in saline solution and kept in RNA Later (Ambion). RNA extraction were performed with “RNeasy Micro Kit” (Qiagen) and quantified by nano-spectrophotometry. Complementary DNA (cDNA) was produced using “SuperScript III kit” (Life Technologies). Nine primer sets were designed based on the *Bos taurus* sequence available in GenBank (NM_174381.1) and used in conventional PCR covering the whole transcript extension (2,106 base pairs). PCR products were purified using the “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare) prior to DNA sequencing reactions. Sequence chromatograms were obtained using MegaBACE 1000 DNA sequencer and sequences were analyzed using “DNA Baser software” (<http://www.dnabaser.com>). So far, nine SNP's were detected, from which six showed heterozygosity, two were found exclusively in one animal, and one was constant in all four animals. This last SNP, present in all animals, was the only one that did not change the amino acid sequence after translation. The remaining polymorphisms can be related to hormone-receptor binding sites leading to a variety of reproductive responses. We will continue to evaluate a larger number of animals to try to elucidate which alterations are consistent for the Gyr breed and if they are associated to specific reproductive traits.

Financial Support: Embrapa, CNPq and FAPEMIG.

2. RESUMO PUBLICADO: Reproduction, Fertility and Development, v. 24. p. 175, 2012.

FOLLICULAR FLUID AND GRANULOSA CELL RECOVERY FROM BOVINE FOLLICLES OF DIFFERENT DIAMETERS USING AN ADAPTED TRANSVAGINAL-GUIDED FOLLICULAR ASPIRATION SYSTEM

E. K. N. Arashiro^{A,B}, S. Wohlres-Viana^{A,C}, M. P. Palhão^D, N. A. Rabelo^A, L. S. A. Camargo^A, L. G. B. Siqueira^A, C. A. S. Paim^A, and J. H. M. Viana^A

^AEmbrapa Dairy Cattle Research Center, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil; ^BFederal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; ^CFederal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil; ^DUniversity Jose do Rosario Vellano, Alfenas, Minas Gerais, Brazil

Most studies of granulosa cell (GC) function have been performed *in vitro*, using follicular fluid (FF) and GC recovered from slaughterhouse ovaries. This approach does not consider the reproductive status and follicular developmental stage of the donor, limiting data interpretation and usefulness. The aim of this study was to evaluate the efficiency of an adapted ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration (TVFA) procedure to recover FF and mural GC from live cows. A preliminary *in vitro* trial was performed to calculate fluid losses using a conventional TVFA circuit. A known volume of PBS, expected to be the volume of FF in follicles ranging from 4 to 12mm in diameter, was aspirated using a 20G needle connected to a Teflon circuit 80 cm long, with a 1.0-mm internal diameter, connected to a 1.5-mL tube. Losses of the expected volume of FF were 12.7±1.1, 19.9±2.5, 54.4±4.0, 87.6±4.3 and 100%, for follicles of 12, 10, 8, 6 and 4mm in diameter (0.90, 0.52, 0.27, 0.11 and 0.03 mL, respectively). When an adapted system for small-volume recoveries was used, there was a decrease ($P<0.05$) in fluid losses for follicles of 8, 6 and 4 mm. An experiment was performed *in vivo*, using the adapted system, to evaluate FF and GC recovery from follicles of 4 and 5 ($n=16$), 6 ($n=19$), 7 ($n=7$), 8 ($n=13$), 9 ($n=15$), 10 ($n=24$), 11 ($n=11$), 12 ($n=15$), 13 ($n=13$), 14 ($n=6$) and 16 ($n=9$)mm in diameter. Follicular wave emergence was synchronized with 2 mg of oestradiol benzoate and an intravaginal progesterone device and follicles that reached the desired diameter were aspirated using an ultrasound machine equipped with a 7.5-MHz probe and disposable 20G needle. The recovered FF volume was measured and centrifuged at 600 X g for 10 min. The GC pellet was vortexed with 0.1% hyaluronidase (5 min) and washed twice in PBS and the number of cells was determined using a Neubauer chamber. Ribonucleic acid was extracted using an RNAeasy Microkit and quantified in NanoDrop. The efficiency of FF recovery was estimated by the difference between the recovered and expected volumes for each follicle diameter ($4/3\pi r^3$), which were compared by ANOVA. From all the follicles aspirated, the recovery of FF and GC was not successful in 2 (1.3%). Overall, FF recovery efficiency was 84.7%. The recovered volume ranged from 0.03 to 3.80mL and increased with follicular diameter ($y=0.011x^2-0.012x+0.043$; $R^2=0.99$). Losses of FF were significant ($P<0.05$) for follicles larger than 12 mm. The mean (\pm s.e.m.) number of mural GC recovered was 716,708±68,536, providing 6.8±0.7 samples of 100 000 cells with 14.8±0.7 ng of RNA μL^{-1} for each punctured follicle. A high coefficient of variation (57.4%) was observed in cell recovery. There was no difference in the number of cells recovered from follicles of different diameters, but sample contamination with blood was more frequent (75%) in follicles larger than 10 mm. In conclusion, an adapted TVFA system can be used successfully on an individual basis and from follicles of different diameters for *in vivo* recovery of FF and GC for further endocrine and gene expression analyses. *This research was supported by CNPq and Fapemig (CVZ APQ 02863/09).*

