



**INGRIS YOHANA HERNÁNDEZ MARTÍNEZ**

**FATORES ENDÓCRINOS E MOLECULARES ENVOLVIDOS  
NA DINÂMICA FOLICULAR DO FUTURO FOLÍCULO  
DOMINANTE DURANTE A INDUÇÃO DA LUTEÓLISE EM  
VACAS DA RAÇA NELORE**

**LAVRAS – MG**

**2017**

**INGRIS YOHANA HERNÁNDEZ MARTÍNEZ**

**FATORES ENDÓCRINOS E MOLECULARES ENVOLVIDOS NA DINÂMICA  
FOLICULAR DO FUTURO FOLÍCULO DOMINANTE DURANTE A INDUÇÃO DA  
LUTEÓLISE EM VACAS DA RAÇA NELORE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. José Nélio de Sousa Sales

Orientador

**LAVRAS – MG**

**2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA,  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Martínez, Ingris Yohana Hernández.

Fatores endócrinos e moleculares envolvidos na dinâmica folicular do futuro folículo dominante durante a indução da luteólise em vacas da raça nelore / Ingris Yohana Hernández Martínez . - 2017.

53 p.

Orientador: José Nélio de Sousa Sales.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Corpo lúteo. 2. Divergência folicular. 3. Folículo dominante. I. Sales, José Nélio de Sousa. II. Título.

**INGRIS YOHANA HERNÁNDEZ MARTÍNEZ**

**FATORES ENDÓCRINOS E MOLECULARES ENVOLVIDOS NA DINÂMICA  
FOLICULAR DO FUTURO FOLÍCULO DOMINANTE DURANTE A INDUÇÃO DA  
LUTEÓLISE EM VACAS DA RAÇA NELORE**

***ENDOCRINE AND MOLECULAR FACTORS INVOLVED IN THE FOLLICULAR  
DYNAMICS OF THE FUTURE DOMINANT FOLLICLE DURING THE INDUCTION  
OF LUTEOLYSIS IN NELLORE COWS***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 06 de Março de 2017.

Prof. Dr. Pedro Augusto Carvalho Pereira	FAA
Prof. Dr. José Camisão de Souza	UFLA
Profa. Dra. Elaine Maria Seles Dorneles	UFLA

Prof. Dr. José Nélio de Sousa Sales  
Orientador

**LAVRAS – MG**

**2017**

*Aos meus pais. Em especial a Francisco Antônio Hernández, homem de caráter inquestionável e que soube, desde minha infância, dedicar-me seu tempo, meu grande amor, meu herói, quem me ensinou que nesta vida nada é de graça, tudo tem seu sacrifício...*

*Esta é mais uma vitória nossa! Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por ter me proporcionado uma vida maravilhosa! Sou eternamente grata a ELE por me proporcionar condição e força para alcançar meus objetivos, pela constante proteção e, principalmente, pela presença nos momentos de solidão.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Ciências Veterinárias, pela oportunidade oferecida.

Ao meu orientador José Nélio de Sousa Sales, por deixar-me fazer parte de sua equipe, sinto-me honrada por ter sido sua orientada, por todos os ensinamentos, pela paciência, exemplo de dedicação ao trabalho e integridade científica. Impossível expressar toda minha admiração.

A toda equipe do laboratório, pela ajuda na execução desse trabalho, o qual sem vocês não teria sido feito, em especial Ana Paula Castro pela paciência na redação de minha discussão, sei que foi difícil lidar com meu “portunho”.

À Samuel Oliveira, que cedeu os animais e sua propriedade para execução do experimento. Serei eternamente grata!

Ao Prof. Dr. Mario Binelli do Departamento de Reprodução Animal (VRA) – USP – Pirassununga, pela utilização das instalações do Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular para a realização do trabalho molecular e por seu bom humor contagiante.

À minha amiga e tutora no RT-PCR, Angela Gonella Diaza, obrigada pelo ajuda, muita paciência, orientação e dedicação ao ensinar cada passo, além da estadia em Pirassununga.

Aos meus pais, Francisco e Emilsida, por acreditarem em mim e me apoiarem nas decisões. Aos melhores presentes que eles puderam me dar meus irmãos Alexis, Edna, Yineth, Leidy e, em especial, a Jhon Francisco, que não está mais presente, mas ficará sempre em nosso coração. Obrigada, por todo apoio, incentivo e por entenderem a minha ausência em muitos momentos importantes e em muitas datas especiais. Saibam que, mesmo estando distantes, vocês são tudo para mim.

Aos meus sobrinhos, Juan Francisco, Isabella e Santhiago pela alegria, carinho e amor que proporcionam a mim e a toda nossa família. Titia ama muito vocês.

A minha família aqui em Lavras Julio e Lilo, pelos momentos vividos, e, principalmente, por me escolherem para ser dinda de Thomás. É um orgulho e privilégio criar um laço eterno com vocês diante de Deus.

Aos amigos da UFLA que fiz no período do mestrado, Imara, Acsa, Henrique, Carla, e Dany. Obrigada, por todo apoio, companheirismo e, principalmente, por estarem sempre presentes nos momentos mais difíceis, sempre acreditando em mim, incentivando-me e convencendo-me a nunca desistir.

Aos amigos que Deus enviou aqui no Brasil Aracy, Cris, David, Barbara, e Patrícia, que são meus anjos disfarçados de seres humanos. Sempre prontos a aconselhar-me, ajudar-me e a acalmar-me. Às vezes na vida convivemos com pessoas especiais e nem percebemos, eu percebi e nunca mais largarei, levo-os em meu coração para onde quer que eu vá.

Aos meus amigos que estão a milhares de kms Maira A, Heber, Robinson, Doris, German Ordoñez, Primo Jaime, as chivias e Clarissa S, por se doar tanto por mim e sempre estar ao meu lado. Todos vocês fazem muita falta! Sinto-me honrada de ter amigos tão especiais como vocês.

E a todas as demais pessoas aqui não citadas, mas que, de alguma forma, contribuiriam para que este trabalho fosse concluído.

Muito Obrigada!

## RESUMO GERAL

A divergência folicular é um momento importante da seleção folicular, onde, pela primeira vez, nota-se uma diferença significativa na taxa de crescimento entre os dois primeiros folículos. Além disso, a divergência folicular pode ser influenciada pela presença do corpo lúteo e sua relação com o folículo dominante, de acordo com sua localização ipsilateral ou contralateral e pela concentração de progesterona. Dessa forma, é importante avaliar as alterações endócrinas e moleculares referentes a fatores locais no ovário que interferem no processo de dominância folicular, sobre tudo na subespécie *Bos indicus*. Assim, objetivou-se, com este estudo avaliar o perfil de crescimento do futuro folículo dominante (FD) e sua relação com o folículo subordinado (FS) e fatores intraovarianos que interferem na divergência folicular durante a indução da luteólise em vacas Nelore.

**Palavras-chave:** Corpo lúteo. Divergência folicular. Folículo dominante. Progesterona. Luteólise.

## ABSTRACT

Follicular divergence is an important moment in follicular selection, when, for the first time, a significant difference is noted in the growth rate of the first two follicles. In addition, follicular divergence can be influenced by the presence of the *corpus luteum* and its relation to the dominant follicle, according to its ipsilateral or contralateral location and by concentration of progesterone. Thus, it is important to evaluate the endocrine and molecular changes regarding the local factors of the ovary that interfere in the process of follicular dominance, over everything in the *Bos indicus* species. Therefore, the objective of this study was to evaluate the growth profile of the future dominant follicle (DF) and its relation to the subordinate follicle (SF) and intra-ovary factors that interfere in follicular divergence during the induction of luteolysis in Nellore cows.

**Keywords:** *Corpus luteum*, follicular divergence, dominant follicle, progesterone, luteolysis.

## LISTA DE FIGURAS

### SEGUNDA PARTE – ARTIGO

- Figura 1. Diagrama do protocolo experimental: No D0 ao D8 - protocolo de sincronização da ovulação. No D11 - provável ovulação. No D18 – (US) início da avaliação ultrassonográfica a cada 12 horas. Na -12 e -36 horas - divisão do grupo de estudo antes do desvio (AD) e depois do desvio (DD) com folículo de 5,5 mm e coleta de sangue de 12/12 horas. Na 0 hora – administração de 500mg de PGF<sub>2</sub>α. Nas 72 e 96 horas – aspiração do folículo dominante (OUP- FD) para coleta de líquido folicular..... 50
- Figura 2. Modelo matemático utilizado para quantificação relativa dos genes ..... 50
- Figura 3. Diferentes padrões individuais de crescimento folicular observado por ultrassonografia durante a segunda onda folicular em vacas *Bos indicus* que receberam prostaglandina antes ou depois do desvio folicular. A) FD de 6,5 mm em crescimento contínuo acima de 0,5 mm por dia após administração de PGF e o FS entrou em atresia. B) FD de 8,2 mm em crescimento contínuo acima de 0,5 mm por dia após administração de PGF o FS, que também estava em crescimento, entrou em atresia às 36 horas. C) FD e FS (6,2 e 6,1 mm) em crescimento após administração PGF, logo na hora 60 apresentaram inversão de dominância folicular, em que o FS tornou-se dominante. D) FD de 8,7 mm em crescimento na hora 0 após administração da prostaglandina seu crescimento foi abaixo de 0,5 mm, mas não perdeu sua dominância..... 51
- Figura 4. Concentração de progesterona (A) e diâmetro do corpo lúteo (B) em vacas *Bos indicus* que receberam prostaglandina antes e depois do desvio folicular. .... 52
- Figura 5. Abundância relativa dos genes média ( $\pm$ EPM) relacionados os grupo antes do desvio (AD) e depois do desvio (DD) obtidas após amplificação por PCR em tempo real. Foi utilizado como calibrador o grupo AD. .... 53

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Volumes ( $\mu\text{L}$ ) para preparação da curva padrão de cDNA obtido a partir das células das granulosa do folículo dominante de vacas Nelore. .... 49
- Tabela 2. Dinâmica folicular de vacas *Bos indicus* com presença de CL que receberam prostaglandina antes ou depois do desvio folicular. .... 49
- Tabela 3. Dados apresentados em (%) sobre a relação entre FD – CL, FD - FS e FD e primeira onda folicular (ipsilateral ou contralateral), no momento da administração da  $\text{PGF}_2\alpha$ . .... 49

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Sequência dos primers específicos, temperaturas de pareamento, tamanho dos produtos e fonte de acesso às sequências no <i>GenBank</i> ou referências.....	53
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

AD	Antes do Desvio
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico Complementar
CL	Corpo Lúteo
Ct	Cycle Threshold
DD	Depois do desvio
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNase	Enzima que degrada o ácido desoxirribonucléico
DMPBS	Tampão Fosfato Salino Modificado por Dulbecco
E2	Estradiol
EDTA	Ácido Etileno Dinitrilo Tetracético
EPM	Erro Padrão da Média
FD	Folículo Dominante
FS	Folículo Subordinado
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GAPDH	Gliceraldeído 3-Fostato Desidrogenase
IGF	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
IGF1	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo 1
IGF1R	Receptor do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo 1
IGFBP	Proteína Específica de Ligação ao Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
OFs	Ondas Foliculares
OPU	Aspiração Folicular
LH	Hormônio Luteinizante
LHr	Receptor do Hormônio Luteinizante
OPU	Aspiração folicular
OPUFD	Aspiração Folicular do Folículo Dominante
PBS	Tampão de Fosfato e Salina
P4	Progesterona
PAPPA	Proteína Sérica A associada a prenhez
PPIA	Ciclofilina
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
PGF2 $\alpha$	Prostaglandina F2 $\alpha$

PM	Peso Molecular
qPCR	Reação da Polimerase em Cadeia quantitativa
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAm	Ácido Ribonucléico mensageiro
RNase	Enzima que degrada o Ácido Ribonucléico
RIA	Radioimunoensaio
RPM	Rotações por minuto
TA	Temperatura ambiente
UI	Unidade Internacional
US	Ultrassonográfica

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou Menos
mL	Microlitro
A	"Antisense"
D	Dia
G	Força G
h	Hora
mg	Miligramma
mL	Mililitro
mm	Milímetro
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
°C	Grau Celsius
P	Probabilidade
S	"Sense"

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	17
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	19
<b>2.1</b>	<b>Controle endócrino do ciclo estral</b> .....	19
<b>2.2</b>	<b>Desenvolvimento folicular e seleção do folículo dominante ..</b> .....	19
<b>2.3</b>	<b>Fatores endócrinos e moleculares envolvidos na divergência folicular</b> .....	21
<b>2.3.1</b>	<b>Hormônio Folículo Estimulante (FSH)</b> .....	22
<b>2.3.2</b>	<b>Estradiol (E2)</b> .....	23
<b>2.3.3</b>	<b>Hormônio Luteinizante (LH)</b> .....	24
<b>2.3.4</b>	<b>Inibina e Ativina</b> .....	25
<b>2.3.5</b>	<b>Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF)</b> .....	26
<b>2.3.6</b>	<b>Prostaglandina (PGF)</b> .....	27
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	28
	<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGO</b> .....	34
	<b>ARTIGO 1 – FATORES ENDÓCRINOS E MOLECULARES ENVOLVIDOS NA DINÂMICA FOLICULAR DO FUTURO FOLÍCULO DOMINANTE DURANTE A INDUÇÃO DA LUTEÓLISE EM VACAS DA RAÇA NELORE</b> .....	34

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

A divergência folicular é o início da diferença significativa nas taxas de crescimento do futuro folículo dominante e o maior folículo subordinado (GINTHER et al., 1996, 2001a), associada com eventos endócrinos e celulares (SARTORI et al., 2001).

