

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JOÃO GABRIEL VIANA DE GRÁZIA

**CARACTERIZAÇÃO E INVESTIGAÇÃO DAS BASES MOLECULARES
DE FENÓTIPOS ASSOCIADOS À PRODUÇÃO *IN VITRO* DE
EMBRIÕES EM RAÇAS LEITEIRAS TAURINAS E ZEBUÍNAS**

Juiz de Fora

2014

JOÃO GABRIEL VIANA DE GRÁZIA

**CARACTERIZAÇÃO E INVESTIGAÇÃO DAS BASES MOLECULARES
DE FENÓTIPOS ASSOCIADOS À PRODUÇÃO *IN VITRO* DE
EMBRIÕES EM RAÇAS LEITEIRAS TAURINAS E ZEBUÍNAS**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Raúl Marcel González Garcia
Co-Orientador: Prof. Dr. João Henrique Moreira Viana

Juiz de Fora

2014

Usar a folha de aprovação assinada pela banca

JOÃO GABRIEL VIANA DE GRÁZIA

**CARACTERIZAÇÃO E INVESTIGAÇÃO DAS BASES MOLECULARES
DE FENÓTIPOS ASSOCIADOS À PRODUÇÃO *IN VITRO* DE
EMBRIÕES EM RAÇAS LEITEIRAS TAURINAS E ZEBUÍNAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre. Área de concentração Genética e Biotecnologia.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Raúl Marcel González Garcia
(Universidade Federal de Juiz de Fora)

Prof. Dr. João Henrique Moreira Viana
(Embrapa Gado de Leite)

Profa. Dra. Alessandra Aparecida Vireque
(Universidade de São Paulo)

À Ciência, fonte de inspiração.

AGRADECIMENTOS

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

A FAPEMIG pelo financiamento e auxílio à pesquisa.

A EMBRAPA e Ativa Embriões por tornar esse trabalho possível.

Ao meu amigo e orientador Dr. João Henrique Moreira Viana, por toda atenção e ATP gasto comigo ao longo desses anos de convívio e por tanto me ensinar. Obrigado pela paciência e carinho!!!

Ao Prof. Dr. Raul Marcel pelos conhecimentos, apoio e confiança depositada em mim ao aceitar me orientar!!!

A amiga Ms. Sabine Wohlres-Viana, por toda ajuda na parte molecular desse experimento.

A Profa. Dra. Alessandra Vireque pela gentileza e boa vontade de aceitar avaliar meu trabalho e pela participação na banca.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas que contribuíram de alguma forma para minha formação acadêmico-científica.

Ao meu melhor amigo e eterno amor, vô BELMIRO! Fonte de toda inspiração e transpiração!

Aos meus queridos pai e mãe, por sempre me ajudarem com uma palavra de carinho e apoio nas horas de dificuldade e tornar meu caminho sempre mais fácil. Muito obrigado por tudo!!!!

A minha avó Rosinha, por ter feito parte de toda minha vida e estado ao meu lado em todos os momentos!!! Espero que possa desfrutar dessa conquista!

A minha melhor amiga e namorada Julliane (Ju), obrigada por tudo! Por servir de exemplo, por todos os ensinamentos, apoio, carinho e incentivo. Você tem parte nessa conquista!

Ao meu avô Silvio, por ser meu exemplo de caráter e por sempre se orgulhar de mim e minha avó-madrinha Mary por todo amor dispensado ao longo de tantos anos.

Aos meus amigos Lucas Loures Tavares e Robson Carvalho por sempre me incentivarem e me apoiarem.

Aos amigos do laboratório de Reprodução Animal pela parceria e amizade construída.

A todos os membros do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, por me receberem tão bem e por estarem sempre dispostos a me ajudar.

Enfim, minha sincera gratidão a todos que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

RESUMO

Na última década a produção *in vitro* de embriões tornou-se uma técnica de grande importância na reprodução de bovinos. No gado de leite, ela tem sido bastante utilizada com destaque para as raças Gir e Holandesa. Dentre outras características, essas duas raças apresentam diferenças relacionadas à fisiologia reprodutiva, com reflexo no potencial de produção de embriões no sistema *in vitro*. Sabendo da importância de ambas as raças para o rebanho brasileiro, é primordial entender as bases fisiológicas destas diferenças e buscar ferramentas para avaliação da qualidade e viabilidade de oócitos e embriões. O objetivo desse trabalho foi caracterizar o fenótipo “doadora” com base na produção de embriões e avaliar alguns genes como possíveis marcadores de produção nestas raças. Para isso, inicialmente foram analisados dados de um laboratório comercial de produção *in vitro* de embriões. Posteriormente, foi realizada a caracterização molecular e avaliação da expressão relativa de genes candidatos, utilizando-se a técnica de PCR em Tempo-Real, em amostras de células da granulosa cultivadas provenientes de animais com diferentes perfis de produção de embriões. Uma maior produção de complexos cumulus-oócito (COC) total e viáveis foi observado em doadoras da raça Gir. Da mesma forma, animais da raça Gir apresentavam maior taxa de conversão e maior produção total de embriões, independente da raça do touro utilizado para fertilização. Entretanto, nas duas raças não houve diferença na produção de COC entre animais com diferentes taxas de conversão COC/embrião. Não houve diferença na expressão dos genes (BAX, INHA, IGFIR, LHR, STAR) entre animais com alta ou baixa produção de embriões, assim como entre raças. No entanto, o gene PRDX1 estava sobre-expresso em doadoras da raça Holandesa caracterizadas como de alta produção de embriões. Esses resultados confirmam a maior produção de COC em animais da raça Gir, quando comparados aos animais da raça Holandesa, assim como, a maior produção total de embriões no sistema *in vitro*, mas sugerem que nas duas raças a eficiência na produção de embriões não é determinada pela produção total de COC. A avaliação da expressão gênica de células da granulosa obtidas de cultivos para a produção *in vitro* de embriões não possibilitou a caracterização de marcadores com potencial para predição da produção de embriões das doadoras.

Palavras-chave: Produção *in vitro* de embriões. Gir, Holandês. células da granulosa.

ABSTRACT

In the last years the in vitro production of embryos became a technique of great importance in the reproduction of cattle. In the dairy cattle, it has been widely used with spotlight for the Gyr and Holstein breeds. Among other features, this two breeds exhibit differences related to reproductive physiology and reflects on the potential of production of embryos in the system in vitro. Knowing the importance of both breed for the Brazilian herd, it is critical to understand the physiological basis of these differences and search tools to evaluate the quality and viability of oocytes and embryos. The aim of this study was to characterize the phenotype "donor" based on embryo production and evaluate some genes as potential markers for production in these breeds. To do this initially, data from in vitro production of embryos from a commercial laboratory were analyzed. Subsequently, the molecular characterization and evaluation of the relative expression of candidate genes was performed in samples of granulosa cells from culture of animals with different profiles of production embryos using the Real-time PCR. A higher production of total and viable oocyte-cumulus complexes (COC) was observed in donor Gyr. Likewise, animals Gyr had a higher conversion rate and higher total production of embryos, independent of breed of sire used for fertilization. However, in the two breeds there was no difference in the production of COC between animals with different conversion rates COC / embryo. There was no differences in the expression of genes (BAX, INHA, IGFIR, LHR, STAR) between animals with high or low production of embryos, as well as between breeds. However, the PRDX1 gene was overexpressed in donor Holstein characterized as high production of embryos. These datas confirm the higher production of COC in Gyr breed animals when compared to Holstein cows, as well as the highest total production of embryos in vitro system, but suggest that the two breeds efficiency in the production of embryos is not determined by the total production of COC. The assessment of gene expression of granulosa cells obtained from cultures for in vitro production of embryos did not allow the characterization of potential markers for predicting embryo production of donors.