3. RESUMO PUBLICADO: *Reproduction, Fertility and Development*, v. 26, p.176, 2013.

IDENTIFICATION OF LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR ISOFORMS DURING FOLLICLE DEVELOPMENT IN CATTLE

S. Wohlres-Viana^{A,B}, E. K. N. Arashiro^{A,C}, L. S. A. Camargo^A, C. A. C. Fernandes^C, M. A. Machado^A, and J. H. M. Viana^{A,C}

^AEmbrapa, Juiz de Fora, MG, Brazil; ^BUniversidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil; ^CUniversidade Jose do Rosario Vellano, Alfenas, MG, Brazil

The expression of the LH receptor (LHR) is required for the transition from FSH to LH-dependence during the establishment of follicular dominance in cattle. The aim of this study was to identify LHR isoforms expressed before, during, and after follicle deviation, using as models dairy breeds with different dominant follicle sizes at deviation. Mural granulosa cells (GC) were collected using an adapted ultrasound-guided follicular aspiration system (Arashiro *et al.* 2012 *Reprod. Fertil. Dev.* 24, 175) from follicles of 6, 8, 10, or 12mm in diameter of Holstein (*Bos taurus*), and of 4, 6, 8, or 10mm of Gir (*Bos indicus*) heifers. The recovered follicular fluid was centrifuged and the cells were washed with NaCl 0.9% saline and kept in RNA Later (Ambion). Total RNA extraction was performed from GC using a commercial RNeasy Micro Kit (Qiagen), quantified in a spectrophotometer (Nanodrop), and reverse transcribed using the commercial Superscript III kit (Invitrogen). The generated cDNA were PCR amplified using a specific primer for the LHR and designed to detect a region of known occurrence of isoforms. The samples were previously tested for theca cell contamination using a primer to detect the CYP17A1 gene, and those showing contamination were excluded. Results of PCR were analyzed by electrophoresis in 5% native acrylamide gel. The frequency of occurrence of the different isoforms was compared by the chi-squared test. In Holstein, the full-length form of the LHR mRNA (459 bp) was detected in all samples. The isoform with total deletion of exon 10 and partial of exon 11 (isoform II; 113 bp) was observed in 4 of 6 follicles of 6mm and in 4 of 5 follicles of 8 mm. The isoform with total deletion of exon 10 (isoform III; 378 bp) was observed in 4 of 6 follicles of 6 mm, and in all follicles of 8mm (5/5). The isoform with partial deletion of exon 11 (isoform IV; 194 bp) was observed in 4 of 6 follicles of 6mm and in 4 of 5 follicles of 8 mm. These 3 alternative isoforms were present in all follicles of 10mm (4/4) and 12mm (11/11). There was no difference ($P>0.05$) in the frequency of occurrence of the different isoforms. In Gir, the expression of LHR was less regular, no isoform was present in all samples, and no follicle size class showed all isoforms. The full-length LHR mRNA was detected in 2 of 7 follicles of 4 mm, 6 of 9 follicles of 6 mm, 2 of 6 follicles of 8mm and in all follicles of 10mm (6/6). The isoform II was observed in 3 of 7 follicles of 4 mm, 3 of 9 follicles of 6 mm, 2 of 6 follicles of 8 mm, and in all (6/6) follicles of 10 mm. The isoform III was observed in 6 of 7 follicles of 4 mm, 7 of 9 follicles of 6 mm, and in all follicles of 8mm (6/6) and 10mm (6/6). The isoform IV was observed in 5 of 7 follicles of 4 mm, 6 of 9 follicles of 6 mm, 5 of 6 follicles of 8 mm, and in 5 of 6 follicles of 10 mm. In the Gir breed, the isoform with deletion of exon 10 was the most frequent one ($P<0.01$). More than one isoform was observed in most samples. In conclusion, 1) LHR is expressed in GC before follicle deviation, and 2) the expression of LHR isoforms is affected by follicle diameter and breed.