Experimentos sobre o desenvolvimento folicular são realizados principalmente em fêmeas de genótipo taurino, cujos trabalhos têm por objetivo o estudo da divergência folicular e mecanismos celulares (GINTHER et al., 1996, 2001b, 2015; GOODMAN; HOGGEN, 1983; LUO et al., 2011), sendo escassos os estudos desse processo em animais zebuínos (BASTOS, 2012; FIGUEIREDO et al., 1997; GIMENES et al., 2008; SARTORELLI et al., 2005).

Existem algumas teorias conhecidas para o processo da divergência folicular. Acredita-se que o desenvolvimento folicular esteja relacionado à angiogênese perifolicular e a atresia associada à regressão na vascularização folicular, confirmando que o suprimento sanguíneo favorece o desenvolvimento de determinados folículos (MATSUI et al., 2004). Há evidências de que o aumento do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) amplifica a resposta ao hormônio folículo estimulante (FSH) (FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004). O futuro folículo dominante obtém receptores para o hormônio luteinizante (LHr) nas células da granulosa (BAO et al., 1997; BODENSTEINER et al., 1996; LUO et al., 2011). Além disso, a divergência folicular pode ser influenciada pela presença do corpo lúteo (CL) e sua relação com o futuro folículo dominante (ipsilateral ou contralateral) (GINTHER et al., 2015) e pela concentração de progesterona (P4) (GINTHER et al., 2001b).

O número de ondas por ciclo está associado à duração do ciclo estral e da fase luteínica (BORGES et al., 2004; GINTHER; KNOPF; KASTELIC, 1989). O ciclo estral em animais de três ondas é normalmente maior do que nos animais que apresentaram duas ondas foliculares (SARTORI et al., 2004). No padrão de três ondas foliculares, o tamanho do FD da segunda onda é menor que o FD da primeira e da terceira onda (GINTHER; KNOPF; KASTELIC, 1989). A provável explicação para a diferença nos diâmetros foliculares seria a concentração plasmática da progesterona, demonstrando que a primeira onda folicular coincide com a baixa concentração de progesterona (CL em formação), havendo menor *feedback* negativo no hipotálamo para a liberação de GNRH. Durante o crescimento da segunda onda, o CL totalmente formado secreta maior quantidade de P4, suficiente para aumentar o *feedback* negativo no hipotálamo e o que reduz a liberação de LH na hipófise. A terceira onda de

crescimento folicular coincide com a redução da concentração de P4 em decorrência da luteólise (BORGES et al., 2004).

Dessa forma, é importante avaliar alterações endócrinas e moleculares referentes a fatores locais no ovário que interferem no processo de dominância folicular, sobretudo na subespécie *Bos indicus*.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Controle endócrino do ciclo estral**

O ciclo estral é definido como ritmo funcional dos órgãos femininos que se estabelece a partir da puberdade com duração de aproximadamente 21 dias, variando entre 18 e 24 dias e com estro, entre 12 a 24 horas (MIES FILHO, 1977). O ciclo estral é dividido em fases folicular (crescimento folicular final até ovulação) e luteínica (formação do CL até a luteólise) (DROS, 1995).

Os eventos endócrinos durante o ciclo estral são regulados pelo hipotálamo (secreção de GnRH), hipófise (liberação das gonadotrofinas, FSH e LH). Esses hormônios irão atuar nos ovários, promovendo a emergência, o crescimento, a divergência, a dominância folicular e a ovulação (DRIANCOURT, 2001).

### **2.2 Desenvolvimento folicular e seleção do folículo dominante**

Em 1960, iniciaram-se os estudos sobre a fisiologia ovariana. Nessa época, ainda não se conhecia o padrão de desenvolvimento folicular, mas existiam duas vertentes: uma de que os folículos se desenvolviam em duas ondas foliculares (OFs) (RAJAKOSKI, 1960) e outra de que o crescimento folicular era contínuo e independente das fases do ciclo estral (DONALDSON; HASENL, 1968). Essas teorias foram usadas por muitos anos, a partir dos quais foram realizados diversos estudos com resultados contraditórios sobre a natureza do crescimento folicular.

Pierson e Ginther (1984) foram os primeiros a utilizar a ultrassonografia em ovários bovinos, determinando a presença de OFs durante o ciclo estral. Cada onda folicular dura aproximadamente 10 dias (variação de 6 a 10 dias) (LUCY et al., 1992). Nas espécies monovulares, os ciclos estrais apresentam também duas OFs (GINTHER et al., 2001b), cuja maturação do folículo dominante (FD) coincide com a regressão do CL e, conseqüentemente, com a ovulação após a luteólise fisiológica (SIROIS; FORTUNE, 1988). Estudos realizados em novilhas da raça holandesa demonstraram a predominância de duas e três OFs (GINTHER et al., 1997). Contudo, em animais da raça Nelore foram descritas a presença de até quatro OFs por ciclo estral (FIGUEIREDO et al., 1997).

Cada onda de crescimento folicular, nos bovinos, envolve três fases: recrutamento, seleção e dominância. No início da onda, começa a fase de recrutamento em que um grupo de folículos é recrutado, exibindo crescimento simultâneo por três dias (GINTHER et al., 2003). A fase de seleção folicular ocorre quando o FD cresce em taxa contínua e os demais folículos

ou subordinados reduzem a taxa de crescimento e entram em atresia. Essa mudança da taxa de crescimento é conhecida como divergência (GINTHER et al., 1996), sendo a diferença de tamanho entre o folículo dominante e o primeiro folículo subordinado (FS), estabelecendo-se então a fase de dominância folicular (GINTHER et al., 1996; SIROIS; FORTUNE, 1998). Após a divergência, o FD torna-se anovulatório, em razão da presença de altos níveis de P4, que promove redução da frequência na pulsatilidade de LH. A partir desse momento, começa o processo de atresia e perda da dominância, dando início a uma nova onda folicular (GINTHER et al., 1996).

O termo divergência (ou desvio) é definido como o momento no qual existe uma diferença significativa nas taxas de crescimento entre os dois maiores folículos, sendo marcada pela continuidade no desenvolvimento do futuro FD e declínio ou parada de crescimento do segundo maior folículo (GINTHER et al., 1996).

Após avaliação retrospectiva dos folículos ao longo da dinâmica folicular, pôde-se observar que a primeira diferença de diâmetro ocorre em média 3 a 4 dias a partir do início da onda. Desde a emergência, o futuro FD possui maior diâmetro folicular (4,0 mm), sendo essa vantagem mantida até o momento da divergência, que ocorre por volta de 2,8 dias após a emergência da onda. Durante essa fase de desenvolvimento folicular, a taxa de crescimento é semelhante entre os dois maiores folículos. Porém, uma pequena diferença no diâmetro entre ambos os folículos seria suficiente para estabelecer a dominância pelo maior folículo, antes que o segundo maior folículo pudesse atingir o diâmetro similar (GINTHER et al., 1997). Dessa forma, acredita-se que exista uma vantagem significativa do diâmetro do futuro FD, que emerge de seis a sete horas antes do maior FS no momento da emergência folicular ( $4,2 \pm 0,8$  mm vs.  $3,6 \pm 0,1$  mm) (KULICK et al., 1999).

O mecanismo de desvio é ativado rapidamente quando o FD atinge o diâmetro (8,5 mm, *Bos taurus*) suficiente para bloquear a secreção de FSH na hipófise. O rápido estabelecimento do mecanismo de desvio bloqueia o crescimento do FS antes que o mesmo alcance diâmetro similar ao FD (GINTHER et al., 2003).

Em novilhas da raça holandesa (*Bos taurus*), o desvio folicular inicia-se por volta de 2,8 dias após a ovulação, quando o futuro FD atinge cerca de 8,5 mm e o segundo maior folículo atinge 7,2 mm (GINTHER et al., 1996, 2003).

Em relação aos animais *Bos indicus*, o momento da divergência folicular apresenta variação entre os estudos. Segundo Castilho (2003), o desvio folicular ocorre 3,5 dias depois da ovulação quando o maior folículo atinge 7,2 mm e o segundo maior 5,5 mm. Em outro

estudo, Sartorelli (2003) relata que o desvio ocorre 2,8 dias após a ovulação quando os FD e FS atingem 7,0 mm e 5,5 mm, respectivamente. Em outro estudo desses mesmos autores (SARTORELLI et al., 2005) verificaram que em novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*) a divergência folicular inicia-se 2,5 dias após ovulação quando os diâmetros do FD e FS atingem 5,7 mm e 5,5 mm, respectivamente. Em outros estudos, verificou-se que o desvio inicia-se 2,6 dias após a ovulação com o FD atingindo 7,5 mm e o FS 6,2 mm (CASTILHO et al., 2007; GIMENES et al., 2008). No entanto, Bastos (2012) demonstrou que, em vacas *Bos indicus* adultas não lactantes, o desvio inicia-se com diâmetro entre 6,1 e 8,2 mm.

Embora haja diferença do FD e FS entre *Bos taurus* e *Bos indicus* o momento da divergência durante a primeira onda folicular em relação à ovulação anterior em *Bos indicus* (2,3–2,8 dias) (GIMENES et al., 2008; SARTORELLI et al., 2005) foi similar ao relatado em *Bos taurus* (GINTHER et al., 1996, 2003).

Animais *Bos indicus* apresentam maior número de folículos pequenos nos ovários, menor tamanho máximo do FD e menor CL, quando comparados aos *Bos taurus* (BÓ; BARUSELLI; MARTINEZ, 2003; SARTORI et al., 2010). As vacas ou novilhas *Bos indicus*, embora ovulem folículos menores e com menor CL, apresentam maiores concentrações circulantes de estradiol (E2), insulina, P4 e IGF-1, em relação ao *Bos taurus* (SARTORI et al., 2010).

A seleção do FD capaz de ovular dentro de um grupo de folículos antrais é um processo dinâmico regulado por interações entre gonadotrofinas, fatores de crescimento e substâncias intraovarianas (AUSTIN et al., 2001), resultando em uma fase de transição crítica para o desenvolvimento folicular. A divergência folicular está associada a eventos endócrinos e celulares, como o decréscimo dos níveis de FSH, aumento das concentrações circulantes de 17 $\beta$ -estradiol, aumento de fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e aumento na expressão de receptor de LH nas células da granulosa (LHr) (SARTORI et al., 2001).

### **2.3 Fatores endócrinos e moleculares envolvidos na divergência folicular**

Alguns estudos sugerem a existência de fatores encontrados no líquido folicular, especialmente fatores de crescimento tais como: inibina, ativina, IGF e suas proteínas transportadoras que desempenham papel importante na regulação do crescimento, diferenciação e função folicular (IRELAND; ROCHE, 1982). A variação entre eles é que determina qual é o futuro FD em cada onda. O momento crucial para que ocorra a divergência folicular é quando ocorrem alterações na resposta às gonadotrofinas (GINTHER et al., 2003,

2004). Tal processo acontece quando o folículo atinge 8,0 mm em bovinos taurinos (GINTHER et al., 1999) e 7,5 mm em *Bos indicus* (GIMENES et al., 2008).

O aumento do LH no momento da divergência estimula os LHr nas células da teca do FD e, por meio da cascata de segundos mensageiros, aumenta a produção de andrógenos, estimulando o sistema IGF. As atividades autócrinas e parácrinas do E2 nas células da granulosa aumentam a atividade da enzima aromatase, aumentando a sensibilidade das gonadotrofinas e o efeito local na liberação de IGF-1 das proteínas ligantes (IGFBP). Acredita-se que o segundo maior folículo não consegue resistir às baixas concentrações de FSH, o que faz com que ele não seja capaz de assumir as características bioquímicas semelhantes ao FD (GINTHER et al., 2001c).

De outro modo, Fortune et al. (2001) relatam, de maneira diferente, o estabelecimento do desvio, em que estima-se que o primeiro fator determinante para o desvio é a indução de uma protease da proteína de ligação aos fatores de crescimento semelhantes (PPAP-A, Proteína sérica A associada a prenhez), seguida de aumento no IGF-1 livre, que estimula a taxa de crescimento folicular e produção de E2.