Key-words: in vitro production embryos. Gyr. Holstein. Granulosa cells.

LISTA DE FIGURA

- Figura 1** Esquerda: Animal da raça Gir. Direita: Animal da raça Holandesa.31
- Figura 2** A- Fotografia mostrando a disposição das gotas de cultivo na placa de Petri de 35mm. .B-Fotografia mostrando as células da granulosa em monocamada após a retirada dos embriões.35
- Figura 3** Distribuição das doadoras da raça Holandesa baseado na produção de embriões (%)43
- Figura 4** Distribuição das doadoras da raça Gir baseado na produção de embriões (%).43
- Figura 5** Seleção hipotética de doadoras Holandês do 1º e 2º extrato com base na produção de COC.45
- Figura 6** Eletroforese em gel de agarose (2%) demonstrando a identificação do mRNA dos genes IGF-1r (peso molecular: 179pb), P450arom (peso molecular: 300pb), FSHr (peso molecular: 104pb), INHA (peso molecular: 83pb), CYP17A1 (peso molecular: 329pb), LHR2 (peso molecular: 223pb), LHR8 (peso molecular: 425pb), GAPDH (peso molecular: 237pb), β -actina (peso molecular: 205pb), PRDX1 (peso molecular: 224pb), BCL2 (peso molecular: 72pb), BAX (peso molecular: 174pb), STAR (peso molecular: 394pb), CASPASE3 (peso molecular: 359pb). PM, peso molecular (50pb); pb, pares de bases.....48
- Figura 7** Expressão relativa (média \pm EPM) dos genes IGF1R, INHA, BAX, PRDX1, STAR, LHR2 em células da granulosa co-cultivada com embriões de animais da raça Gir com alta e baixa produção.....50
- Figura 8** Expressão relativa (média \pm EPM) dos genes IGF1R, INHA, BAX, PRDX1, STAR, LHR2 em células da granulosa co-cultivada com embriões de animais da raça Holandesa com alta e baixa produção.50
- Figura 9** Expressão relativa (média \pm EPM) dos genes IGF1R, INHA, BAX, PRDX1, STAR, LHR2 em células da granulosa co-

cultivada com embriões de animais das raças Gir e Holandês com alta produção na PIVE (*, $p < 0,05$). 51

Figura 10 Expressão relativa (média±EPM) dos genes β -actina, IGF1R, INHA, BAX, PRDX1, STAR, LHR2 em células da granulosa co-cultivada com embriões de animais das raças Gir e Holandês com baixa produção na PIVE. 52

Figura 11 Expressão relativa dos genes B-actina, IGF1R, INHA, BAX, PRDX1, STAR, LHR2 nas células da granulosa co-cultivadas com embriões bovinos de vacas Gir e Holandês. Dentro de cada gene, o asterisco indica uma diferença significativa na expressão relativa. 53

Figura 12 Gel de acrilamida (8%) de algumas amostras resultantes da amplificação por PCR em Tempo-Real para os transcritos dos genes GAPDH (237 pb), β -actina (205 pb), INHA (83 pb), IGF1R (179 pb), PRDX1 (224 pb), BAX (174 pb), LHR2 (223 pb) e STAR (384 pb). 54

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Classificação dos complexos *cumulus*-oócitos recuperados por punção folicular guiada por ultrassom33
- Tabela 2** Sequência dos primers específicos utilizados para o estudo de expressão gênica em células da granulosa bovinos, temperaturas de ligação, tamanho dos produtos e fonte de acesso às sequências no GenBank e/ou referência bibliográfica.38
- Tabela 3** Quantificação realizada com 1 ul da amostra obtida após o procedimento de extração do RNA das células da granulosa para cada repetição por grupo.....36
- Tabela 4** Comparativo entre as raças Gir e Holandês com relação aos parâmetros de aspiração folicular.....41
- Tabela 5** Comparativo entre as raças Gir e Holandês com relação aos parâmetros de produção de embriões *in vitro*.42
- Tabela 6** Produção de COC e COC viáveis (média±EPM) em doadoras da raça Gir, ranqueadas em extratos de 20% baseado na produção de embriões (%).44
- Tabela 7** Produção de COC e COC viáveis (média±EPM) em doadoras da raça Holandesa, ranqueadas em extratos de 20% baseado na produção de embriões (%).44
- Tabela 8** Média (%) de produção de embriões de animais com alta produção de embriões da raça Holandesa e a variação de produção dos animais que tiveram células da granulosa coletadas para análise da expressão. Total de COC coletados e a quantidade de RNA (ug/ul) extraído das células.46
- Tabela 9** Média (%) de produção de embriões de animais com baixa produção de embriões da raça Holandesa e a variação de produção dos animais que tiveram células da granulosa coletadas para análise da expressão. Total de COC coletados e a quantidade de RNA (ug/ul) extraído das células.46
- Tabela 10** Média (%) de produção de embriões de animais com alta produção de embriões da raça Gir e a variação de produção dos animais que tiveram células da granulosa coletadas para

análise da expressão. Total de COC coletados e a quantidade de RNA (ug/ul) extraído das células.47

Tabela 11 Média (%) de produção de embriões de animais com baixa produção de embriões da raça Gir e a variação de produção dos animais que tiveram células da granulosa coletadas para análise da expressão. Total de COC coletados e a quantidade de RNA (ug/ul) extraído das células.47

Tabela 12 Eficiência da reação para cada gene utilizado para o estudo de expressão gênica das células da granulosa co-cultivadas com embriões bovinos.49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PCR	“Polymerase Chain Reaction” - Reação em Cadeia da Polimerase
DNA	“Deoxyribonucleic Acid” – Ácido Desoxirribonucleico
RNA	“Ribonucleic Acid” – Ácido Ribonucleico
cDNA	DNA complementar
mRNA	RNA mensageiro
OPU	“Ovum Pick-Up” – Aspiração folicular
COC	“cumulus-oocyte complex”- Complexo cumulus-oócito
FSH	“Follicle Stimulating Hormone” - Hormônio folículo estimulante
LH	“Luteinizing Hormone” - Hormônio Luteinizante
BSA	“Bovine Serum Albumi” - Albumina Sérica Bovina
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
INHA	Inibina A