The authors acknowledge support from CNPq 477701 and Fapemig PPM 0067/11.

4. RESUMO PUBLICADO: Animal Reproduction, v. 10 (3), p. 546, 2013.

CHARACTERIZATION OF INDIVIDUAL DIFFERENCES IN THE EFFICIENCY OF SUPEROVULATION IN THE GYR BREED

T.P. Minare¹, E.K.N. Arashiro², **S. Wohlfres-Viana**³, L.G.B. Siqueira², M.P. Palhão¹, C.E.C. Cordeiro², C.A.C. Fernandes¹, J.H.M. Viana²

¹Universidade de Alfenas, Alfenas, MG, Brasil; ²EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil; ³Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil.

Keywords: follicular growth, FSH, zebu.

Most of the previous studies aiming to improve superovulation evaluated only differences in the number of corpora lutea (CL) observed and of embryos recovered. Therefore, differences in total follicular population before hormonal stimulation and in response parameters associated to follicle growth were frequently neglected, causing bias in the conclusion. The aim of the present study was to characterize individual variation in both relative and absolute efficiency of superovulation, based on ovarian follicular population. Non-lactating Gyr breed cows (n=2) and heifers (n=15), kept under the same management, were used. Follicle growth was synchronized (D0) using an intravaginal progesterone device and an injection of estradiol benzoate. Superovulations started on D5 with the injection of 200 UI FSHp, following a conventional protocol. The number and diameter of the follicles present before (D4) and during superovulation (D5 to D8), as well as the number of CL at flushing (D16), were evaluated by ultrasonography. Follicular population was ranked according to size (≤ 4 mm, 5-7 mm, ≥ 8 mm), and changes in the percentage of follicles in each size class were used to calculate relative efficiency. The absolute efficiency was determined by the ratio number of embryos recovered: number of follicles ≤ 4 mm on D5. Results are shown as mean \pm SEM. As expected, there was a great individual variation in the superovulation outcomes, both considering the number of CL (0 to 28, mean 12.6 \pm 2.1; CV=68.2%) and embryos collected (0 to 15, mean 5.1 \pm 1.1; CV=92.4%). There was no increase ($P > 0.05$) in total follicular population during treatment, and the correlation between the number of follicles during superovulation and the further number of CL or embryos remained relatively constant between D5 and D8 ($r = 0.56$ to 0.65 and $r = 0.70$ to 0.79 , respectively; $P < 0.01$). FSH treatment induced a progressive ($P < 0.05$) but partial mobilization of small follicles to larger size classes. The relative efficiency of the follicle growth stimulation was 41.9 \pm 5.5% (0 to 75.6%), and this was the endpoint with the largest correlation ($R = 0.80$; $P < 0.0001$) with the absolute efficiency of the process (12.2 \pm 2.1%, ranging from 0.0 to 25.0%). Retrospective analysis demonstrated that donors with relative efficiency $> 50\%$ had a number of follicles ≤ 4 mm on D1 similar to those with efficiency $< 50\%$ (41.6 \pm 6.8 vs 42.1 \pm 3.1; $P < 0.001$), but produced more CL and embryos (17.8 \pm 2.5 and 7.6 \pm 1.7 vs 6.9 \pm 2.1 and 2.4 \pm 0.9; respectively, $P < 0.001$). In conclusion, individual differences in follicular population and in the follicle response to FSH are important sources of variation in superovulation results, and shall be taken into account for experimental design.