### **2.3.1 Hormônio Folículo Estimulante (FSH)**

O FSH está associado à emergência da onda de crescimento folicular, durante o ciclo estral (GINTHER et al., 1996). Em bovinos, as concentrações plasmáticas de FSH têm início 1 a 2 dias antes de cada onda folicular, quando o maior folículo possui 4,0 a 5,0 mm de diâmetro (GINTHER et al., 2000a) e o intervalo entre o início do declínio do FSH e o início da divergência é de, aproximadamente, 3 dias mais tarde durante o desvio folicular, no qual o FD continua a se desenvolver, em razão da mudança na dependência gonadotrófica primária de FSH para LH (WEBB et al., 1999).

No entanto, as concentrações de FSH são mantidas em níveis basais até que o FD perca dominância, resultando em novo aumento nos níveis de FSH e emergência da onda subsequente (BODENSTEINER et al., 1996). Os menores níveis de FSH em novilhas da raça Nelore ocorrem 24 horas antes do momento da divergência folicular (CASTILHO et al., 2007).

Alguns trabalhos realizados com FSH, no início do desenvolvimento folicular, demonstraram que qualquer folículo saudável ou em crescimento é capaz de se tornar dominante (ADAMS et al., 1993). Diante dessa informação, os protocolos de superovulação com FSH para a colheita de embriões foram desenvolvidos. Além disso, ao aspirar o FD após o desvio folicular, o FS torna-se o dominante mediante aumento de concentração de FSH

(GINTHER et al., 2000b). Do mesmo modo, é possível direcionar para a dominância, um folículo pequeno (5,0 mm) no início da onda, por meio de aspiração de todos os demais folículos (GIBBONS; WILTBANK; GINTHER, 1997). Entretanto, o potencial de um FS em adquirir dominância depende do seu diâmetro no momento da aspiração do dominante (GINTHER et al., 2001a).

Em estudos *in vitro*, verificou-se que o FSH estimula a produção de E2, IGF-1, ativina-A, e inibina-A, (GINTHER et al., 2003). Concordando com o proposto por Knight (1996), a principal função do FSH é induzir a atividade da enzima aromatase, fazendo com que os folículos adquiram capacidade de produzir E2, como também folistatina e inibina. Acredita-se que quanto maior a concentração de E2 e inibina, menor a liberação de FSH pela hipófise (GINTHER et al., 1996). Tudo indica que esses hormônios são os principais responsáveis pela supressão das concentrações sistêmicas de FSH (GINTHER et al., 2003).

### **2.3.2 Estradiol (E2)**

O E2 é um hormônio produzido pelas células da granulosa de folículos em crescimento, começando a aumentar, no momento da divergência folicular associada à elevação transitória de LH que acompanha a seleção folicular (GINTHER et al., 2001c, 2003).

Uma característica bem definida do FD é a maior capacidade de produzir E2 do que os folículos recrutados ou em regressão (FORTUNE et al., 2001). Em novilhas de raça holandesa, o primeiro aumento de diferença de concentração de E2 entre o primeiro e o segundo maior folículo ocorre entre 7,6 e 7,7 mm (GINTHER et al., 2003). Em outros experimentos, utilizando colheita sérica de amostras de fluido folicular, observou-se que o início da diferença na concentração de E2 entre o FD e FS ocorreram cerca de 4 horas antes do início do desvio (GINTHER et al., 2001c, 2002, 2003).

Para ocorrer esse aumento no E2 é necessário uma série de alterações autócrinas e parácrinas nas células da granulosa, que incluem o aumento da atividade da aromatase, aumento da expressão de receptores de LH e aumento na sensibilidade às gonadotrofinas (BAO et al., 1997). Os andrógenos são produzidos na teca em resposta à estimulação por LH, e aromatizados em E2 nas células da granulosa (BEG et al., 2001). Os andrógenos e progestágenos, por via da esteroidogênese, servem como substrato para a produção de E2 associados aos mecanismos de desvio (GINTHER et al., 2003).

Alguns estudos verificaram que mudanças na concentração de E2, no momento esperado do desvio, foram associadas com a concentração de FSH circulante, indicando relação funcional entre os dois hormônios (BEG et al., 2003; CHASOMBAT et al., 2014;

GINTHER et al., 2000a). Portanto, acredita-se que aumento de E2 plasmático produzido pelo FD no momento da divergência esperada, esteja envolvido na supressão das concentrações de FSH abaixo do requerido pelos folículos menores (GINTHER et al., 2000a).

### 2.3.3 Hormônio Luteinizante (LH)

O Hormônio Luteinizante (LH) é uma glicoproteína secretada pela hipófise anterior, sendo regulador primário da função ovariana. O LH pode apresentar diversas funções no desenvolvimento folicular, sobretudo durante a fase final do crescimento (DRIANCOURT, 2001). A elevação transitória nas concentrações desse hormônio tem início 32 horas antes do desvio, período no qual o folículo passa a responder ao LH em detrimento do FSH (KULICK et al., 1999), até um período de 48 horas, após a divergência folicular (GINTHER et al., 2001c).

O momento da aquisição de LHr pelas células da granulosa e sua importância na dominância e desvio folicular ainda não estão completamente elucidados. Foram encontradas algumas evidências que apontam para um notável papel do LH no mecanismo da divergência. Dentre elas estão a aquisição de receptores de LH antes do início da divergência pelas células da granulosa do futuro FD, a dependência de LH para o crescimento além de 7,0 – 9,0 mm (em novilhas *Bos taurus*) e dominância do maior folículo e a ocorrência de uma elevação temporária nas concentrações de LH, no período de divergência em bovinos (GINTHER et al., 2003). No entanto, alguns trabalhos não conseguiram o mesmo resultado em diferentes diâmetros do folículo (FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004; ROBERT et al., 2003). Em experimento realizado em novilhas *Bos taurus* foram observadas diferenças relevantes na expressão de RNAm para LHr entre os dois maiores folículos, quando o dominante apresentou diâmetro entre 8,0 e 8,4 mm (BEG et al., 2001). Porém, outros estudos, utilizando hibridização *in situ* não conseguiram detectar RNAm para LHr em células da granulosa, no momento esperado do desvio folicular (FORTUNE et al., 2001; GARVERINCK et al., 2002). Esses resultados corroboram com estudos anteriores que demonstraram ligação de LH às células da granulosa apenas em folículos com dominância estabelecida (IRELAND; ROCHE, 1982; WEBB et al., 1999).

Em vacas Nelore, a expressão do RNAm do LHr nas células da granulosa tem relação com o diâmetro folicular, após 7 mm de diâmetro (NOGUEIRA et al., 2007), tendo sua expressão aumentada a partir de 8 mm (SIMÕES et al., 2012). A transcrição dos LHr funcionais na célula da granulosa começa no momento da divergência folicular, sendo

evidente em folículos dominantes em comparação com os subordinados em novilhas Nelore (ERENO et al., 2015).

A maioria dos trabalhos sobre expressão de receptores para LHr com enfoque no momento do desvio de crescimento folicular, utilizou como modelos experimentais *Bos taurus taurus*. Dessa forma, faltam informações a respeito da expressão de LHr nessa fase distinta da dinâmica folicular em fêmeas *Bos taurus indicus*.

#### **2.3.4 Inibina e Ativina**

As inibinas são glicoproteínas diméricas que possuem duas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ . Esses hormônios são produzidos pelas células da granulosa de folículos em crescimento. Apresentam-se no fluido folicular bovino sob diversas formas díméricas e monoméricas (MIHN; AUSTIN, 2002). A associação de inibina e E2 inibe a liberação de FSH pela hipófise anterior (GINTHER et al., 1996). No entanto, a inibina-A produzida pelos folículos pequenos em crescimento parece ser o supressor mais importante do FSH, durante os dois primeiros dias da onda emergente, a partir desse ponto o E2 sintetizado pelo folículo dominante é o principal supressor de FSH (GINTHER et al., 2000a, 2001c).

A ativina, que é um homodímero da subunidade  $\beta$  da inibina, tem ações opostas a esse peptídeo tanto na hipófise quanto nos ovários. A ativina aumenta as aquisições de receptores de FSH e a síntese de inibina pelas células da granulosa, promovendo a proliferação das células da granulosa e a esteroidogênese durante o desenvolvimento folicular precoce. A interação ativina-receptor é regulada pela folistatina, sua proteína ligante. A folistatina neutraliza a função da ativina na hipófise e nos ovários e possui atividade semelhante à inibina (MIHN; AUSTIN, 2002). A ativina-A parece estar envolvida no processo de divergência, pois a elevação transitória nas concentrações desse peptídeo foi associada ao aumento de E2 e IGF-1 em bovinos (GINTHER et al., 2003). Os receptores de ativina são regulados no decorrer da divergência folicular e luteólise, o que sugere papel potencial na regulação desse processo ovariano (ILHA et al., 2015).

A inibina aparenta ser o principal agente responsável pela supressão sistêmica do FSH, durante a fase de crescimento que antecede o desvio folicular em bovinos. Porém, as concentrações sanguíneas de E2 aumentam próximo ao início do desvio e, possivelmente, tanto a inibina quanto o E2 contribuem para o contínuo declínio nas concentrações circulantes de FSH após o desvio.

### 2.3.5 Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF)

O sistema IGF possui diversos componentes, incluindo os ligantes (IGF-I e IGF-II) e seis diferentes proteínas ligantes de IGF e suas proteases (IGFBP-1, 2, 3, 4, 5, e 6) (FORTUNE et al., 2001; SPICER; ECHETERNKAMP, 1995). Têm capacidade de atuar por via endócrina, assim como por mecanismos autócrino e/ou parácrino (SPICER et al., 2004).

O IGF-I estimula a proliferação das células da granulosa em ação sinérgica com as gonadotrofinas (FORTUNE et al., 2004). Além disso, em estudo *in vitro*, o IGF-I estimulou a produção de E2 e aumentou o diâmetro folicular (SPICER; ALONSO; CHAMBERLAIN, 2001), demonstrando a relação com o desenvolvimento dos folículos. Ginther et al. (2004), ao injetarem IGF-1 no interior do maior FS no momento esperado do desvio, observaram 3-6 horas depois aumento das concentrações intrafoliculares de E2 e de androstenediona depois 3-12 horas. Esses achados indicam que o IGF-1 atua direta ou indiretamente (andrógenos), na produção de esteroides no FD.

A disponibilidade de IGF livre no folículo parece ser determinada pelas IGFBPs (FORTUNE et al., 2001), que modulam o desenvolvimento folicular. No fluido folicular bovino foram encontradas as IGFBP -2, -3, -4, -5, (STEWART et al., 1995). Além disso, RNAm para IGFBP-2 e -4 foram localizados nas células da granulosa e da teca, respectivamente (ARMSTRONG; WEBB, 1997). Embora a IGFBP-3 seja a proteína ligante predominante no sangue e no fluido folicular, na maioria das espécies estudadas ela é raramente expressada nos tecidos ovarianos (RECHLER, 1993). Os níveis intrafoliculares das IGFBP de baixo peso molecular (PM < 40 kDa; IGFBP-2, -4 e -5) são de maior interesse, e suas concentrações no fluido folicular são maiores nos folículos subordinados e atrésicos do que em folículos dominantes com atividade estrogênica (STEWART et al., 1995).

A maioria dos trabalhos indica que as proteínas ligadoras de IGF (IGFBPs) inibem as ações das gonadotrofinas no crescimento e diferenciação folicular. Logo, mudanças nas concentrações intrafoliculares de IGFBPs podem causar alterações na biodisponibilidade de IGFs e, conseqüentemente, aumentar ou diminuir as ações das gonadotrofinas nas células foliculares (MONGET; MONNIAUX, 1994; SPICER; ECHETERNKAMP, 1995).

As proteases degradam as IGFBPs, causando aumento na biodisponibilidade de IGF-1 nos folículos. Em bovinos, antes do diâmetro de desvio, ocorre aumento da atividade proteolítica no maior folículo enquanto que no segundo maior folículo aumentaram as concentrações de IGFBPs (RIVERA; FORTUNE, 2003). Portanto, baixa concentração de IGFBP-4 aumentaria a quantidade de IGF-1 biodisponível para ser utilizado como promotor

de crescimento pelo folículo, amplificando os efeitos do FSH e promovendo aumento na produção de E2. Essa concentração reduzida de IGFBP-4 está relacionada à maior degradação específica dessa proteína ligada por uma enzima proteolítica, mais comumente conhecida como *plasma-associated pregnancy protein-A* (PAPP-A – proteína plasmática associada à prenhez – A), presente nos folículo dominante, desde a fase de recrutamento até o momento pré-ovulatório (FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004; RIVERA; FORTUNE, 2001). Desse modo, Austin et al. (2001) também propuseram que as primeiras mudanças intrafoliculares que distinguem o folículo destinado a tornar-se dominante dos outros folículos da população em crescimento seria a maior capacidade em produzir E2 e manutenção de baixas concentrações de IGFbps. Apesar dos achados das pesquisas previamente reportadas, são necessários mais estudos para tornar clara a relação das várias proteínas ligantes e suas proteases no mecanismo de desvio folicular (GINTHER et al., 2003).