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS (PIVE)	18
2.2 ORIGEM E CARACTERÍSTICAS DOS BOVINOS: BOS INDICUS E BOS TAURUS.....	20
2.3 CÉLULAS DA GRANULOSA: ORIGEM E IMPORTÂNCIA	22
2.4 GENES RELACIONADOS AO FUNCIONAMENTO DAS CÉLULAS DA GRANULOSA COM POTENCIAL IMPORTÂNCIA NA PIVE	23
2.4.1 BAX	24
2.4.2 PEROXIREDOXINA	25
2.4.3 LHR	26
2.4.4 INIBINA	27
2.4.5 IGF-I	28
2.4.6 StAR	29
3 OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4 ESTRATÉGIA DE AÇÃO E METODOLOGIA	31
4.1 LOCAL E ANIMAIS	31
4.2 DESENHO EXPERIMENTAL	32
4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	32
4.3.1 COLETA DOS COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITOS (COC)	32
4.3.2 PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES	33
4.3.2.1 Maturação in vitro dos complexos cumulus-oócito (COC).....	33
4.3.2.2 Fecundação in vitro dos oócitos	34
4.3.2.3 Cultivo in vitro dos presumíveis zigotos.....	34
4.3.3 COLETA E ARMAZENAMENTO DAS CÉLULAS DA GRANULOSA	35
4.3.4 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL	36
4.3.5 SÍNTESE DO cDNA	37
4.3.6 PRIMERS ESPECÍFICOS	37
4.3.7 PCR CONVENCIONAL	38
4.3.8 QUANTIFICAÇÃO DO CDNA POR PCR EM TEMPO-REAL.....	39

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
5 RESULTADOS	40
PARTE I	40
PARTE II	45
5.1 PCR CONVENCIONAL	47
5.2 PCR EM TEMPO-REAL	48
5.3 QUANTIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPO-REAL	49
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS	65
ANEXO A	76
ANEXO B	77
ANEXO C	80
ANEXO D	82
ANEXO E	94

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, o avanço das biotécnicas ligadas à reprodução possibilitou o melhor aproveitamento dos recursos genéticos disponíveis na bovinocultura, permitindo o melhoramento dos rebanhos e, no caso dos rebanhos leiteiros, aumento da produção média dos animais (KRUIP, BEVERS e KEMP, 2000). Dentre as biotécnicas da reprodução empregadas comercialmente na bovinocultura destacam-se a inseminação artificial, a transferência de embriões produzidos *in vivo* através da indução de múltiplas ovulações (MOET) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE) (MILAZZOTTO, VISINTIN e ASSUMPÇÃO, 2008). Tais biotécnicas têm como objetivo o maior progresso genético, obtido com a utilização tanto de touros quanto de vacas de elevado potencial genético (NEVES, MIRANDA e TORTORELLA, 2010). Apesar da importância inicial da MOET para o mercado de embriões, foi com a disseminação das técnicas de aspiração folicular ovariana e produção *in vitro* de embriões (PIVE) que o Brasil conseguiu ser responsável por mais de 25% dos embriões bovinos produzidos no mundo (VIANA et al., 2012).

Os avanços nas pesquisas em reprodução são fundamentais para o país manter esta posição de destaque no cenário mundial. Neste sentido, a identificação dos aspectos ligados à qualidade dos embriões produzidos *in vitro* e o aumento da eficiência da PIVE, particularmente em raças taurinas, são fundamentais. Contudo, diversos fatores podem influenciar os resultados da PIVE, incluindo variações individuais das doadoras, o ambiente folicular no qual os oócitos se desenvolvem, estacionalidade reprodutiva, fatores ligados ao sêmen, raça da doadora, qualidade do oócito e o ambiente de cultivo dos embriões (CAMARGO et al., 2007; LONERGAN et al., 2006). Sabe-se, por exemplo, que os oócitos provenientes de fêmeas da raça Holandesa apresentam menor competência nos processos de PIVE quando comparados àqueles provenientes de animais da raça Gir (CAMARGO et al., 2007).

A produção *in vitro* de embriões bovinos consiste essencialmente em três etapas, a maturação do oócito, a fecundação do oócito e o subsequente cultivo

do zigoto. O cultivo de embriões é uma das etapas que vem sendo estudada com o objetivo de melhorar as taxas de produção de embriões e de prenhez. Diversas formas de cultivo podem ser utilizadas, sendo uma das mais empregadas o co-cultivo com células somáticas oriunda dos próprios folículos, as células da granulosa ou células do *cumulus* que permanecem ao redor dos oócitos. Sabe-se que as células do *cumulus* contribuem na maturação do oócito e para melhores taxas de clivagem e desenvolvimento dos embriões de bovinos, ovinos e até de bubalinos (YADAV et al., 1998). Além disso, já foi relatada uma correlação positiva entre o aumento do número de células do *cumulus* em co-cultura e a competência de desenvolvimento, demonstrando a importância dessas células no desenvolvimento dos embriões (THOMPSON et al., 1995; HASHIMOTO, 2009).

Diferenças na produção de embriões *in vitro* entre raças zebuínas e taurinas são evidentes e podem estar relacionadas à diversos fatores, tais como a melhor adaptação ao ambiente tropical das raças zebuínas, diferenças no número de ondas de crescimento, momento da divergência, tamanho máximo dos folículos, persistência dos folículos dominantes, perfil de recrutamento folicular, alterações de expressão gênica, entre outras (RHODES et al., 1995; VIANA et al., 2000; SARTORELLI et al., 2005; CAMARGO et al., 2007, WOHLRES-VIANA, 2010) quando comparado com raças européias (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, 2006). Entretanto, a possibilidade do mal funcionamento das células da granulosa mantidas em co-cultivo, sabidamente importantes para o desenvolvimento do oócito e subsequentemente dos embriões, ainda não foi investigada. Existem poucos estudos na literatura sobre essas células no ambiente *in vitro*, principalmente mantidas em co-cultura (REGASSA et al., 2011) embora *in vivo* já tenha sido demonstrado algumas diferenças moleculares entre essas raças (WOHLRES-VIANA, 2013 dados não publicados), o que poderia ajudar a entender a diferença na eficiência das mesmas na PIVE. Além disso, a análise dessas células poderia ser uma ferramenta para avaliação da qualidade e viabilidade de oócitos e embriões (UYAR, TORREALDAY e SELI, 2013).