Acknowledgments: FAPEMIG, CAPES, Biotran LTDA.

5. RESUMO PUBLICADO: Animal Reproduction, v.10 (3), p.425, 2013.

LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR GENE EXPRESSION DURING FOLLICULAR DIVERGENCE IN *B. TAURUS* VSB. *INDICUS* DAIRY BREEDS

S. Wohlres-Viana¹, E.K.N. Arashiro², A.P. Sudré³, L.G.B. Siqueira², M.P. Palhão⁴, L.S.A. Camargo², C.A.C. Fernandes⁴, M.A. Machado², J.H.M. Viana²

¹UFJF, Juiz de Fora, MG, Brasil; ²EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil;

³UFF, Niterói, RJ, Brasil; ⁴UNIFENAS, Alfenas, MG, Brasil.

Keywords: follicular dominance, follicular dynamic, steroidogenesis.

The establishment of follicular dominance is a key phenomenon to determine the specie-specific ovulation rate, and involves the transition from FSH to LH-dependence by the dominant follicle. This physiological event occurs at different moments in *B. taurus* and *B. indicus* cattle. Previous studies of our group analyzed the relationship between the diameter at deviation and the progression of the intrafollicular steroidogenesis in dairy breeds (Arashiro et al., *Reprod Fertil Dev* 25:235, 2013). The objective of the current study was to evaluate the expression of the LH receptor (LHR) gene during follicular deviation in two dairy breeds. Mural granulosa cells (GC) were recovered from Holstein (*B. taurus*; n=10) and Gir (*B. indicus*; n=10) heifers, as described before (Arashiro et al., *Reprod Fertil Dev* 24:175, 2012). GC were collected by ultrasound-guided follicular aspiration of follicles at 6, 8, 10, and 12 mm in diameter from Holstein heifers, and 4, 6, 8 and 10 mm from Gir heifers. The recovered follicular fluid was centrifuged and the cells were washed with NaCl 0.9% saline and kept in RNA Later (Ambion, Austin, TX, USA). Total RNA extraction was performed using the RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany), quantified in spectrophotometer (Nanodrop), and cDNA was synthesized using the Superscript III kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The obtained cDNA underwent real-time PCR, using LHR specific primers in a region without occurrence of isoforms and thus producing a single fragment, a primer pair for the CYP17A1 gene as a marker of thecal cell contamination, and a primer pair for the GAPDH gene as an endogenous control. Samples with thecal cell contamination were discarded. Results were analyzed by the software REST© and are presented as mean±SEM. In both breeds, LHR expression was identified in follicles of all size categories. The expression of LHR in 4 and 6 mm follicles (for Gir and Holstein, respectively) was used as a reference value (=1). A peak in LHR expression (11.0±5.8 and 10.7±8.0 -fold the reference value) was observed in 10 mm (Holstein) and 8 mm (Gir) follicles, i.e., diameters only reached after deviation in these breeds (8.6±0.4 and 6.3±0.2; Holstein and Gir, respectively). The increase in LHR expression occurred in parallel to the previously described increase in intrafollicular estradiol concentrations at this same interval of follicular growth (Arashiro et al., 2013). Results of the present study demonstrate that LHR gene is expressed even in follicles smaller than the expected diameter at deviation in both *Bos taurus* and *Bos indicus* females. Also, relative LHR expression increases during the establishment of dominance, consistently with the progression of steroidogenesis. Further studies will evaluate whether and in which proportion LHR isoforms are present in these follicles.

Acknowledgements: CNPq Project 477701/2011-6, CAPES and Fapemig PPM 0067/11.

6. RESUMO PUBLICADO: Resumos do 59^o Congresso Brasileiro de Genética, 2013.

POINT MUTATIONS IN THE LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR MRNA OF HOLSTEIN (*BOS TAURUS*) GRANULOSA CELLS – PARTIAL RESULTS

Wohlres-Viana, S¹; Fernandes, LE³; Reis, DRL²; Arashiro, EKN²; Machado, MA^{1,2}; Viana, JHM².