### **2.3.6 Prostaglandina (PGF)**

A prostaglandina (PGF) é secretada pelo endométrio com ação luteolítica em ruminantes, provocando completa e rápida luteólise, determinando redução nas concentrações de P4 (SIDDIQUI; GINTHER, 2014). Em bovinos é amplamente utilizada para a sincronização da ovulação (BÓ; BARUSELLI; MARTINEZ, 2003) Em estudo com novilhas *Bos taurus*, verificou-se que a indução da luteólise com PGF<sub>2</sub>α quando o FD e CL estavam ipsilateral provocou alterações no perfil de crescimento folicular e mudança da condição de dominante para subordinado em vacas com diâmetro folicular de 8,5 mm (SIDDIQUI; GINTHER, 2014). Tal mudança, está associada à presença de CL ipsilateral ao FD (GINTHER et al., 2015). Esses achados confirmam a hipótese do trabalho realizado por Siddiqui e Ginther et al. (2014) em que o FS mantém-se viável por mais de dia após o início da divergência folicular, podendo inclusive ser convertido à dominante. Desse modo, faltam informações a respeito de como a luteólise e a localização do FD e o CL é capaz de influenciar na divergência folicular em fêmeas *Bos taurus indicus*.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, G. P. et al. Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 30, n. 4, p. 259-271, 1993.
- ARMSTRONG, D. G.; WEBB, R. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. **Reviews of Reproduction**, Cambridge, v. 2, n. 3, p. 139-146, 1997.
- AUSTIN, E. J. et al. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 64, n. 3, p. 839-848, 2001.
- BAO, B. et al. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor cytochrome P450-side chain cleavage, and aromatase are associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 56, n. 5, p. 1158-1168, 1997.
- BASTOS, M. R. **Diferenças fisiológicas reprodutivas entre *Bos taurus* e *Bos indicus***. 2012. 156 p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal e Radiologia Veterinária)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botacatu, 2012.
- BEG, M. A. et al. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 64, n. 2, p. 432-441, 2001.
- BEG, M. A. et al. Role of oestradiol in growth of follicles and follicle deviation in heifers. **Reproduction**, Cambridge, v. 125, n. 6, p. 847-854, 2003.
- BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTINEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 78, p. 307-326, 2003.
- BODENSTEINER, K. J. et al. Alterations in follicular estradiol and gonadotropin receptors during development of bovine antral follicles. **Theriogenology**, Stoneham, v. 45, n. 2, p. 499-512, 1996.
- BORGES, A. M. et al. Dinâmica folicular e momento da ovulação em vacas não lactantes das raças Gir e Nelore durante duas estações do ano. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 56, n. 3, p. 346-354, 2004.
- CASTILHO, A. C. S. **Divergência no crescimento folicular e sua influência sobre a competência oocitária para o desenvolvimento embrionário *in vitro* em novilhas da raça Nelore**. 2003. 90 p. Tese (Doutorado em Reprodução)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2003.
- CASTILHO, C. et al. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 98, n. 3/4, p. 189-196, 2007.

- CHASOMBAT, J. et al. Ovarian follicular dynamics and hormones throughout the estrous cycle in Thai native (*Bos indicus*) heifers. **Animal Science Journal**, Champaign, v. 85, n. 1, p. 15-24, Jan. 2014.
- DONALDSON, L. E.; HANSEL, W. Cystic corpora lutea and normal and cystic graafian follicles in the cow. **Australian Veterinary Journal**, Melbourne, v. 44, n. 7, p. 304-308, 1968.
- DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals: implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, Stoneham, v. 55, p. 1211-1239, 2001.
- DROS, D. V. M. M. **Training manual for embryo transfer in cattle**. Gainesville: College of Veterinary Medicine, University of Florida, 1995. 59 p.
- ERENO, R. L. et al. Expression of mRNA encoding the LH receptor (LHR) and LHR binding protein in granulosa cells from nelore (*Bos indicus*) heifers around follicle deviation. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 50, n. 6, p. 951-957, Dec. 2015.
- FIGUEIREDO, R. A. et al. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 47, n. 8, p. 1489-1505, 1997.
- FORTUNE, J. E. et al. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 65, n. 3, p. 648-654, 2001.
- FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; YANG, M. Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82/83, p. 109-126, 2004.
- GARVERINCK, H. A. et al. Regulation of expression of ovarian mRNA encoding steroidogenic enzymes and gonadotrophin receptors by FSH and GH in hypogonadotrophic cattle. **Reproduction**, Cambridge, v. 123, n. 5, p. 651-661, 2002.
- GIBBONS, J. R.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and follicle-stimulating hormone surge in heifers. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 57, n. 5, p. 1066-1073, 1997.
- GIMENES, L. U. et al. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, Stoneham, v. 69, n. 7, p. 852-858, 2008.
- GINOTHER, O. J. et al. Activin A, estradiol, and free insulin-like growth factor I in follicular fluid preceding preceding the experimental assumption of follicle dominance in cattle. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 67, p. 14-19, 2002.
- GINOTHER, O. J. et al. Associated and independent comparisons between the two largest follicles preceding follicle deviation in cattle. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 68, n. 2, p. 524-529, 2003a.

- GINTHER, O. J. et al. Dose-response study intrafollicular injection of insulin-like growth factor-I on follicular fluid factors and follicle dominance in mares. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 70, n. 4, p. 1063-1069, 2004.
- GINTHER, O. J. et al. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 48, n. 1, p. 75-87, July 1997.
- GINTHER, O. J. et al. Follicle selection in cattle: relationships among growth rate, diameter ranking, and capacity for dominance. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 65, n. 2, p. 345-350, 2001a.
- GINTHER, O. J. et al. Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. **Biological Reproduction**, Champaign, v. 64, n. 1, p. 197-205, Jan. 2001b.
- GINTHER, O. J. et al. Follicle selection in monovular species. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 65, p. 638-647, 2001c.
- GINTHER, O. J. et al. Intraovarian factors associated with switching of a future dominant follicle to a subordinate follicle during induced luteolysis in heifers. **Theriogenology**, Wisconsin, v. 83, n. 5, p. 786-796, 2015.
- GINTHER, O. J. et al. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 78, n. 3, p. 239-257, 2003b.
- GINTHER, O. J. et al. Relationship between days of the luteolytic period and locations of the preovulatory follicle and CL in interovulatory intervals with two or three follicular waves in heifers. **Theriogenology**, Stoneham, v. 85, n. 6, p. 787-797, Apr. 2014.
- GINTHER, O. J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 55, p. 1187-1194, 1996.
- GINTHER, O. J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of fsh concentrations. **Theriogenology**, Stoneham, v. 52, n. 6, p. 1079-1093, 1999.
- GINTHER, O. J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. **Biology of reproduction**, Champaign, v. 63, n. 2, p. 383-389, Aug. 2000a.
- GINTHER, O. J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle: role of two-way functional coupling between follicle-stimulating hormone and the follicles. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 62, n. 4, p. 920-927, Apr. 2000b.
- GINTHER, O. J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 87, p. 223-230, 1989.
- GOODMAN, A.; HOGGEN, G. D. The ovarian triad of the primate menstrual cycle. **Recent Progress in Hormone Research**, Bethesda, v. 39, p. 1-73, 1983.

ILHA, F. G. et al. Expressão dos receptores de ativina durante a divergencia folicular e luteólise em bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 52, p. 231, 2015. Suplemento 1. Resumo.

IRELAND, J. J.; ROCHE, J. F. Development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: changes in serum hormones, steroids in follicular fluid, and gonadotropin receptors. **Endocrinology**, Baltimore, v. 111, n. 6, p. 2077-2086, 1982.

KNIGHT, P. G. Roles of inhibins, activins, and follistatin in the female reproductive system. **Frontiers in Neuroendocrinology**, New York, v. 17, p. 476-509, Oct. 1996.

KULICK, L. J. et al. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. **Theriogenology**, Stoneham, v. 52, n. 5, p. 913-921, Oct. 1999.

LUCY, M. C. et al. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Jornal of Animal Science**, Champaing, v. 70, n. 11, p. 3615-3626, Nov. 1992.

LUO, W. et al. The role of luteinizing hormone in regulating gene expression during selection of a dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, Champign, v. 84, n. 2, p. 369-378, 2011.

MATSUI, M. et al. Rational change in the number of the follicles with blood flow during first follicular wave in cycling cows. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro. **Proceedings...** Porto Seguro: College of Animal Reproduction, 2004. p. 48.

MIES FILHO, A. **Reproduction dos animais e inseminação artificial**. 4. ed. Porto Alegre: Sulina, 1977. v. 1, p. 359.

MIHN, M.; AUSTIN, E. J. The final stages of dominant follicle selection in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, Auburn, v. 23, n. 1, p. 155-166, 2002.

MONGET, P.; MONNIAUX, D. Growth factors and the control of folliculogenesis. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, Cambridge, v. 49, p. 321-333, 1995.

NOGUEIRA, M. F. G. et al. Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: changes with follicle size and regulation by FSH *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 74, n. 6, p. 680-686, 2007.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonography of the bovine ovary. **Theriogenology**, Stoneham, v. 21, n. 3, p. 495-504, 1984.

RAJAKOSKI, E. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with spacial reference to seasonal, cyclical end left-right variations. **Acta Endocrinol Suppl**, Copenhagen, v. 34, p. 57-68, 1960. Supplement 3.

RECHLER, M. M. Insulin-like growth factor binding proteins. **Vitamins and Hormones**, New York, v. 47, p. 1-114, 1993.

RIVERA, G.; FORTUNE, J. E. Development of codominant follicles in cattle is associated with a follicle-stimulating hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein-4 protease. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 65, n. 1, p. 112-118, July 2001.

RIVERA, G.; FORTUNE, J. E. Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins-4 and-5 in bovine follicular fluid: implications for ovarian follicular selection and dominance. **Endocrinology**, Baltimore, v. 144, n. 7, p. 2977-2987, 2003.

ROBERT, C. et al. Presence of LH receptor mRNA in granulosa cells as a potential marker of oocyte developmental competence and characterization of the bovine splicing isoforms. **Reproduction**, Cambridge, v. 125, n. 3, p. 437-446, 2003.

SARTORELLI, E. S. **Caracterização da fase de desvio folicular en novilhas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*)**. 2003. 63 p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2003.

SARTORELLI, E. S. et al. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, n. 9, p. 2382-2394, June 2005.

SARTORI, R. et al. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers lactating and cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 4, p. 905-920, 2004.

SARTORI, R. et al. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 65, n. 5, p. 1403-1409, 2001.

SARTORI, R. et al. Physiological differences and implications to reproductive management of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle in a tropical environment. **Society of Reproduction and Fertility Supplement**, Cambridge, v. 67, p. 357-375, 2010.

SIDDIQUI, M. A. R.; GINTHER, O. J. Switching of largest follicle from dominant subordinate status when follicle and CL are in same ovary in heifers. **Theriogenology**, Stoneham, v. 82, n. 2, p. 259-265, July 2014.

SIMÕES, R. A. et al. Ovulation rate and its relationship with follicle diameter and gene expression of the LH receptor (LHR) in Nelore cows. **Theriogenology**, Stoneham, v. 77, p. 139-147, Jan. 2012.

SIROIS, J.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 39, n. 2, p. 308-317, 1988.

SPICER, L. J. Proteolytic degradation of insulin-like growth factor binding proteins by ovarian follicles: a control mechanism for selection of dominant follicles. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 70, n. 5, p. 1223-1230, 2004.

SPICER, L. J.; ALONSO, J.; CHAMBERLAIN, C. S. Effects of thyroid hormones on bovine granulosa and thecal cell function in vitro: dependence on insulin and gonadotropins. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 5, p. 1069-1076, June 2001.

SPICER, L. J.; ECHTERNKAMP, S. E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, Auburn, v. 12, n. 3, p. 223-245, 1995.

STEWART, R. E. et al. Effects of insulin-like growth factor I and insulin on proliferation and on basal and luteinizing hormone-induced steroidogenesis of bovine thecal cells: involvement of glucose and receptors for insulin-like growth factor I and luteinizing hormone. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, n. 12, p. 3719-3731, Dec. 1995.