Existem diversos trabalhos na literatura sobre produção de embriões, no entanto, estudos visando entender o funcionamento das células da granulosa no sistema de cultivo são escassos, especialmente, trabalhos referentes a

expressão gênica dessas células co-cultivadas. Diante disso, o presente estudo tem como objetivos: 1) caracterizar as variações fenotípicas no potencial como doadora em animais das raças Gir e Holandesa, e 2) avaliar comparativamente o padrão de expressão gênica em células da granulosa co-cultivadas com embriões produzidos *in vitro* provenientes de animais das raças caracterizados como de alta ou baixa eficiência de produção de embriões na FIV.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS (PIVE)

O nascimento do primeiro bezerro produzido por FIV a partir de oócitos recuperados cirurgicamente ocorreu em 1981. Por falta de meios de cultivo confiáveis disponíveis na época, os embriões foram transferidos ainda no estágio de 4 células. Nas décadas seguintes, diversas tentativas de aumentar a eficiência da PIVE foram realizadas, e levaram ao desenvolvimento do protocolo padrão utilizado atualmente, no qual a transferência ocorre entre o 7^o e o 8^o dia pós-fecundação. Após estas alterações, diversos grupos começaram a focar no desenvolvimento dos meios de cultivo (JONES et al., 2001; BIGGERS, 2002; SUMMERS e BIGGERS, 2003; VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, 2006).

Embriões produzidos *in vitro* apresentam diversas diferenças em relação aos produzidos *in vivo*, tais como menor quantidade de células, maior acúmulo de lipídeos e menor criotolerância dentre outras (LONERGAN et al., 2003). Estas diferenças provavelmente são influenciadas por vários fatores, como raça, qualidade do oócito, ambiente intrafolicular, interação touro/vaca e ambiente de cultivo embrionário. Os embriões produzidos *in vitro* geralmente possuem uma coloração mais escura, menor número de células, menor compactação, formação precoce da blastocèle, e alterações na relação massa celular interna (ICM): células do trofoblasto, quando comparados àqueles que se desenvolvem

in vivo, assim como maior frequência de apoptose, menor tolerância à criopreservação e alterações na expressão gênica e metabolismo celular (KNIJN et al., 2002; CAMARGO et al., 2006; LONERGAN et al., 2006). Diversos transcritos que parecem estar envolvidos de forma importante no desenvolvimento pré-implantação são afetados pelo tipo de meio de cultivo e pelo tipo de suplemento protéico (KNIJN et al., 2002).

O desenvolvimento pré-implantação é caracterizado por eventos biológicos distintos, incluindo a primeira clivagem (divisão), ativação do genoma embrionário, compactação e formação do blastocisto com a derivação em duas linhagens celulares, a massa celular interna e as células do trofoderma. Estas mudanças requerem a expressão bem coordenada de genes (LONERGAN et al., 2006).

O estágio de blastocisto é essencial no desenvolvimento embrionário inicial, e é dependente da formação de junções que selam os espaços intercelulares na camada de células externa do trofoblasto, levando a formação de uma cavidade repleta de fluido no seu interior, denominada blastocele (OFFENBERG e THOMSEN, 2005). Segundo Knijn et al. (2002), blastocistos derivados de oócitos maturados com protocolos diferentes, mas cultivados de forma idêntica, não demonstraram diferenças significativas em relação à expressão dos genes avaliados. Desta forma, o ambiente de cultivo (pós-fecundação) pode estar relacionado com a alteração do padrão de expressão gênica no embrião, que por sua vez pode ter implicações na qualidade e viabilidade do blastocisto. Além disso, após a transferência, os embriões produzidos *in vitro* possuem menor potencial de implantação e desenvolvimento em relação aos embriões produzidos *in vivo*, o que frequentemente tem sido associado à ocorrência de anormalidades fetais e problemas perinatais (NUMABE et al., 2000; RIZOS et al., 2002; LONERGAN et al., 2006).

2.2 ORIGEM E CARACTERÍSTICAS DOS BOVINOS: BOS INDICUS E BOS TAURUS

A emergência da civilização moderna foi acompanhada, dentre outras coisas, pela adaptação e cruzamento de animais de cativeiro. No caso dos bovinos, a consequência disso foi o desenvolvimento de raças individuais diferindo em, por exemplo, produção de leite, qualidade da carne, tolerância ou resistência a doenças e pragas. No entanto, o genótipo e a história dos bovinos ainda não é conhecida em detalhes. Os bovinos ocorrem em dois grandes grupos geograficamente distintos taurinos (europeu, africano e asiático) e o indiano, ou zebu (sul-asiático e oeste-africano), os quais provavelmente divergiram a mais de 250 mil anos atrás (THE BOVINE HAPMAP CONSORTIUM, 2009).

Atualmente a maior parte do gado zebuino (*Bos indicus*) mundial vive em regiões entre o Trópico de Câncer e o de Capricórnio, onde a nutrição, o balanço térmico, a produção de leite e a reprodução estão sujeitas a temperaturas e umidade relativa altas. Os animais zebuínos já são bem adaptados a estas regiões, apresentando maior tolerância ao estresse térmico (CAMARGO et al., 2007). Já o gado taurino (*Bos taurus*) pode não ser uma opção viável para a produção de leite em países tropicais devido à sensibilidade ao calor e a ectoparasitos, com consequente queda na produção. Embora diversas raças taurinas tenham sido introduzidas nos Trópicos por desde os anos 1800, em um esforço para aumentar comparativamente os baixos níveis de produção leiteira do gado zebuino (GORDON, 2004).

As raças zebuínas contribuem de forma significativa para a indústria de carne e leite em países tropicais (BO, BARUSELLI e MARTINEZ, 2003). No entanto, as raças taurinas tem médias de produção de carne e leite mais elevadas, e um histórico relacionado com o melhorado genético mais antigo, que remonta ao século XIX. Dentre as raças zebuínas, a Gir se destaca como uma das principais raças leiteiras nos trópicos, sendo amplamente utilizada na América do Sul. No Brasil o melhoramento genético contribuiu para o aumento da produtividade desta raça. No entanto, ainda se observa um predomínio do gado Holandês em grandes fazendas de leite do Brasil (EMBRAPA GADO DE LEITE, 2010). A produção de animais mestiços utilizando o cruzamento Gir x

Holandês é uma estratégia adotada que permite aproveitar o vigor híbrido, aliando a resistência do gado zebuínico com a alta produção leiteira do gado taurino (FACÓ et al., 2008).

Raças zebuínas apresentam algumas particularidades em sua fisiologia ovariana, como no número de ondas de crescimento, momento da divergência, tamanho máximo, persistência dos folículos dominantes, perfil de recrutamento folicular, etc. (RHODES et al., 1995; VIANA et al., 2000; SARTORELLI et al., 2005), quando comparadas com raças europeias (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, 2006). Estas características podem determinar o maior número de pequenos folículos em crescimento nos ovários destes animais e, conseqüentemente, um maior número de COC recuperados por OPU (VIANA et al., 2004), quando comparados com resultados de *Bos taurus* (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, 2006). Em outro estudo, Carvalho et al. (2008) também descreveram um número maior de folículos sendo recrutados por onda de crescimento folicular em fêmeas zebuínas do que em taurinas (cerca de 34 e 25, respectivamente). Esta característica, particularmente, tem influência direta nos resultados obtidos pela técnica de transferência de embriões e de OPU-PIVE, uma vez que possibilita a coleta de um número maior de folículos, indicando uma vantagem do uso de fêmeas zebuínas sobre taurinas como doadoras (BARUSELLI, GIMENES e SALES, 2007).