¹Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Juiz de Fora, MG; ²Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG; ³Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora, CESJF, Juiz de Fora, MG

Keywords: Bovine, Folliculogenesis, SNP

The final steps of follicular development and ovulation are LH dependent. Variations in the LH receptor (LHR) structure could be related to failures or deficient outcomes observed in cows undergoing reproductive protocols. The aim of this study was to identify variations in the mRNA of the LHR in mural granulosa cells recovered from dominant follicles of fertile Holstein cows. Cells from four previously selected cows were collected in vivo, washed in saline solution and kept in RNA Later (Ambion). RNA extraction were performed with “RNeasy Micro Kit” (Qiagen) and quantified by nano-spectrophotometry. Complementary DNA (cDNA) was produced using “SuperScript III kit” (Life Technologies). Nine primer sets were designed based on the *Bos taurus* sequence available in GenBank (NM_174381.1) and used in conventional PCR covering the whole transcript extension (2,106 base pairs). PCR products were purified using the “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare) prior to DNA sequencing reactions. Sequence chromatograms were obtained using MegaBACE 1000 DNA sequencer and sequences were analyzed using “DNA Baser software” (<http://www.dnabaser.com>). So far, eight SNP’s were detected, from which five were found exclusively in one animal each, and three was constant in all four animals. With only one exception, all polymorphisms change amino acid sequence after translation. These polymorphisms can be related to hormone-receptor binding sites leading to a variety of reproductive responses. So far, the results of the present study suggest that SNPs in the LHR are also present among *Bos Taurus* breeds, and might be related to the selection for milk production.

Financial Support: Embrapa, CNPq and FAPEMIG

7. RESUMO PUBLICADO: Reproduction, Fertility and Development, v. 25, p. 234-235, 2013.

P450 AROMATASE GENE EXPRESSION, ESTRADIOL PRODUCTION, AND DOMINANT FOLLICLE DEVIATION IN BOS TAURUS AND BOS INDICUS DAIRY HEIFERS

E. K. N. Arashiro^{A,B}, S. Wohlfres-Viana^{A,C}, M. P. Palhao^D, L. S. A. Camargo^A, M. Henry^B, and J. H. M. Viana^A

^AEmbrapa, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil; ^BFederal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; ^CFederal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil; ^DUniversity Jose do Rosario Vellano, Alfenas, Minas Gerais, Brazil

It is well documented that the size of the dominant follicle at deviation is smaller in *Bos indicus* compared with in *Bos taurus* breeds. The physiological mechanisms underlying this difference, however, are unknown. The aim of the present study was to evaluate the dynamic of oestradiol production during follicle development close to the expected moment of deviation in *Bos taurus* and *Bos indicus* dairy heifers. Intrafollicular concentration of oestradiol (E2) and P450 aromatase gene expression in granulosa cells (GC) were evaluated in Gir ($n=10$) and Holstein ($n=10$) heifers. Follicular waves were synchronized with an intravaginal progesterone device (1 g, Sincrogest, Ourofino Agropecuária, São Paulo, Brazil) and benzoate oestradiol (2 mg im, Sincrodiol, Ourofino Agropecuária). Ultrasonography evaluations (MyLab30 Vet Gold, Esaote, Genova, Italy, with a 7.5-MHz transducer) were performed every 24 h to detect the emergence of the new follicular waves. The largest follicle of each wave was individually aspirated by ovum pickup before, at the expected diameter, or after deviation in both Gir (4.6±0.2, 6.3±0.2, and 8.5±0.6 mm, respectively) and Holstein heifers (6.0±0.5, 8.6±0.4, and 10.2±0.2 mm, respectively), as previously described (Arashiro *et al.* 2012 Reprod. Fertil. Dev. 24, 175). Follicular fluid (FF) samples were centrifuged and the supernatant stored at -20°C until E2 and progesterone (P4) determination by RIA. The pellet of GCs was washed twice with PBS, kept in RNA later, and frozen at -20°C until RNA extraction and reverse transcription. Relative transcript quantification was performed by real-time PCR. The b-actin gene was used as control. Samples of FF with E2:P4 ratio, 1 or presenting contamination by theca cells (detected by the expression of 17 α -hydroxylase) were not used for statistical analyses. Concentration of E2 in FF was evaluated between breeds and among follicle size classes by ANOVA and differences among means compared by Student *t*-test or Tukey's test, respectively. Within breeds, relative gene expression was accessed by pair-wise fixed reallocation randomization test (software REST®). Results are shown as mean±SEM. In both breeds, concentration of E2 in FF progressively increased with follicular diameter ($P<0.05$). Intrafollicular concentration of E2 (ng mL⁻¹) was greater ($P<0.05$) in Holstein than in Gir before (58.5±11.7 v. 8.8±2.0), at expected (226.0±49.9 v. 78.9±21.0), and after follicle deviation (579.1±45.0 v. 185.0±34.9). Interestingly, however, follicles with similar diameters (~6 or 8 mm) showed similar ($P>0.05$) E2 concentrations between Holstein and Gir. Moreover, in both breeds, the relative expression of P450 aromatase gene in GC first increased (3.9±2.4 and 67.5±52.8 for Holstein and Gir, respectively; $P<0.05$) at the same stage of follicular development (8 mm). The present results suggest that the smaller size of follicles at deviation in *Bos indicus* is not related to an earlier increase in intrafollicular E2 production.