WEBB, R. et al. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, Cambridge, v. 66, p. 33-48, 1999.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGO**

**ARTIGO 1 – FATORES ENDÓCRINOS E MOLECULARES ENVOLVIDOS NA  
DINÂMICA FOLICULAR DO FUTURO FOLÍCULO DOMINANTE DURANTE A  
INDUÇÃO DA LUTEÓLISE EM VACAS DA RAÇA NELORE**

**(VERSÃO PRELIMINAR)**

Artigo formatado segundo as normas da Reproduction

## Resumo

O objetivo foi avaliar o perfil de crescimento do futuro folículo dominante (FD) e sua relação com o folículo subordinado (FS) e os fatores intraovarianos como inibina-A, ativina-A, fosfolistatina, IGF-1 e suas proteínas transportadoras que interferem na divergência folicular no período pré e pós luteólise em vacas Nelore. Avaliando-se a dinâmica folicular (exame ultrassonográfico de 12/12 horas a partir de folículos com 6,0mm de diâmetro) em vacas (n=40), divididos em dois grupos (antes do desvio AD (n=20) e depois do desvio DD (n=20)). No grupo AD, as vacas receberam 500µg de cloprostenol no momento em que o FD da segunda onda de crescimento folicular apresentava 7,0mm (6,5 a 7,5mm). No grupo DD, as vacas receberam 500µg de cloprostenol no momento em que o FD da segunda onda de crescimento folicular apresentava 8,0mm (7,5 a 8,5 mm). As vacas dos grupos AD e DD foram submetidas à aspiração folicular do FD 96 horas e 72 horas após administração de PGF, respectivamente, para avaliação da expressão gênica de IGF1R, LHR e PAPPa nas células da granulosa. O diâmetro do FD no momento da administração o PGF (P=0,001) e a taxa de crescimento do FS (P=0,05) foram maiores no grupo AD. As demais variáveis da dinâmica folicular foram semelhantes entre os grupos experimentais (P>0,05). Além disso, verificou-se maior expressão de LHR nas vacas do grupo DD. Conclui-se que a indução da luteólise antes da divergência folicular por influenciar a relação entre o FD e o subordinado e modulando o aumento ou diminuição na expressão LHR na célula da granulosa.

Palavras chave: Divergência folicular, folículo dominante, corpo lúteo, luteólise, LHR.

## Abstract

The objective was evaluate the profile of future dominant follicle (FD) and its relation to subordinate follicle (FS) and intraovarian factors as inhibin, activin, follistatin, IGF-1 and its carrier proteins that interfere in the follicular deviation during the luteolysis induction in Nelore cattle. In this study took place the follicular dynamics (ultrasound exam in 12/12 hours starting with 6mm diameter follicular) in cattle (n=40), which were divided in two groups (AD, before the deviance (n=20) and DD after the deviance (n=20)). In the AD group, the cattle received 500ug of cloprostenol at the moment that FD of second wave of follicular growth presented 7,0mm (6,5 to 7,5mm). In the DD group, the cattle received 500ug of cloprostenol in the moment that FD of second wave of follicular growth presented 8,0mm (7,5 to 8,5 mm). The cattle which belonged to AD and DD groups were subjected to a follicular aspiration from FD 96 hours and 72 hours after the administration of PGF, respectively, to evaluate the gene expression of IGF1r, LHR and PAPPa in the granulosa cell. The diameter of FD at the moment of PGF (P=0,001) and the growth rate of FS (P=0,05) were higher in the AD group. The other variables of follicular dynamics were similar between the experimental groups (P>0,05). Beyond

that, was observed higher expression of LHR in cattles of the group DD. Consequently, it can be concluded that the induction of luteolysis before the follicular deviance for influencing the relation between the FD and the subordinate e modular to the expression of LHR granulose cells.

Key words: Follicular deviance, dominant follicle, corpus luteum, luteolysis, LHR.

## 1. Introdução

O desenvolvimento folicular durante o ciclo estral em *Bos indicus* ocorre em padrões de ondas de crescimento, sendo geralmente observadas duas a três OFs (Figueiredo et al. 1997). No início do desenvolvimento folicular, os folículos possuem crescimento contínuo até a divergência (Sirois; Fortune, 1998). A partir da divergência folicular, observa-se diferença significativa nas taxas de crescimento do futuro folículo dominante (FD) e dos demais folículos recrutados na onda folicular (Ginther et al. 1996). Em *Bos indicus* a divergência folicular ocorre quando o maior folículo atinge 7,5 mm de diâmetro (Castilho et al. 2007; Gimenes et al. 2008).

O número de ondas por ciclo está associado à duração do ciclo estral e com o prolongamento da fase luteínica (Ginther et al. 1989). Outro fator que interfere no número de ondas é a relação entre o FD e o corpo lúteo CL. Em estudo recente foi observado que em vacas com maior número de ondas o corpo lúteo e o folículo dominante estavam localizadas em ovários diferentes (Ginther et al. 2014). Em outros estudos utilizando novilhas *Bos taurus*, foi observado que a perda da dominância folicular (substituição do FD pelo folículo subordinado-FS) ocorreu em fêmeas com o FD e CL ipsilateral quando a luteólise foi induzida em FD com 8,5mm (Siddiqui; Ginther, 2014; Ginther et al. 2015). No entanto, ainda não está claro se a mudança do futuro folículo dominante para subordinado ocorre antes do desvio e se a relação entre o FD e o CL interfere nessa mudança (Ginther et al. 2015). Além disso, ainda não se sabe quais fatores presentes no líquido folicular, especialmente inibina, ativina, IGF e suas proteínas transportadoras, estão envolvidos na diferenciação e desenvolvimento folicular (Ireland; Roche, 1982).

A maioria dos estudos a respeito de expressão de receptores para LH (LHR) no momento do desvio folicular utilizou como modelos experimentais fêmeas *Bos taurus*. Portanto, faltam informações a respeito da expressão de LHR nessa fase distinta da dinâmica folicular em fêmeas *Bos indicus*. Desse modo, avaliar alterações endócrinas e moleculares no ovário que interferem no processo de dominância folicular, sobretudo em *Bos indicus*, se faz necessário determinar se os momentos da luteólise antes e depois do desvio intervêm no processo da divergência folicular. Dessa maneira, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o perfil de crescimento do futuro folículo dominante (FD) e sua relação com o folículo subordinado (FS) e os fatores intraovarianos como

inibina, ativina, fosfolistatina, IGF1 e suas proteínas transportadoras que interferem na divergência folicular no período pré e pós luteólise em vacas Nelore.

## **2. Material e métodos**

### **1.1 Local e animais do experimento**

O experimento foi realizado nos mês de junho e agosto (2016), na fazenda Córrego da Prata, localizado no município de Bom Sucesso-MG. Foram utilizadas 40 vacas da raça Nelore (*Bos indicus*) múltíparas, não lactantes, com idade entre 3 a 7 anos, escore de condição corporal  $\geq 2,5$  (Escala de 1 a 5; Ayres et al. 2009), mantidas em pastagem de *Brachiaria brizantha* com acesso *ad libitum* a água e sal mineral, divididos em dois grupos de maneira aleatório no grupo antes do desvio (n=20;AD) e grupo depois do desvio (n=20;DD).

### **1.2 Protocolo de sincronização da ovulação e exames ultrassonográficos**

Em um dia aleatório do ciclo estral as vacas foram sincronizadas com um dispositivo intravaginal de progesterona (Sincrogest®; Ouro Fino, São Paulo, Brasil) e 2mg de benzoato de estradiol IM (Sincrodiol®; Ouro Fino, São Paulo, Brasil). Oito dias depois, os dispositivos foram retirados concomitantemente com a administração de 500mg de cloprostenol IM (Sincrocio®; Ouro Fino, São Paulo, Brasil) e 1mg de cipionato do estradiol IM (SincroCP®; Ouro Fino, São Paulo, Brasil).

Após a sincronização da ovulação, as vacas foram avaliadas por ultrassonografia utilizando probe linear com frequência de 7,5 MHz (Mindray 4900) para identificação de estruturas presentes nos ovários, como a quantidade de folículos, diâmetros foliculares e do corpo lúteo.

O desenvolvimento do FD após a divergência folicular foi classificado em 3 tipos (crescimento, platô e inversão). As vacas classificadas como em crescimento apresentavam taxa de crescimento do FD acima de 0,5 mm por dia após administração de cloprostenol. As vacas classificadas como em platô apresentavam taxa crescimento folicular abaixo de 0,5 mm por dia após administração de cloprostenol. As vacas classificadas com em inversão apresentavam mudança de dominância folicular, em que o FS tornava-se dominante. O desvio folicular foi identificado por análise gráfica em que se observa a diferença na taxa de crescimento dos dois maiores folículos (Ginther et al. 1997).

### **1.3 Delineamento experimental**

Oito dias após a ovulação, as vacas foram submetidas a exames ultrassonográficos diariamente para identificação do início da segunda onda folicular. Após visualização de um folículo de 5,5 mm,

os ovários foram monitorados por ultrassonografia a cada 12 horas. A partir desse momento os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos. No grupo AD (antes do desvio), as vacas com folículos entre 6,5 e 7,5 mm receberam IM 500mg de cloprosternol (Sincrocio®; Ouro Fino, São Paulo, Brasil). No grupo DD (depois do desvio), as vacas com folículos entre 7,5 e 8,5 mm receberam IM 500mg de cloprosternol. Os exames ultrassonográficos foram realizados nas vacas dos grupos AD e DD até 96 e 72 horas após a administração de prostaglandina, respectivamente (Figura 1).

#### **1.4 Coleta de sangue e determinação da progesterona (P4) sérica**

As amostras de sangue foram colhidas por punção de veia jugular utilizando tubos à vácuo com EDTA de 4 mL (Vacutainer®, Becton-Dickinson e Company, EUA). As colheitas de sangue foram realizadas a cada 12 horas a partir da administração de cloprosternol (0h) até 96h para o grupo AD e 72h para o grupo DD. Após as colheitas, o sangue foi mantido em caixa de isopor com gelo e, então, conduzido ao laboratório. O plasma foi separado por centrifugação a 1000 x g (Centrífuga Excelsa Baby, Fanem, Brasil) durante 20 minutos. O plasma separado foi acondicionado em tubos estéreis de 1,5 mL (Tubos Eppendorf 3810X standard®, Eppendorf, Alemanha), com identificação do animal, grupo e momento da colheita e, então, armazenado em freezer a -21°C até posterior análise de P4.

A análise da concentração de progesterona no plasma foi realizada pela técnica de radioimunoensaio utilizando-se kits comerciais para determinação de progesterona com I125 em fase sólida ImmuChem™ Double Antibody Progesterone Kit (cat. 07-170105, MP Biomedicals, NY, USA), conforme descrito por Colazo et al. (2008). As análises foram realizadas no laboratório de análises hormonais do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal- F.O.A. - UNESP, Araçatuba/SP.

#### **1.5 Aspiração do folículo dominante guiada por ultrassonografia para colheita de células da granulosa**

As amostras de líquido folicular foram obtidas por aspiração do FD 96 horas após a administração de PGF2 $\alpha$  no Grupo AD e 72 horas no Grupo DD. Na aspiração folicular, os animais foram contidos em brete apropriado. Com o animal contido e higienizado, procedeu-se a anestesia epidural no espaço entre a última vértebra sacral e primeira coccígea, utilizando volume de 3 mL de lidocaína a 2% sem vasoconstritor (Anestésico L®, Pearson). Em seguida, a probe micro-convexa com frequência de 7,5 MHz (Aloka SSD 500, Japão), foi introduzida até o fundo do saco vaginal com o auxílio de um guia de aspiração folicular guiada por ultrassom (Guia de aspiração folicular, WTA, Brasil), baseado na técnica utilizada por Kot, Gibbons e Ginther (1995) adaptada por meio de sistema de dupla via, acoplado a uma seringa de 3 mL, conforme técnica utilizada por Drum (2015).

O transdutor foi posicionado de maneira que permitisse a visualização do folículo a ser aspirado e a agulha direcionada para o antro do folículo. O conteúdo folicular (líquido folicular, células da granulosa e possível oócitos) foi aspirado totalmente e em seguida, foram injetado 2 mL de solução fisiológica contendo 100 UI/mL de heparina no folículo aspirado. A lavagem foi monitorada via ultrassonografia, observando-se o turbilhonamento do líquido injetado na cavidade folicular. A cada aspiração a agulha foi trocada e o sistema lavado utilizando duas seringas de 10 mL de tampão PBS, intercaladas com 10 mL de álcool 70° e por fim 120 mL de ar para secagem do sistema. Antes da próxima aspiração o sistema foi preenchido com solução fisiológica e acoplado a uma nova seringa de 3 mL para aspiração do próximo folículo. O conteúdo folicular foi centrifugado à 2000 x g por 3 minutos e o pellet de células da granulosa formado foi transferido para um criotubo livre de RNase e DNase (Corning Incorporated CORNING® 430659 México). Imediatamente após esses procedimentos o criotubo foi imerso em nitrogênio líquido e armazenados a -196°C até a análise de expressão gênica.

Com objetivo de verificar a presença de uma quantidade de células capazes de permitir a extração de mRNA suficiente para realizar o RT-qPCR, para o grupo AD e DD foi realizado a contagem de células da granulosa por meio da câmara de Neubauer. Com esse intuito, o pellet de células da granulosa foi ressuscitado em 400 µL de DMPBS e homogeneizado em vórtex. Após contagem, a suspensão foi novamente centrifugada. O sobrenadante foi dispensado e o pellet novamente ressuscitado, em 200 µL Trizol (primeiro passo do protocolo para extração de RNA), e armazenado a -80°C até realização da extração do RNA total.