Outras características podem ter relação com o melhor desempenho de fêmeas zebuínas na produção de gametas e embriões em regiões tropicais e subtropicais. Um exemplo seria a melhor adaptação desses animais ao ambiente. Embriões zebuínos tendem a atingir maiores taxas de desenvolvimento até o estágio de blastocisto, principalmente em períodos sazonais mais quentes, indicando que estes embriões podem possuir uma termotolerância maior do que os taurinos (CAMARGO et al., 2007).

A observação do comportamento de embriões zebuínos e taurinos em ambiente de cultivo *in vitro* sugere que exista alguma forma de regulação em resposta a este sistema que permita, bloqueie ou altere o desenvolvimento embrionário normal. A identificação de variações nos padrões de expressão gênica pode ser uma forma de avaliar se variações a nível molecular podem estar envolvidas na manifestação de alterações morfológicas associadas ao

ambiente de produção *in vitro*, e que sejam relacionadas com a raça dos animais utilizados como doadores dos oócitos (WOHLRES-VIANA, 2010).

2.3 CÉLULAS DA GRANULOSA: ORIGEM E IMPORTÂNCIA

Durante a vida fetal as células germinativas primordiais migram em direção a futura gônada, onde se diferenciam e sofrem mitoses, gerando uma população de oogonias. Em um determinado momento estas iniciam a primeira divisão meiótica, transformando-se então em oócitos. Os folículos primordiais são geralmente formados antes do nascimento, quando os oócitos ainda retidos na prófase da primeira divisão meiótica são envolvidos por uma simples camada de células achatadas, que darão origem às células da granulosa. Um mecanismo de seleção recruta folículos primordiais ao crescimento e desenvolvimento e, nesse processo, as células da granulosa que circundam o gameta se tornam cuboidais, diferenciando-se em células da granulosa e formam o folículo primário. A partir desse momento, estas células proliferam e formam múltiplas camadas em torno do oócito, originando o folículo secundário. A partir deste estágio, um segundo tipo de célula somática surge nos folículos, as células da teca (FAIR et al., 1997). O folículo terciário ou antral inicial se forma no momento que começa a surgir uma cavidade preenchida de fluido no folículo, denominada antro. Com o estímulo adequado, os folículos antrais crescem e formam os chamados folículos preovulatórios. Neste processo, existe uma separação gradual de dois subgrupos de células da granulosa, as células do *cumulus*, que estão em contato mais próximo com o oócito e, as células da granulosa mural, que revestem o antro (UYAR, TORREALDAY e SELI, 2013).

Todo o processo de desenvolvimento folicular até a ovulação depende de uma estreita e precisa comunicação, bem como do bom funcionamento da maquinaria molecular, entre células somáticas foliculares e o oócito (UYAR, TORREALDAY e SELI, 2013). As células do *cumulus* comunicam-se umas com as outras e com o oócito através de junções do tipo gap, através das quais diversos fatores são transportados. A foliculogenese é regulada por fatores

extraovarianos e intraovarianos, e membros da superfamília TGFbeta são importantes reguladores da proliferação e diferenciação celular, alguns deles são expressos pelo oócito e são necessários para o desenvolvimento dos folículos (ELVIN, YAN e MATZUK, 2000). Dentre esses, pode-se citar o IGF que é necessário para a formação dos folículos primordiais (SOYAL, AMLEH e DEAN, 2000). O fator de crescimento de diferenciação 9 (GDF-9) que é produzido pelo oócito do estágio de folículo primário até o momento da ovulação (McPHERRON e LEE, 1993; McGRATH, ESQUELA e LEE, 1995) e a proteína morfogênica do osso 15 (BMP-15) que possui um papel conjunto com GDF-9 durante a foliculogênese participando na ativação do folículo primordial (YAN et al., 2001).

Sabe-se que as células do *cumulus* contribuem na maturação do oócito e para melhores taxas de clivagem e desenvolvimento dos embriões bovinos, ovinos e até de bubalinos (YADAV et al., 1998). Além disso, em sistemas de cultivo não definidos, quando se utiliza soro fetal bovino, a co-cultura com células somáticas (células da granulosa ou do *cumulus*) pode ser utilizada, uma vez que essas células contribuem para o desenvolvimento do embrião removendo substâncias prejudiciais e secretando fatores embriotróficos, tais como fatores de crescimento (BAVISTER, 1995). Além disso, já foi relatada uma correlação positiva entre o aumento do número de células do *cumulus* em co-cultura e a competência de desenvolvimento, demonstrando a importância dessas células no desenvolvimento dos embriões (THOMPSON et al., 1995; HASHIMOTO, 2009).

2.4 GENES RELACIONADOS AO FUNCIONAMENTO DAS CÉLULAS DA GRANULOSA COM POTENCIAL IMPORTÂNCIA NA PIVE

Técnicas para análise de expressão gênica têm se tornado ferramentas importantes na identificação de transcritos relacionados a diversas vias metabólicas em vários tipos celulares, permitindo a utilização do mRNA para avaliar, de forma indireta, tanto o comportamento intrínseco das células quanto

respostas a condições experimentais. Tais avaliações permitem a geração de dados sobre a influência, por exemplo, de um determinado sistema de cultivo sobre as células da granulosa. Neste caso, os genes avaliados fornecem um panorama geral sobre o status funcional das células mantidas em co-cultivo.

2.4.1 BAX

A apoptose, ou morte celular programada, pode ser definida como um processo regulatório complexo que controla a morte celular por mecanismos intrínsecos. A família de proteínas Bcl-2 é uma das responsáveis pela regulação da maquinaria apoptótica. Os membros desta família podem ser subdivididos em duas categorias de acordo com sua função: (1) membros anti-apoptóticos, como Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, A1 (Bfl-1), NR-13, e Boo (Diva), os quais exercem atividade anti-morte celular, e (2) membros pró-apoptóticos, como Bax, Bak, and Bok (Mtd), Bid, Bad, Bim, Bik, Blk, Hrk (DP5), Bnip3, BimL, e Noxa (ZIMMERMANN, BONZON e GREEN, 2001).

As proteínas que compõe a família Bcl-2 são consideradas as principais reguladoras de apoptose nas mitocôndrias controlando a permeabilidade da membrana e a liberação do citocromo c, que é uma proteína solúvel em água com carga positiva que se encontra no espaço intermembrana e atua na cadeia respiratória. Os domínios homólogos conservados junto a regiões transmembrana são responsáveis, coletivamente, pelas interações proteína-proteína, assim como pela habilidade de formar poros ou canais de íons nas membranas intracelulares. Enquanto, os membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, promovem a liberação do citocromo c mitocondrial, os membros anti-apoptóticos contrariamente agem de forma a prevenir esta perturbação (JOHNSON, 2003; ZIMMERMANN, BONZON e GREEN, 2001).