Financial support: CNPq, CAPES, and Fapemig (CVZ APQ 02863/09).

8. RESUMO PUBLICADO: Plant and Animal Genome Conference XXII, p. 224, 2014.

EXPRESSION OF LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR ISOFORMS IN MURAL GRANULOSA CELLS DERIVED FROM GIR CATTLE

Marco Antonio Machado¹, **Sabine Wohlres-Viana**², Eduardo K N Arashiro¹, Joao Gabriel V Grazia² and Joao Henrique M Viana¹

(1) Embrapa Dairy Cattle Research Center, Juiz de Fora - MG, Brazil, (2) Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil

LH receptor (LHR) isoforms can be a fine regulatory mechanism of its function. This study aimed to evaluate the LHR isoforms expression during follicular development in Gir cattle using Real Time PCR. Mural granulosa cells (GC) were recovered from nine heifers by ultrasound-guided aspiration of 4, 6, 8 and 10 mm follicles. Samples were centrifuged and cells washed and kept in RNA Later. The splicing of exon 10 (S10), splicing of exon 10 and adjacent partial splicing of exon 11 (S10+11), and partial splicing of exon 11 (S11) were evaluated. Total RNA was extracted and cDNA was synthesized using commercial Kits. The beta-actin gene was used as endogenous control, and results were analysed using REST software. Expression values are shown as mean±SEM. Expression data from 4 mm follicles were used as reference and its value was fixed as 1.00. All isoforms showed a decrease in the relative expression of 8 mm follicles (8.9±14.2; 10.6±17.1 and 0.01±0.02 for S10, S10+11 and S11, respectively), when compared to 6 mm follicles (31.2±52.3; 64.9±108.0 and 2.4±3.9) and 10 mm follicles (289.0±492.0; 51.5±91.1 and 56.9±96.3; respectively). Decreased expression of isoforms occurred during the expected moment of follicle deviation in Gir breed, when the transition from FSH to LH dependence takes place. Previous results of our group also demonstrated a peak in the LHR expression in 8 mm follicles GC. Altogether, these results suggest a possible role of isoforms in the fine regulation of LHR function during follicle deviation in cattle.

Financial support: Embrapa, CNPq, CAPES and Fapemig

9. RESUMO PUBLICADO: Animal Reproduction, v.11 (3), p.428, 2014.

GENE EXPRESSION IN CO-CULTURED GRANULOSA CELLS FROM TAURINE AND ZEBU CATTLE WITH HIGH OR LOW RATES OF IN VITRO EMBRYO PRODUCTION

J.G.V Grázia¹, S. Wohlfres-Viana¹, R.M.G. Garcia¹, M.A. Machado², L.S.A. Camargo²,
J.H.M. Viana²

¹UFJF, Juiz de Fora, MG, Brasil; ²EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil.