### **2.5.1. Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA)**

A avaliação de RNA das células da granulosa foi realizada segundo o protocolo Trizol® (Invitrogen) seguido o procedimento indicado pelo fabricante. A concentração e a pureza do RNA total foram estimadas por espectrofotometria empregando o equipamento NanoVue® (GE Healthcare), pela absorvância 260 nm e pelas razões 260/280 e 260/230. As amostras foram armazenadas a -80°C

Com o intuito de evitar que uma eventual contaminação com DNA genômico interferisse nos resultados, todas as amostras de RNA total foram tratadas com enzima DNase. Conforme instruções do protocolo DNase I – Amplification Grade® (Invitrogen), o volume da solução foi calculado para conter 500ng de RNA. A esse volume, foi adicionado 1 µL de DNase I (1unidades/µL) e água "RNase free" suficiente para completar 10 µL. Após 15 minutos, foi adicionado 1 µL de EDTA (25mM) e o tubo foi aquecido a 65°C por 10 minutos para inativar a DNase I. Imediatamente após o tratamento com DNase iniciou-se o protocolo de transcrição reversa utilizando o kit "High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit" (Life Technologies), conforme instruções do fabricante. As amostras de cDNA produzidas ao final da reação de transcrição reversa (RT) foram mantidas em gelo para utilização imediata na PCR ou armazenadas (-20° C).

### 2.5.2. Expressão gênica por PCR em tempo real quantitativo (qPCR)

A obtenção dos dados de expressão dos genes alvos foi realizada pelo ensaio de PCR em tempo real quantitativo (qPCR) utilizando o kit comercial Power SYBER® Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) pelo equipamento StepOnePlus® (Applied Biosystem), cada reação teve o volume de 16µL. Os primers utilizados foram delineados a partir de sequência bovinas disponíveis no banco de dados do GenBank ([www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)). As sequências dos primers, tamanho da amplificação, temperatura de anelamento, concentrações para cada par de primers, identificação no NCBI (National Center for Biotechnology Information) e referencia, utilizados no experimento estão apresentados no quadro 1. A reação de qPCR foi otimizada para obter máxima eficiência de amplificação para cada gene. Cada primers foi validado em duas etapas: teste de concentração (para avaliar a concentração ideal do primer empregado) e curva padrão (para avaliar a eficiência do primer empregado). Para as etapas de validação, utilizou-se um pool de cDNA constituído por volumes iguais de cDNA de 14 amostras dos grupos AD (n=6) e DD (n=8) do desvio e diluído em uma porção de 1:80 para realização do teste de concentração dos primers e para as reações de curva padrão o pool de cDNA foi diluído conforme na tabela 1. Finalmente, foi realizado com gel de eletroforese dos produtos do qPCR para avaliar a amplificação de um único produto traves da aparição de uma única banda de cDNA. Após serem validados os primers, a expressão dos genes alvo foi realizada a partir de 0,5-1,0 µL de cDNA em reações com volume final de 16 µL realizadas em triplicata. Amostras de controle negativo (água em substituição ao cDNA) foram avaliados em cada placa. Os dados de ciclo de amplificação e eficiência de cada reação de qPCR foram determinados pelo programa LinRegPCR (V2014.2; <http://linregpcr.nl/>). Na quantificação relativa utilizou-se o método do CT comparativo, com os resultados expressos em relação a genes de referência constitutivos e um grupo calibrador (grupo controle). Os genes GAPDH e PPIA foram utilizados como gene de referência (constitutivo) para células da granulosa (Machado, 2012). O grupo antes do desvio (AD) foi usado como calibrador, em comparação com o grupo depois do desvio (DD). As análise da quantificação relativa dos genes foram realizadas de acordo com o método  $\Delta\Delta C_t$  e corrigida pela eficiência da amplificação reações utilizando-se a equação descrita por Pfaffl (2002) utilizando o método matemático representado na figura 2.

### 2.6. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do software Statistical Analysis System for Windows SAS® (SAS, 2000). As variáveis contínuas foram avaliadas quanto à normalidade dos resíduos pelo procedimento UNIVARIATE e submetidas ao teste de Bartlett para analisar a homogeneidade das variâncias. Os dados que não atenderam as premissas da análise de variância foram transformados. Após essa avaliação, o procedimento GLIMMIX foi utilizado para análise de

variância e para determinar diferença de médias entre os momentos de tratamentos. As variáveis de distribuição não paramétricas e binomiais foram avaliadas pelo procedimento GLIMMIX. A análise de concentração de progesterona e diâmetro do corpo lúteo foi realizada por medida repetida no tempo utilizando o procedimento GLIMMIX. Foi considerada como diferença significativa entre as variáveis testadas o  $P < 0,05$ . As variáveis dependentes contínuas foram expressas em média e erro padrão da média (média  $\pm$  EPM) e as binomiais em porcentagem. A análise dos dados sobre as diferenças de expressão gênica relativa foi realizada pelo teste t Student.

### 3. Resultados

Durante o período experimental, 15 vacas foram retiradas do estudo devido a manutenção do crescimento do folículo da primeira onda após administração da prostaglandina (n=8), ausência de folículos em crescimento após divergência folicular (n=4) ou ovulação após a administração de prostaglandina (n=3). Dessa forma para as análises foram utilizadas 12 vacas do grupo AD e 13 vacas do grupo DD.

Na avaliação da dinâmica do crescimento folicular, 2 vacas foram retiradas devido inversão na dominância folicular. Os diâmetros do FS ( $P=0,21$ ) e do CL ( $P=0,35$ ) foram semelhantes entre os grupos AD e DD no momento da administração de prostaglandina, e os diâmetros do FD ( $P=0,41$ ), FS ( $P=0,13$ ) e do CL ( $P=0,19$ ) no momento da aspiração folicular e na taxa de crescimento do FD (AD= $1,30 \pm 0,17$  e DD= $0,98 \pm 0,09$ ;  $P=0,21$ ). No entanto, observou-se diferença estatística entre os grupos AD e DD no diâmetro do folículo dominante no momento da administração de prostaglandina ( $P=0,001$ ) e na taxa de crescimento do FS (AD= $-0,04 \pm 0,09$  e DD= $0,07 \pm 0,14$ ,  $P=0,05$ ; Tabela 1).

Na análise descritiva, verificou-se que 58,3% (7/12) das vacas do grupo AD e 61,5% (8/13) das vacas do grupo DD tiveram FD ipsilateral ao CL e que 83,3% (10/12) das vacas do grupo AD e 69,2% (9/13) das vacas do grupo DD, apresentava FD da segunda onda ipsilateral ao FD da primeira onda. Além disso, as vacas do grupo AD observou-se que 58,3% (7/12) e 53,9% (7/13) das vacas do grupo DD exibiram FD contralateral ao FS (Tabela 2).

Diferentes padrões de crescimento folicular foram observados entre os grupos experimentais (Figura 3). Verificou-se que 76% (19/25) das vacas (40% em vacas AD e 36% em vacas DD) tiveram folículos em crescimento contínuo, 16% (4/25) das vacas (0% em vacas AD e 16% em vacas DD) apresentaram folículos com desenvolvimento folicular em platô e 8% (2/25) das vacas (8% em vacas AD e 0% em vacas DD) observou-se inversão de dominância folicular.

Nas vacas dos grupos AD e DD verificou-se luteólise morfológica e funcional após administração de prostaglandina. Em ambos os grupos experimentais, a concentração de progesterona atingiu valores abaixo de 1ng/mL 36 horas após a administração de prostaglandina. A curva de redução da concentração de progesterona ( $P=0,32$ ) e do diâmetro do corpo lúteo ( $P=0,54$ ) foi semelhante entre os grupos AD e DD (Figura 4).

Na avaliação dos genes, verificou-se maior abundância de transcritos para o gene LHR ( $P=0,04$ ) nas células da granulosa de vacas que receberam prostaglandina após o desvio folicular (grupo DD). Para os demais genes (IGF1R e PAPP), a quantificação dos transcritos foi semelhante entre vacas dos grupos AD e DD (Figura 5).

#### 4. Discussão

A divergência folicular na raça Nelore ocorre por volta de 2,6 dias após a ovulação com o FD atingindo 7,5 mm e o FS 6,2 mm (Castilho et al. 2007; Gimenes et al. 2008). A média dos diâmetros do folículo dominante no momento da administração de prostaglandina foi maior no grupo DD (AD 6,8 mm e DD 8,2 mm). Essa diferença demonstra que os grupos experimentais foram definidos de forma adequada formando grupos com luteólise induzida antes e depois do desvio folicular. Além disso, não houve diferença entre as vacas dos grupos AD e DD quanto ao diâmetro do FS e CL no momento da administração de prostaglandina, assim como no FD, FS e CL no momento da aspiração folicular e na taxa de crescimento do FD. No entanto, a taxa de crescimento do FS foi menor no grupo AD. Embora a taxa de crescimento do FD não tenha diferido entre os grupos, é possível que a baixa concentração de P4 antes da divergência folicular no grupo AD tenha influenciado indiretamente a taxa de crescimento do FS. Em função das concentrações baixas de P4 no grupo AD, esperava-se maior crescimento do FD, semelhante ao que ocorre em folículos da primeira onda em que o CL não se encontra completamente formado (Borges et al. 2004). Assim, maiores folículos promoveriam maior concentração circulante de E2 e inibina, reduzindo a liberação de FSH a um limiar insuficiente para manter o crescimento do FS (Ginther et al. 1996).

Em relação à localização entre CL e FD, verificou-se que 60% das vacas apresentaram FD ipsilateral ao CL. Porém, em novilhas *Bos taurus* observaram maior prevalência dessas estruturas em posição contralateral (Ginther et al. 2014). Outros estudos reportam a importância dessa relação com o desenvolvimento e consolidação da dominância folicular (Siddinqui; Ginther 2014; Ginther et al. 2015). Tal relação pode impactar no padrão de crescimento do folículo dominante durante o processo de divergência folicular e promover substituição do folículo dominante pelo subordinado (Ginther et al. 2015)

O desenvolvimento do FD após a divergência folicular em bovinos pode assumir diferentes padrões de crescimento (Ginther et al. 2013). Em relação aos padrões de crescimento folicular apresentados nas vacas durante o período experimental, verificou-se que 76% das vacas apresentaram FD em crescimento contínuo, conforme observado na literatura (Gimenes et al. 2008). No início da fase antral, os folículos crescem concomitantemente em resposta ao estímulo do FSH e durante esse crescimento vai aumentando a capacidade de produção de estrógeno e inibina, que suprimem a liberação de FSH na hipófise (Gibbons et al. 1997). Assim, o mecanismo de divergência folicular é ativado rapidamente quando o FD atinge diâmetro suficiente para bloquear a secreção de FSH. O rápido estabelecimento do mecanismo de divergência folicular é importante para bloquear o crescimento do FS antes de alcançar diâmetro similar ao FD (Ginther et al. 2003). Durante a divergência folicular, o segundo maior folículo não resiste às baixas concentrações de FSH, impedindo que esse assuma características bioquímicas semelhantes ao FD (Ginther et al. 2001). Dessa forma, o FD continua seu crescimento contínuo e FS regride, o que foi observado em vacas dos grupos AD e DD. No entanto, observou-se que 16% das vacas apresentaram desenvolvimento folicular em platô (crescimento < 0,5 mm por dia) com permanência de status de dominante. Esse tipo de crescimento somente foi observado nas vacas do grupo DD, em que a dominância folicular já estava estabelecida. O tratamento com estradiol em fêmeas *Bos taurus* com FD maior que 11 mm reduziu a concentração circulante de FSH e taxa de crescimento do FD, indicando que o FSH esteja relacionado ao crescimento final do FD (Ginther et al., 2013). Dessa forma, as vacas do grupo DD que apresentaram crescimento em platô estavam com dominância folicular estabelecida que resultou em menor secreção de FSH e LH (maior período exposto à progesterona). Essa redução nas gonadotrofinas pode ter favorecido o crescimento do FD abaixo de 0,5 mm por dia. Além de padrão de crescimento contínuo e platô, foi observado que 8% das vacas apresentaram inversão de dominância folicular, em que o FS tornou-se dominante. A inversão do crescimento folicular foi observada em vacas do grupo AD com FD ipsilateral ao CL. Resultados semelhantes foram observados em 36% fêmeas *Bos taurus* (Ginther et al. 2015). Além disso, a frequência de inversão foi maior quando FD encontravam-se próximo (< 3 mm) ao CL (Ginther et al. 2015). Sendo assim, é provável que a mudança de um futuro FD à FS esteja funcionalmente relacionada à luteólise, em que a diminuição da perfusão sanguínea no momento da regressão do CL interfira no suprimento sanguíneo do FD por meio de arteríolas comuns para as duas estruturas (Ginther et al. 2015). A inversão de dominância folicular não foi observada em vacas com FD localizado contralateral ao CL. Assim, é possível que um folículo subordinado maior de 6,5 mm, em *Bos indicus* seja capaz de tornar-se dominante, se o FD estiver próximo ao CL.