A proteína Bax se localiza no citosol (BUDD et al., 2004; ZIMMERMANN, BONZON e GREEN, 2001). Durante a apoptose, ela é ativada; provavelmente por uma mudança conformacional, e translocada para a mitocôndria onde pode então formar canais e liberar as proteínas contidas dentro do espaço

intermembrana, incluindo uma proteína-chave, o citocromo c. Esta proteína é codificada por um gene nuclear, mas quando é importada para a mitocôndria, se liga a um grupo heme e se torna um holocitocromo c, e é apenas esta forma que induz a ativação da caspase, que é a principal proteína mediadora da apoptose (ZIMMERMANN, BONZON e GREEN, 2001).

O desenvolvimento da biologia molecular tem propiciado uma melhor compreensão dos mecanismos biológicos celulares e dentre eles da apoptose. Essa característica das células eucarióticas, considerada uma forma programada de morte celular, é um processo de regulação de populações e linhagens celulares nos sistemas de mamíferos. É caracterizada por fragmentação citoplasmática e nuclear, condensação de cromatina e fagocitose (VANDAELE et al., 2007) e já foi demonstrada que as condições de cultivo *in vitro* podem afetar a extensão da apoptose em embriões (GJORRET et al., 2007; WARZYCH et al., 2007).

2.4.2 PEROXIREDOXINA

O metabolismo aeróbico basal leva a uma produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) como o superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e radical hidroxil ($OH\cdot$). Além disso, as técnicas de produção *in vitro* expõem tanto os embriões quanto as células somáticas mantidas em co-cultivo, que não se beneficiam da proteção antioxidante materna, ao oxigênio atmosférico (20% de O_2 em vez de cerca de 7% no oviduto), a luz visível, e a vestígios de metais pesados no meio de cultivo. Todos estes fatores são responsáveis por um aumento na produção de ROS, que pode induzir efeitos prejudiciais nos embriões, como quebras do DNA, danos mitocondriais, bloqueio do desenvolvimento, e apoptose (GUERIN, EL MOUATASSIM e MENEZO, 2001; LEYENS, DONNAY e KNOOPS, 2003).

Para ajustar os níveis de ROS e para a proteção contra o estresse oxidativo, oócitos e embriões possuem diversos sistemas antioxidantes, entre eles a glutathione e os antioxidantes enzimáticos clássicos incluindo as

superóxido dismutases, catalase, e glutathione peroxidases (GUERIN, EL MOUATASSIM e MENEZO, 2001). E por fim, as peroxiredoxinas (PRDXs) que formam a última família de enzimas antioxidantes descoberta (CHAE, CHUNG e RHEE, 1994). Em mamíferos esta família é composta por seis isoformas, denominados de PRDX1 a PRDX6 (LEYENS, DONNAY e KNOOPS, 2003) e todas diferem em sua localização celular, com as PRDX1, 2 e 6 localizadas principalmente no citosol, a PRDX3 restrita à mitocôndria, a PRDX4 presente no retículo endoplasmático e a PRDX5 distribuída no núcleo, mitocôndria e peroxissomos (ABBAS, BRETON e DRAPIER, 2008). Segundo Leyens, Donnay e Knoop (2003), os transcritos que codificam as seis isoformas de PRDX podem ser detectadas durante o desenvolvimento de embriões bovinos, apresentando diferentes padrões de expressão, com algumas peroxiredoxinas apresentando um perfil contínuo (PRDX1 e PRDX5), uma expressão tardia (PRDX4) ou uma expressão interrompida no período da ativação do genoma embrionário.

Pouco se sabe sobre a regulação da expressão gênica das PRDXs. Apenas a PRDX1 têm sido objeto de profunda investigação neste caso. Sabe-se atualmente que a expressão da PRDX1 é sobre-regulada em resposta a vários tipos de estresse, incluindo estímulos oxidativos (ABBAS, BRETON e DRAPIER, 2008).

2.4.3 LHR

Os eventos fisiológicos envolvidos no recrutamento folicular, crescimento, seleção, dominância e ovulação não são ainda completamente entendidos. O hormônio luteinizante (LH) tem um papel central na regulação da função ovariana, e isso é em parte responsável pela ovulação e transformação das células foliculares em células luteais (SMITH, MCINTUSH e SMITH, 1994). A ação do LH é mediada pela ligação ao seu receptor (LHR), que fica inserido na membrana celular. Já foi relatado que a expressão temporal desses receptores é diferentes entre as células foliculares, no entanto, o padrão de expressão do

LHR nas células foliculares não foi ainda bem explicado. Contudo, estudos indicam que esses receptores aparecem em maior concentração nas células da granulosa no momento do estabelecimento da dominância do folículo (WOHLRES-VIANA et al., 2013, dados não publicados).

A competência de desenvolvimento dos oócitos é também parcialmente associada com o crescimento do folículo. Provavelmente, os diferentes tipos celulares que compõem o folículo estão em estreita associação uns com os outros e o *status* de maturação dos oócitos é refletido pelas células da granulosa que estão ao seu redor. Porém, os dois tipos de células foliculares influenciam no padrão de expressão do LHR, uma vez que o transcrito do gene não é detectado nas células do *cumulus* ao redor do oócito enquanto está presente nas células da granulosa mural (ROBERT et al., 2003).

2.4.4 INIBINA

Inibinas e Activinas são glicoproteínas diméricas consistindo de subunidades α e β . Ambas estão presentes no fluido folicular em bovinos (KNIGHT e GLISTER, 2001). Mudanças pós-traducionais são responsáveis por várias formas dimérica e monomérica, está sem a subunidade α , da inibina que pode estar presente nas várias formas no fluido folicular. Esse hormônio aumenta a produção de andrógeno induzido por LH nas células foliculares, mas especificamente, nas células da teca de alguns mamíferos, dentre eles os bovinos. A maioria das formas diméricas da inibina presente no fluido folicular de bovinos são de alto peso molecular, já as formas diméricas menores estão presentes em concentrações mais baixas (IRELAND et al., 1994, 1994; AUSTIN et al., 2001).

Segundo Beg e Ginther (2006), a inibina-A assim como Activina não tem papel central no processo de divergência em bovinos. Mas a razão activina:inibina sugere ser um parâmetro potencialmente importante na regulação da foliculogenese (GLISTER et al., 2001).