In vitro embryo production (IVEP) is characterized by a large variation of results among donors. The absolute efficiency of IVEP is directly related to the variation in the production of cumulus-oocyte complexes (COC), as evidenced in the comparison between donors taurine and zebu breeds (Viana et al., Acta Sci Vet 39(1):409, 2011). However, individual differences in embryo production rates are more complex and difficult to predict. The aim of this study was to evaluate the potential of the gene expression analysis of granulosa cells in co-culture as an indirect and noninvasive approach to explain IVEP results. Granulosa cells (GC) co-cultured with oocytes collected from Gir (*Bos indicus*) and Holstein (*Bos taurus*) donors were recovered and evaluated. The cell samples were allocated into groups according to breed (Gir or Holstein) and to blastocyst production rate (high: >50%, low: <20%), including at last six donors per group. The GC were recovered on the seventh day of culture and stored at -80 °C with RNA later, RNA extraction and cDNA synthesis were performed using a commercial kit, RNeasy Micro Kit (Qiagen, Germany) and SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix (Invitrogen, USA), respectively. The relative quantification of cDNA was performed by Real-Time PCR using the commercial kit Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). The genes IGFR1, BAX, StAR, INHA, LHR and PRDX1 were evaluated using β -actin gene as an endogenous control. The results were analyzed by ANOVA and differences between groups were compared by Tukey's test. Results are presented as mean \pm SEM. There was an interaction between breed and blastocyst production rate for the PRDX1 gene, which was over-expressed in the high production Holstein group (P<0.05). There was no difference (P>0.05) between expression values of other genes among groups. The PRDX1 gene is normally expressed in response to oxidative stress, and the results suggest a greater potential for adaptation to culture conditions for COC from Holstein donors with higher embryo production rates. The *in vitro* culture of GC, however, may have modulated other potential differences in the expression of other genes, limiting the use of the model proposed here.

10. RESUMO PUBLICADO: Animal Reproduction, v.11 (3), p.425, 2014.

LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR GENE EXPRESSION DURING FOLLICULAR DIVERGENCE IN *B. TAURUS* VSB. *INDICUS* DAIRY BREEDS

S. Wohlres-Viana¹, E.K.N. Arashiro², A.P. Sudré³, L.G.B. Siqueira², M.P. Palhão⁴, L.S.A. Camargo², C.A.C. Fernandes⁴, M.A. Machado², J.H.M. Viana²

¹UFJF, Juiz de Fora, MG, Brasil; ²EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil;

³UFF, Niterói, RJ, Brasil; ⁴UNIFENAS, Alfenas, MG, Brasil.

Keywords: follicular dominance, follicular dynamic, steroidogenesis.

The establishment of follicular dominance is a key phenomenon to determine the specie-specific ovulation rate, and involves the transition from FSH to LH-dependence by the dominant follicle. This physiological event occurs at different moments in *B. taurus* and *B. indicus* cattle. Previous studies of our group analyzed the relationship between the diameter at deviation and the progression of the intrafollicular steroidogenesis in dairy breeds (Arashiro et al., *Reprod Fertil Dev* 25:235, 2013). The objective of the current study was to evaluate the expression of the LH receptor (LHR) gene during follicular deviation in two dairy breeds. Mural granulosa cells (GC) were recovered from Holstein (*B. taurus*; n=10) and Gir (*B. indicus*; n=10) heifers, as described before (Arashiro et al., *Reprod Fertil Dev* 24:175, 2012). GC were collected by ultrasound-guided follicular aspiration of follicles at 6, 8, 10, and 12 mm in diameter from Holstein heifers, and 4, 6, 8 and 10 mm from Gir heifers. The recovered follicular fluid was centrifuged and the cells were washed with NaCl 0.9% saline and kept in RNA Later (Ambion, Austin, TX, USA). Total RNA extraction was performed using the RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany), quantified in spectrophotometer (Nanodrop), and cDNA was synthesized using the Superscript III kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The obtained cDNA underwent real-time PCR, using LHR specific primers in a region without occurrence of isoforms and thus producing a single fragment, a primer pair for the CYP17A1 gene as a marker of thecal cell contamination, and a primer pair for the GAPDH gene as an endogenous control. Samples with thecal cell contamination were discarded. Results were analyzed by the software REST© and are presented as mean±SEM. In both breeds, LHR expression was identified in follicles of all size categories. The expression of LHR in 4 and 6 mm follicles (for Gir and Holstein, respectively) was used as a reference value (=1). A peak in LHR expression (11.0±5.8 and 10.7±8.0 -fold the reference value) was observed in 10 mm (Holstein) and 8 mm (Gir) follicles, i.e., diameters only reached after deviation in these breeds (8.6±0.4 and 6.3±0.2; Holstein and Gir, respectively). The increase in LHR expression occurred in parallel to the previously described increase in intrafollicular estradiol concentrations at this same interval of follicular growth (Arashiro et al., 2013). Results of the present study demonstrate that LHR gene is expressed even in follicles smaller than the expected diameter at deviation in both *Bos taurus* and *Bos indicus* females. Also, relative LHR expression increases during the establishment of dominance, consistently with the progression of steroidogenesis. Further studies will evaluate whether and in which proportion LHR isoforms are present in these follicles.