Na avaliação dos genes não houve diferença em relação aos transcritos dos genes IGF1R e PAPPa entre os grupos AD e DD. No entanto, a quantidade de mRNA para LHR foi maior no grupo que recebeu prostaglandina após o desvio folicular (DD). Para nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo que relata efeito da progesterona antes do desvio na expressão de receptores de LH no folículo

pré-ovulatório. Alguns estudos relatam que o início da expressão de LHR está relacionado com a aquisição da dominância antes do desvio folicular (Beg et al. 2001; Ginther et al. 2003) e esses LHR aumentam no momento do desvio (Xu et al., 1995b; Bao et al. 1997) ou imediatamente após o desvio no futuro FD (Austin et al. 2001; Fortune et al. 2004; Viana et al. 2016). No presente estudo, a permanência da progesterona durante o desvio folicular induziu maior expressão de receptores de LH no folículo pré-ovulatório, demonstrando possível efeito da progesterona na expressão de genes relacionado ao crescimento folicular. Em estudo com vacas *Bos taurus* (Miura et al. 2014) verificaram maior expressão de LHR em folículos dominantes da primeira onda de crescimento folicular, momento em que a concentração de progesterona encontra-se baixa. Nesse estudo, os autores especularam que a baixa concentração de progesterona no início da primeira onda permitiu maior frequência de pulsos de LH, maior sensibilidade ao receptor de LH e consequentemente, aumento da expressão desses receptores. Porém, apesar de menor concentração, as vacas desse estudo permaneceram com progesterona durante a divergência folicular, semelhante ao observado no grupo DD em que houve maior expressão de receptores de LH no folículo pré-ovulatório.

## **5. Conclusão**

O modelo experimental desenvolvido foi capaz de gerar, de forma adequada, os grupos com luteólise induzida antes e depois do desvio folicular. Porém, a indução da luteólise antes da divergência folicular pode influenciar na relação entre o folículo dominante e o subordinado, como também, modulando o aumento ou diminuição na expressão LHR na célula da granulosa. Dessa forma, novos estudos precisam ser desenvolvidos para melhor compreender o papel da progesterona na expressão de LHR na célula da granulosa.

## Referências

- Austin EJ, Mihm M, Evans ACO, Knight PG, Ireland JLH, Ireland JJ, Roche JF (2001) Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. *Biology of Reproduction*, **64**, 839-848.
- Ayres H, Ferreira RM, Torres-Junior JRS, Demétrio CGB, Lima CG, Baruselli PS (2009) Validation of body condition score as a predictor of subcutaneous fat in Nelore (*Bos indicus*) cows. *Livestock Science*, **123**, 375-367.
- Bao B, Garverick A, Smith GW, Smith MF, Salfen BE, Youngquist RS (1997) 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*, **56**, 1158-1168.
- Beg MA, Bergfelt DR, Kot K, Wiltbank MC, Ginther OJ (2001) Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biology of Reproduction*, **56**, 432-441.
- Borges AM, Torres AA, Rocha Junior VR, Ruas JRM, Gioso MM, Fonseca JF, Carvalho GR, Maffili VV (2004) Dinâmica folicular e momento da ovulação em vacas não lactantes das raças Gir e Nelore durante duas estações do ano. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, **56**, 346-354.
- Castilho C, Garcia JM, Renesto A, Nogueira GP, Brito LF (2007) 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*, **98**, 189-196.
- Colazo MG, Ambrose DJ, Kastelic JP, Small J (2008) Comparison of 2 immunoassays and a radioimmunoassay for measurement of progesterone concentrations in bovine plasma, skim milk, and whole milk. *Can j Vet Res*, **72**, 32-36.
- Drum J (2015) Perfil hormonal e expressão de genes associados ao desvio folicular ovariano em bovinos (2003). 90p. **Tese (Mestrado)** - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Piracicaba.
- Ereno RL, Loureiro B, Castilho ACS, Machado MF, Pegorer MF, Satrapa RA, Nogueira MFG, Biratini J, Barros CM (2015). Expression of mRNA Encoding the LH receptor (LHR) and LHR Binding Protein in Granulosa Cells from Nelore (*Bos indicus*) Heifers Around Follicle Deviation. *Reproduction in Domestic Animals*, **50**, 951-957.

Figueiredo AR, Barros CM, Pinheiro OL, Soler JMP (1997) Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology*, **47**, 1489-1505.

Fortune JE, Rivera GM, Yang MY (2004), Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal Reproduction Science*, **83**, 109-126.

Gibbons JR, Wiltbank MC, Ginther OJ (1997) Functional interrelationships between follicles greater than 4 mm and follicle-stimulating hormone surge in heifers. *Biology of Reproduction*, **57**, 1066-1073.

Gimenes LU, Bergfelt DR, Kulick LJ, Kot K (2008) Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*, **69**, 852-858.

Ginther OJ, Bashir ST, Santos VG, Beg MA (2013) Contralateral ovarian location between the future ovulatory follicle and extant corpus luteum increases the length of the luteal phase and number of follicular waves in heifers. *Theriogenology*, **79**, 1130-1138.

Ginther OJ, Bashir ST, Bashir ST, Rakesh HB, Hoffman MM (2013) Two-way coupling between FSH and the dominant follicle in heifers. *Theriogenology*, **80**, 463-469.

Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Donadeu FX, Kot K (2001) Follicle selection in monovular species. *Biology of Reproduction*, **65**, 638-647.

Ginther OJ, Beg MA, Meira C, Bergfelt DR (2003) Associated and independent comparisons between the two largest follicles preceding follicle deviation in cattle. *Biology of Reproduction*, **68**, 524-529.

Ginther OJ, Rakesh ST, Bashir ST, Hoffman MM (2014) Relationship between days of the luteolytic period and locations of the preovulatory follicle and CL in interovulatory intervals with two or three follicular waves in heifers. *Theriogenology*, **85**, 787-797.

Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K (1996) Selection of the dominant follicle in cattle. *Biology of reproduction*, **55**, 1187-1194.

Ginther OJ, Kot K, Kulick LJ, Wiltbank MC (1997) Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology*. **48**, 75-87.

Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP (1989) Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *Journal of Reproduction and Fertility*, **87**, 223-230.

Ginther OJ, Siddiqui MAR, Baldrighi JM, Hoffman MM (2015) Intraovarian factors associated with switching of a future dominant follicle to a subordinate follicle during induced luteolysis in heifers. *Theriogenology*, **83**, 786-796.

Ireland JJ and Roche JF (1982) Development of antral follicles in cattle after prostaglandin- induced luteolysis: changes in serum hormones, steroids in follicular fluid, and gonadotropin receptors. *Endocrinology*, **111**, 2077-2086.

Kot K, Gibbons JR, Ginther OJ (1995) A technique for intrafollicular injection in cattle: effects of hcg. *Theriogenology*, **44**, 41-50.

Luo W, Gumen A, Haughian J, Wiltbank MC (2011) The role of luteinizing hormone in regulating gene expression during selection of a dominant follicle in cattle. *Biology of Reproduction*, **84**, 369-378.

Machado MF (2012) Expressão e função de membros das subfamílias FGF-8 e FGF-9 em foliculos antrais bovinos, 89 p. Tese (**Doutorado em ciências Biológicas – Farmacologica**) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2012.

Miura R, Haneda S, Lee HH, Miyamoto A, Shimizu T, Miyahara K, Miyake YI, Matsui M (2014) Evidence that the dominant follicle of the first wave is more active than that of the second wave in terms of its growth rate, blood flow supply and steroidogenic capacity in cows. *Animal Reproduction Science*, **145**, 114-122.

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, **30**, 26-36.

Sas – Statistical Analysis System SAS user`s guide: statistics. **Versão 8.0**. Cary: SaS, 2000.

Siddiqui MAR and Ginther OJ (2014) Switching of largest follicle from dominant subordinate status when follicle and CL are in same ovary in heifers. *Theriogenology*, **82**, 259-265.

Sirois J and Fortune JE (1988) Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biology of Reproduction*, **39**, 308-317.

Sudo N, Shimizu T, Kawashima C, Kaneko E, Tetsuka M, Miyamoto A (2007). Insulin-like growth factor-I (IGF-I) system during follicle development in the bovine ovary: Relationship among IGF-I, type 1 IGF receptor (IGFR-1) and pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A). *Molecular and cellular Endocrinology*, **264**, 197-203.

Viana WS, Arashiro EKN, Machado MA, Camargo LSA, Siqueira LGB, Palho MP, Viana HM (2016) Intrafollicular oestradiol production, expression of the LH receptor (LHR) gene and isoforms, and early follicular deviation in Bos Indicus. *Csiro Publishing*. <http://dx.doi.org/10.1071/RD16284>.

Xu Z, Garverick HA, Smith GW, Smith MF, Hamilton SA, Youngquist RS (1995b) Expression of messenger ribonucleic acid encoding cytochrome P450 side-chain cleavage, cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase, and cytochrome P450 aromatase in bovine follicles during the first follicular wave. *Endocrinology*, **136**, 981-989.

Tabela 1. Volumes ( $\mu\text{L}$ ) para preparação da curva padrão de cDNA obtido a partir das células das granulosa do folículo dominante de vacas Nelore.

Padrão	Solução de Origem	Volume da solução de origem	Volume de H <sub>2</sub> O	Total
1	Pool cDNA	20	0	20
1:20	1	1	19	20
1:40	1:20	10	10	20
1:80	1:40	10	10	20
1:160	1:80	10	10	20

Abreviação: cDNA - Ácido Desoxirribonucléico Complementar

Tabela 2. Dinâmica folicular de vacas *Bos indicus* com presença de CL que receberam prostaglandina antes ou depois do desvio folicular.

	AD	DD	P
Diâmetro (mm)			
FD na PGF	6,76 $\pm$ 0,13	8,17 $\pm$ 0,13	0,001
FS na PGF	6,30 $\pm$ 0,20	6,80 $\pm$ 0,28	0,21
FD na OPU	11,86 $\pm$ 0,59	11,21 $\pm$ 0,38	0,41
FS na OPU	6,16 $\pm$ 0,42	6,97 $\pm$ 0,33	0,13
CL na PGF	19,61 $\pm$ 0,67	20,93 $\pm$ 0,96	0,35
CL na OPU	12,21 $\pm$ 0,56	13,80 $\pm$ 0,90	0,19
Taxa de crescimento (mm/dia)			
FD	1,30 $\pm$ 0,17	0,98 $\pm$ 0,09	0,21
FS	-0,04 $\pm$ 0,09	0,07 $\pm$ 0,14	0,05

Abreviações: AD - Antes do desvio. DD - Depois do desvio. FD-Folículo dominante. FS - Folículo subordinado. PGF-Prostaglandina. OPU - Aspiração folicular. CL - Corpo lúteo.

Tabela 3. Dados apresentados em (%) sobre a relação entre FD - CL, FD - FS e FD e primeira onda folicular (ipsilateral ou contralateral), no momento da administração da PGF<sub>2</sub> $\alpha$ .

	AD	DD	Combinado
Relação FD - CL, %.			
Ipsilateral	58,3 (7/12)	61,5 (8/13)	(15/25)
Contralateral	41,7 (5/12)	38,5 (5/13)	(10/25)
Relação FD - FS, %.			
Ipsilateral	41,7 (5/12)	46,1 (6/13)	(11/25)
Contralateral	58,3 (7/12)	53,9 (7/13)	(14/25)
Relação FD 1 <sup>a</sup> onda - FD 2 <sup>a</sup> onda, %.			
Ipsilateral	83,3 (10/12)	69,2 (9/13)	(19/25)
Contralateral	16,7 (2/12)	30,8 (4/13)	(6/25)

Abreviações: AD - Antes do desvio. DD - Depois do desvio. FD-Folículo dominante. FS-Folículo subordinado. PGF-Prostaglandina. OPU - Aspiração folicular. CL - Corpo lúteo.