2.4.5 IGF-I

O sistema IGF inclui IGF-I e -II, IGFBPs IGFBP proteases (SPICER, 2004). Dentre esses, IGF-I estimula a proliferação das células da granulosa, via receptor do tipo I do IGF (IGFIR) que é uma tirosina quinase transmembrana semelhante ao receptor de insulina (MANI et al., 2010). A expressão do receptor de IGF-I apresenta níveis diferentes de expressão entre os diferentes tamanhos de folículos e existe uma tendência a aumentar os locais de ligação do IGF-I durante o desenvolvimento dos folículos (SCHAMS e BERISHA, 2002; WANDJI, PELLETIER e SIRARD, 1992). Esse fator sinergiza com gonadotrofinas para promover a diferenciação das células foliculares (SPICER e ECHTERNKAMP, 1995). Além disso, esse sistema através do IGF-I é um participante precoce no mecanismo de divergência folicular. Já no ambiente *in vitro*, os efeitos do IGF-I incluem o aumento da proliferação das células da granulosa e a produção de estradiol, aumentando a sensibilidade das células da granulosa ao FSH, além de aumentar a secreção de inibina A e STAR. Já nas células da teca, aumenta a estimulação de LH de síntese de andrógeno (STEWART et al., 1995; GLISTER et al., 2001).

Não foi encontrado nenhuma diferença na expressão do mRNA do receptor do IGF-I entre folículos pequenos, médios e grandes (ARMSTRONG et al., 2000). Portanto, o IGFIR parece não ser um fator limitante para ação do IGFI sobre as células da granulosa (ARASHIRO, 2012). Em bovinos, existem diferenças no funcionamento do sistema IGF entre taurinos e zebuínos. Já foi demonstrado que o IGFI se encontra em concentração maior nos zebuínos do que nos taurinos (ALVAREZ et al., 2000). Assim como já foi demonstrado uma diferença de expressão entre as raças Gir e Holandês durante as fases de crescimento folicular (ARASHIRO, 2012).

2.4.6 StAR

Uma característica crítica das células da granulosa ovariana é a diferenciação do folículo ovulatório para corpo lúteo, o qual produz principalmente progesterona, sendo de extrema importância para manutenção da gestação (MORITA et al., 2012). Um passo chave no processo para síntese de hormônios esteroides, é o transporte do colesterol das reservas intracelulares para a membrana mitocondrial interna, onde se localiza o sistema de clivagem e irá acontecer o processamento da molécula (PESCADOR, STOCCO e MURPHY, 1999; DEVOTO et al., 2002). A mobilização e entrega do colesterol para as mitocôndrias é dependente de ligante na células esteroideogênicas ovarianas. Uma das proteínas envolvidas nesse processo é a STAR (Steroidogenic Acute Regulatory Protein) que são expressas nas células esteroideogênicas e foi caracterizada em 1994 por Clark e colaboradores. Hoje essa proteína é reconhecida como sendo essencial para o desenvolvimento e manutenção do corpo lúteo (MORITA et al., 2012).

O gene Star é expresso tanto nas células da teca quanto da granulosa luteinizadas (POLLACK et al., 1997). O padrão de expressão é consistente com a resposta ao pico de LH, o que leva a indução desse gene ainda no folículo dominante, que irá formar o corpo lúteo. A ação do LH na expressão de STAR é aumentada por IGFs (DEVOTO et al., 2002) e já foi demonstrado que quando estimulado por GDF-9, leva a produção de progesterona (ELVIN, YAN e MATZUK, 2000). A StAR parece ser determinante para a esteroideogênese luteal, sendo mais expresso nas fases inicial e intermediária do corpo lúteo e apresentando um declínio na fase final, e parece que essa supressão no final da fase luteal é responsável por iniciar a luteólise funcional (DEVOTO et al., 2002).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar fenótipos associados à produção *in vitro* de embriões em raças leiteiras zebuínas e taurinas e investigar as bases moleculares relacionadas ao fenótipo eficiência na PIVE por meio da avaliação das variações de expressão gênica nas células da granulosa utilizadas em co-cultivo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Investigar a relação entre produção de oócitos, produção total de embriões e taxa de produção de embriões *in vitro* nas raças Gir e Holandesa;
- 2) Caracterizar extratos de desempenho na PIVE passíveis de definição como fenótipos;
- 3) Investigar a possibilidade da utilização da avaliação de variações no padrão de expressão gênica das células da granulosa como marcadores de potencial de PIVE, utilizando como alvo alguns genes importantes para o funcionamento das mesmas, tais como LHR, IGFIR, STAR, PRDX1, BAX e INIBINA.

4 ESTRATÉGIA DE AÇÃO E METODOLOGIA

4.1 LOCAL E ANIMAIS

O presente experimento foi realizado no laboratório comercial de produção *in vitro* de embriões bovinos, Ativa Embriões, localizado em Juiz de Fora, MG, e no Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite. Foram utilizados dados e material biológico (células da granulosa) associados ao processo de produção *in vitro* de embriões de doadoras das raças Gir (n= 266) e Holandesa (n= 270) (Figura 1), provenientes de rebanhos diferentes das regiões da zona da mata mineira, vertentes e sul do estado do Rio de Janeiro, e com histórico reprodutivo (idade, número de aspirações, taxa de produção de oócitos e embriões) conhecido.



Figura 1: Esquerda: Animal da raça Gir. Direita: Animal da raça Holandesa.

Fonte: Arquivo pessoal e Embrapa Gado de Leite

4.2 DESENHO EXPERIMENTAL

A primeira parte do experimento consistiu da análise dos resultados da produção *in vitro* de embriões de doadoras das duas raças, considerando-se parâmetros quantitativos (número de oócitos recuperados por aspiração e de embriões produzidos) e qualitativos (taxa de produção de embriões por oócitos viáveis utilizados para fecundação).

A segunda parte do experimento consistiu da análise do padrão de expressão gênica de células da granulosa obtidas de co-cultivo utilizados na produção de embriões, e selecionados de doadoras com diferentes perfis de desempenho no processo.

4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.3.1 COLETA DOS COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITOS (COC)

A aspiração folicular foi realizada com auxílio de um aparelho portátil de ultrassonografia equipado com transdutor setorial de 7,5 MHz adaptado para exame intravaginal e com guia para agulha de biópsia (Aquila, Esaote-Pie Medical, Maastricht, Holanda). Agulhas descartáveis (20 G) foram acopladas a um sistema de vácuo com pressão aproximada de 50 mmHg ou equivalente ao fluxo de 11 mL por minuto. O líquido folicular e complexos *cumulus*-oócitos foram aspirados para um tubo de 50 mL contendo 10 mL de Dulbecco's PBS (DPBS) (Nutricell, Campinas, SP, Brasil), suplementado com 5% de soro fetal bovino (Nutricell) e 100UI de heparina sódica (Liquemine, Roche, Basileia, Suíça), e aquecido a 36°C. Todos os COC recuperados (n= 8.664; sendo 6.183 da raça

Gir e 2.681 da raça Holandesa) foram mantidos em criotubos devidamente identificados com meio tamponado, e transportados para o laboratório em intervalo de 3 a 12 horas a 37°C. Ao chegar no laboratório, os COC foram classificados segundo Viana et al., 2004 (Tabela 1), por uma mesma pessoa, e somente os viáveis (Grau I, Grau II e Grau III) foram considerados.

Tabela 1: Classificação dos complexos cumulus-oócitos recuperados por punção folicular guiada por ultrassonografia.