Acknowledgements: CNPq Project 477701/2011-6, CAPES and Fapemig PPM 0067/11.

11. RESUMO PUBLICADO: *Reproduction, Fertility and Development*, v. 27(1), p.261-262, 2015.

COULD THE DIFFERENTIAL EXPRESSION OF LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR ISOFORMS EXPLAIN THE VARIABILITY IN SUPEROVULATORY RESPONSES IN CATTLE?

S. Wohlres-Viana^{A,B}, E. K. N. Arashiro^{A,C}, J.G.V. Grazia^{A,B}, L. S. A. Camargo^A, M. A. Machado^A, and J. H. M. Viana^A

^AEmbrapa, Juiz de Fora, MG, Brazil; ^BUniversidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil

Embryo production *in vivo* is highly variable among donors. The Gir breed (*Bos indicus*) is well known to show a low embryo production after superovulation (2.5 to 3.5 viable embryos per flush), and a high variance in superovulatory responses, which makes this breed an interesting model to study this trait. The aim of this study was to evaluate the expression pattern of LHR isoforms in Gir heifers previously characterised as good (10.3 ± 1.2 embryos/flush, $N = 5$) or poor (1.1 ± 0.3 embryos/flush, $N = 5$) responders to superovulation protocols. In both groups, an adapted ultrasound-guided follicular aspiration system (Arashiro *et al.* 2012 *Reprod. Fertil. Dev.* 24, 175) was used to collect granulosa cells (GC) from 8-mm follicles growing in either a synchronized but not stimulated follicular wave (FW) or in the fourth day of superovulation (SOV), induced with 200 UI of FSHp (Pluset, Serono). The recovered follicular fluid was centrifuged and the cells were washed with NaCl 0.9% saline and kept in RNA Later (Ambion, Austin, TX, USA). Total RNA extraction was performed using the commercial RNeasy Micro Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). The RNA samples were quantified and reverse transcribed using the commercial Superscript III kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Complementary DNA samples were amplified through real-time PCR, using a LH receptor primer – not selective for LHR isoforms (total LHR) – and 4 sets of isoform selective primers (S1, S10, S10+11, and S11). All samples were previously tested for theca cell contamination through detection of *CYP17A1* gene, and those showing contamination were excluded. The β -actin gene was used as endogenous control. Analyses were performed using the REST software and the expression values are shown as mean \pm s.e.m. For comparisons between good and poor responders, the first was set as 1.00. For comparisons between FW and SOV, FW was set as 1.00. In the good responder group, there was no difference ($P > 0.05$) in total LHR expression among GC samples from FW and SOV. However, the S10+11 isoform was down-regulated (0.4 ± 0.1 ; $P < 0.01$) after SOV. In the poor responders group, total LHR expression was down-regulated (0.2 ± 0.1 ; $P < 0.01$) after SOV, but there was no difference in the expression of isoforms ($P > 0.05$). Contrasting the response groups (good and poor), total LHR (15.1 ± 7.6 ; $P < 0.001$), and the isoforms S10 (5.7 ± 2.7 ; $P < 0.01$), S10+11 (1.9 ± 0.6 ; $P < 0.01$), and S11 (5.1 ± 2.5 ; $P < 0.01$) were up-regulated in FW of poor responders, but there was no difference ($P > 0.05$) in any LHR form during SOV. We concluded that 1) LHR expression is different between heifers characterised as good or poor responders to superovulation; 2) superovulation modulates the LHR expression and reduces the original differences observed in unstimulated cycles; 3) diminished expression of total LHR, but not in the isoforms, in poor responders heifers could suggest a reduction in the expression of full-length LHR, with possible consequences to ovulatory capability after superovulation.

Financial support was provided by CNPq Project 477701 and Fapemig PPM 0067/11.