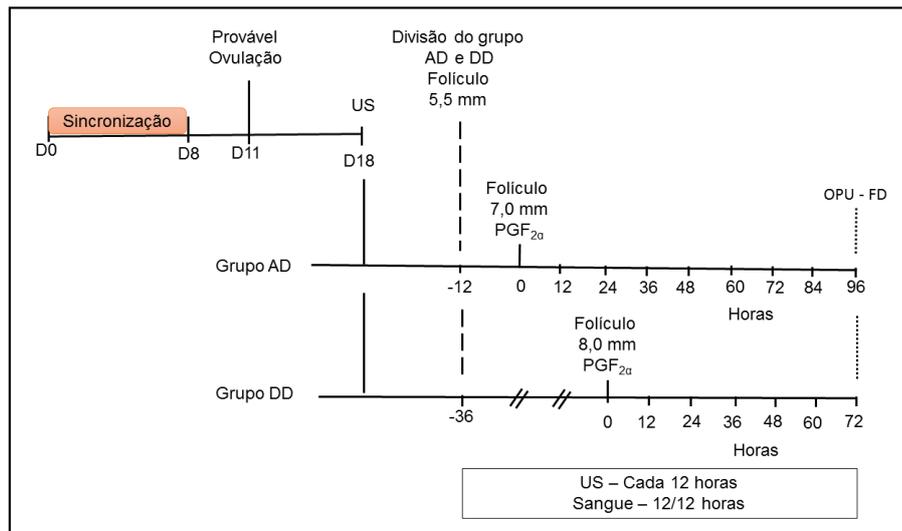


Figura 1. Diagrama do protocolo experimental: No D0 ao D8 - protocolo de sincronização da ovulação. No D11 - provável ovulação. No D18 - (US) início da avaliação ultrassonográfica a cada 12 horas. Na -12 e -36 horas - divisão do grupo de estudo antes do desvio (AD) e depois do desvio (DD) com folículo de 5,5 mm e coleta de sangue de 12/12 horas. Na 0 hora - administração de 500mg de PGF<sub>2α</sub>. Nas 72 e 96 horas - aspiração do folículo dominante (OUP- FD) para coleta de líquido folicular.

$$\text{Quantidade Relativa} = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta CT_{\text{alvo}}}}{(E_{\text{Ref}})^{\Delta CT_{\text{Ref}}}} \frac{(\text{média do controle} - \text{média da amostra})}{(\text{média do controle} - \text{média da amostra})}$$

Onde:

$E_{\text{alvo}}$  = Eficiência da PCR dos genes alvo.

Controle = grupo controle (calibrador).

Amostra = grupo teste.

$E_{\text{Ref}}$  = Eficiência da PCR do gene controle endógeno.

Figura 2. Modelo matemático utilizado para quantificação relativa dos genes

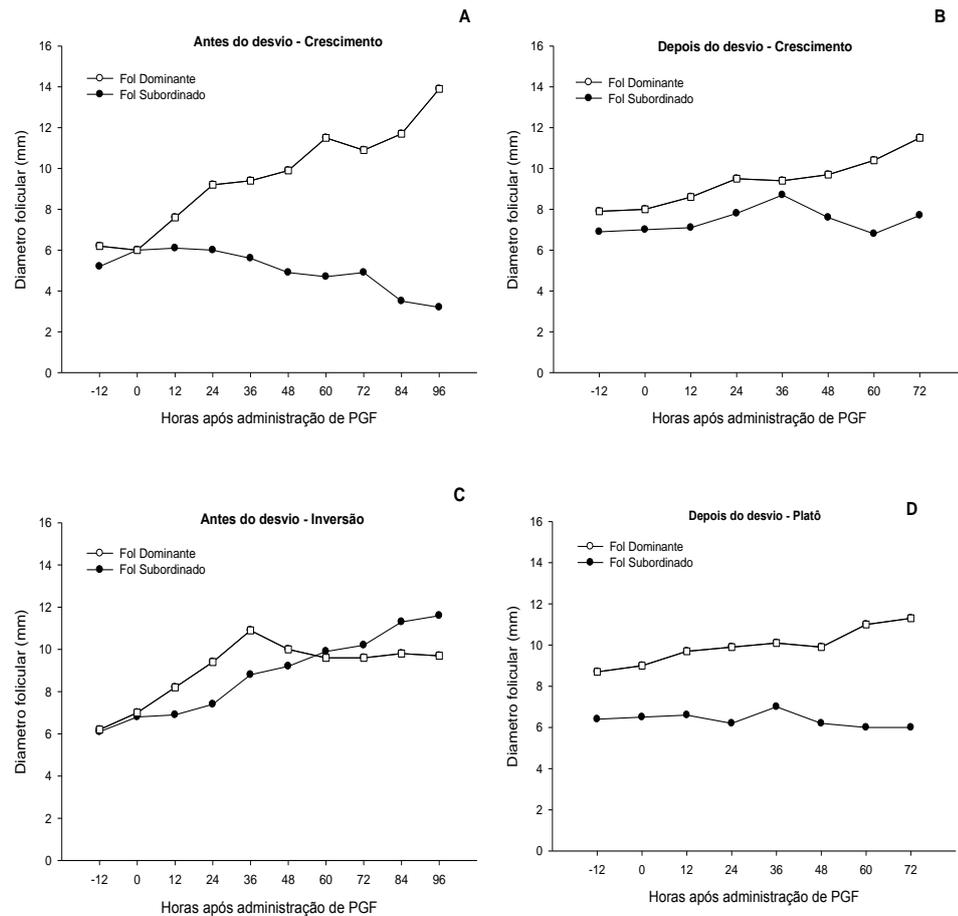


Figura 3. Diferentes padrões individuais de crescimento folicular observado por ultrassonografia durante a segunda onda folicular em vacas *Bos indicus* que receberam prostaglandina antes ou depois do desvio folicular. A) FD de 6,5 mm em crescimento contínuo acima de 0,5 mm por dia após administração de PGF e o FS entrou em atresia. B) FD de 8,2 mm em crescimento contínuo acima de 0,5 mm por dia após administração de PGF o FS, que também estava em crescimento, entrou em atresia às 36 horas. C) FD e FS (6,2 e 6,1 mm) em crescimento após administração PGF, logo na hora 60 apresentaram inversão de dominância folicular, em que o FS tornou-se dominante. D) FD de 8,7 mm em crescimento na hora 0 após administração da prostaglandina seu crescimento foi abaixo de 0,5 mm, mas não perdeu sua dominância.

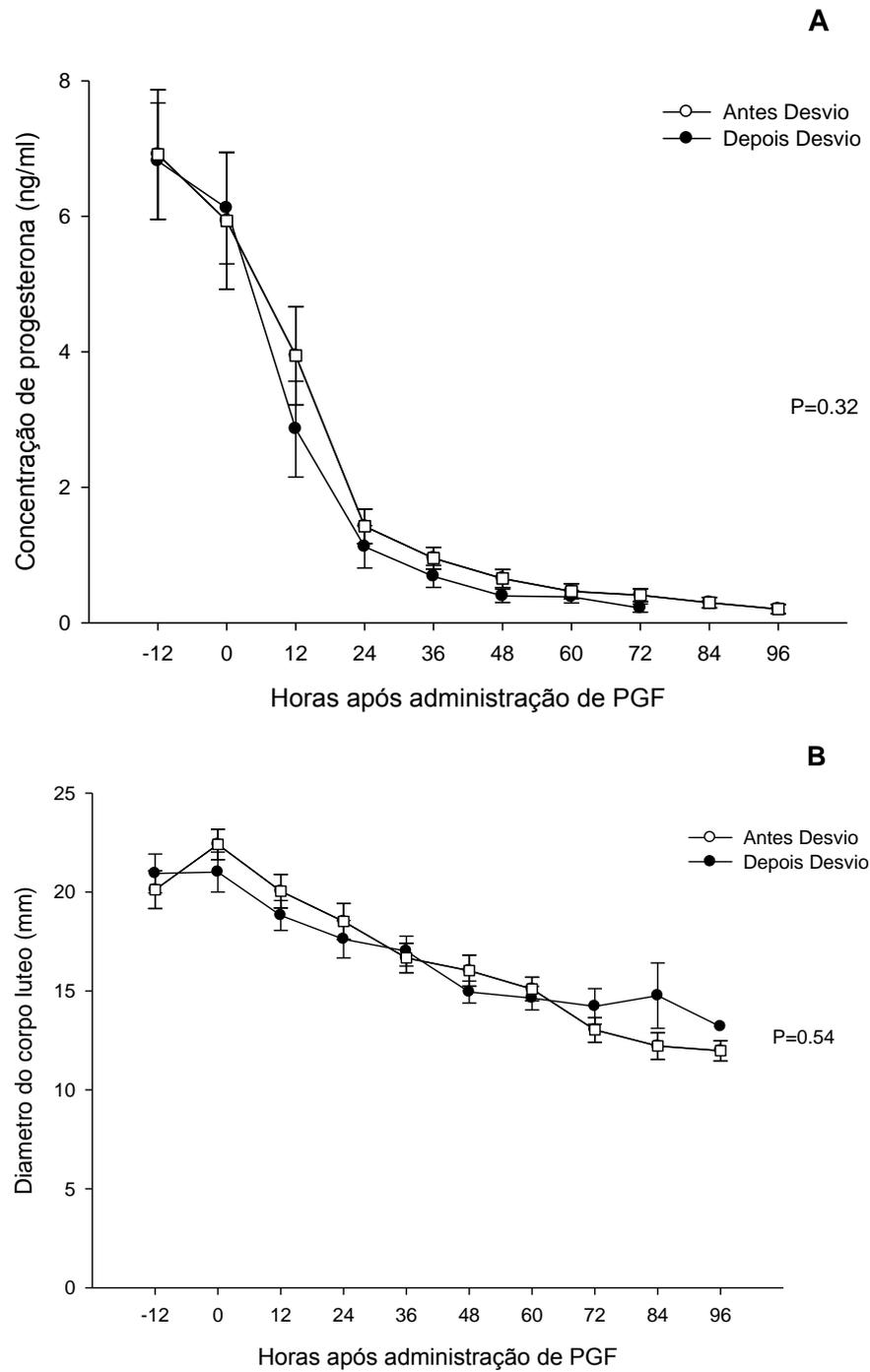


Figura 4. Concentração de progesterona (A) e diâmetro do corpo lúteo (B) em vacas *Bos indicus* que receberam prostaglandina antes e depois do desvio folicular.

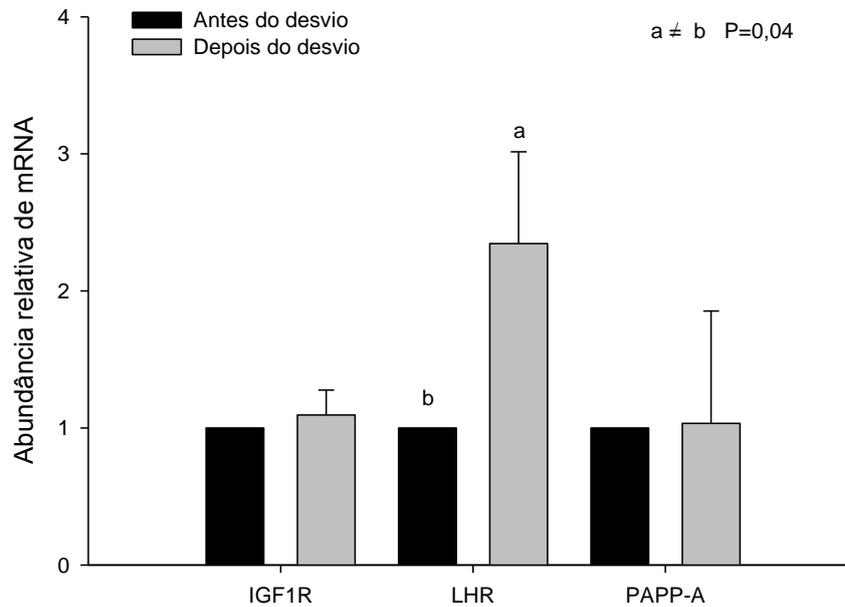


Figura 5. Abundância relativa dos genes média ( $\pm$ EPM) relacionados os grupo antes do desvio (AD) e depois do desvio (DD) obtidas após amplificação por PCR em tempo real. Foi utilizado como calibrador o grupo AD.

Genes	Sequência	Tamanho da amplificação (dp)	Temperatura de Anelamento ( $^{\circ}$ C)	Concentração (nM)	NCBI / Referencia
<i>PPIA</i> (constitutivo)	S 5' GCCATGGAGCGCTTTGG 3' A 5' CCACAGTCAGCAATGGTGATCT 3'	65	60	300	XM_005205570 Machado et al. 2012
<i>GAPDH</i> (constitutivo)	S 5' CCAACGTGTCTGTTGTGGATCTGA3' A 5' GAGCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG 3'	237	53	300	NM_001034034.2 Machado et al. 2012
<i>PAPPA</i>	S 5' CAGAATGCACTGTTACCTGGA 3' A 5' GCTGATCCCAATTCTTTCA 3'	204	60	300	XM_010798824 Luo et al. 2011
<i>LHR</i> (sem distinção de isoforma)	S 5' GGGAAATCAGCGTTGTCCCATTGA 3' A 5'GCATCCACAAGCTTCCAGATGTTACGA 3'	204	60	300	XM_005212546 Ereno et al. 2015
<i>IGF1r</i>	S 5' CCAAGCTAAACCGGCTCAAC 3' A 5' 3'TTATTACCAAGCCTCCAC 3'	189	55	300	XM_0115215162 Sudo et al. 2007

Quadro 1. Sequência dos primers específicos, temperaturas de pareamento, tamanho dos produtos e fonte de acesso às sequências no *GenBank* ou referências.