Classificação	Descrição
Grau I	COC compacto, mais do que 3 camadas de células do <i>cumulus</i> e oócito com citoplasma homogêneo
Grau II	COC compactos, com 3 ou menos camadas de células do <i>cumulus</i> , ou oócito com citoplasma levemente heterogêneo
Grau III	Oócitos mostrando remoção completa das células do <i>cumulus</i> em menos de 1/3 da superfície da zona pelúcida
Desnudo e/ou degenerado	Oócitos com nenhuma célula do <i>cumulus</i> sobre a maior parte da da zona pelúcida e/ou vacuolização retração do citoplasma
<i>Cumulus</i> expandido	COC mostrando expansão das células do <i>cumulus</i> .

Adaptado de Viana et al., 2004

4.3.2 PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES

4.3.2.1 Maturação *in vitro* dos complexos *cumulus*-oócito (COC)

A maturação *in vitro* dos COC foi realizada em meio TCM 199 (Gibco) crescido de 10% de soro fetal bovino, FSH, LH e estrógeno, piruvato e antibiótico em gotas de 70µL, na estufa incubadora a 38,8 °C, com 5% de CO₂ em ar atmosférico e 95% de umidade, por 24 horas. Os oócitos (de 1 a 30 oócitos por gota) de cada doadora foram colocados em gotas separadas.

4.3.2.2 Fecundação *in vitro* dos oócitos

Os COC maturados foram fecundados utilizando sêmen de touros provados obtidos das centrais especializadas na comercialização de sêmen. Para preparação dos espermatozoides foi utilizado o método do gradiente de Percol (*Invitrogen*), realizado com os gradientes de 45% e 90%. A fecundação foi realizada na gota de 60 μ L de meio FIV (Vitrogen) contendo heparina e com 2x10⁶ espermatozoides/mL, sob óleo mineral, por um período de aproximadamente de 18-22 horas, nas mesmas condições atmosféricas da maturação.

Em função da utilização de touros tanto da raça Gir quanto da raça Holandesa, para efeito de análise os dados foram segmentados em grupos conforme o cruzamento (doadora x touro): G1 - Holandês x Holandês (n=137), G2 - Gir x Gir (n=106), G3 – Holandês x Gir (n=132), G4 – Gir x Holandês (n=161).

4.3.2.3 Cultivo *in vitro* dos presumíveis zigotos

Para o cultivo dos presumíveis zigotos, foi utilizado CR4aa (Vitrogen) contendo, soro fetal bovino e BSA. Os embriões (n= 2.440; sendo 1.745 da raça Gir e 695 da raça Holandês) foram co-cultivados com células da granulosa nas mesmas condições da fecundação, no entanto em gotas de 50 μ L, sob óleo mineral, mantendo a quantidade de COC colocados inicialmente na MIV. Após 72 horas do início do cultivo, foi realizado o primeiro *feeding*, que consiste na troca de 50% do meio e a taxa de clivagem avaliada. No sexto dia foi realizado novamente o *feeding*. No sexto e sétimo dia após a fecundação a taxa de blastocisto foi avaliada.

4.3.3 COLETA E ARMAZENAMENTO DAS CÉLULAS DA GRANULOSA

As células da granulosa foram coletadas dos co-cultivos utilizados na produção dos embriões, no sétimo dia de cultivo (Figura 2). As amostras de células foram coletadas individualmente para cada doadora. As células foram submetidas a duas lavagens com PBS a 4 °C seguida de centrifugações a uma velocidade de 2.500 rpm (ANEXO A). O *pellet* resultante foi ressuspensionado em 30 µL de RNA *later* (AmbionRNAlater) sem nenhuma diluição. A manutenção das células nessa substância possibilita que todo o RNA seja conservado até a análise. As amostras foram armazenadas em microtubos devidamente identificados e mantidas a –80°C até a extração do RNA.

A divisão dos grupos foi realizada com base no resultados da primeira parte do trabalho e foi considerando o seguinte critério: Holandês de alta eficiência de produção de embriões *in vitro* (taxas de produção de 50% a 100%), Holandês de baixa produção (taxas de produção de 0% a 10%), Gir de alta produção (taxas de produção de 50% a 100%) e Gir de baixa produção (taxas de produção de 0% a 17%).

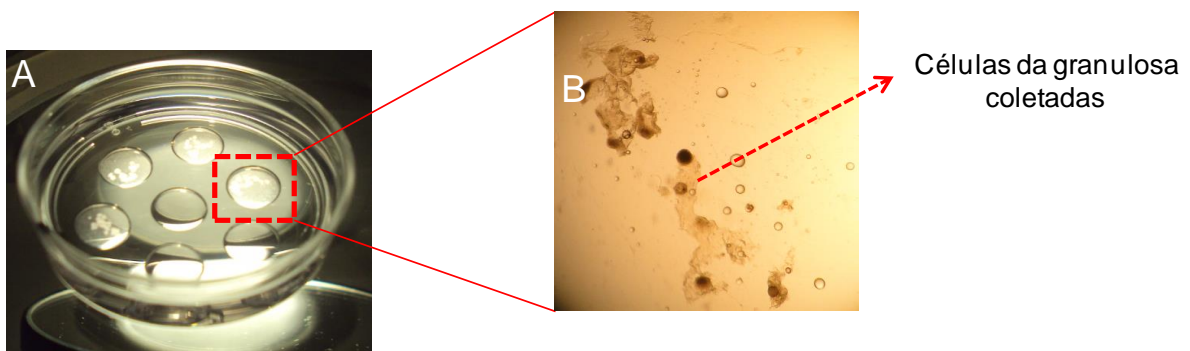


Figura 2: A- Fotografia mostrando a disposição das gotas de cultivo na placa de Petri de 35mm. B-Fotografia mostrando as células da granulosa em monocamada após a retirada dos embriões. Fonte: Arquivo pessoal

4.3.4 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

A extração do RNA foi realizada utilizando-se o kit comercial *RNeasy Micro kit* (Qiagen, Germany) de acordo com as especificações do fabricante. Resumidamente, a lise das células foi realizada por tampão RLT acrescido de 10% de β -Mercaptoetanol (β -ME), o lisado foi então homogeneizado, acrescido de etanol 70% e filtrado. Para lavagem foi adicionado tampão RW1. Em seguida, foi realizada a incubação com solução de DNase por 15 min. Após este período ocorreu novamente a lavagem com o tampão RW1 e em seguida com o tampão RPE. Posteriormente foi feita a adição de etanol a 80% na coluna e centrifugação para secar a membrana onde se encontrava o RNA. Para eluição, foram utilizados 14 μ L de água RNase-free, gerando um volume final de aproximadamente 13 μ L (ANEXO B). Antes da síntese do cDNA foi realizada a quantificação do RNA extraído utilizando 1 μ L de cada amostra com o auxílio do espectrofotômetro ND-1000 (Nanodrop, Wilmington, DE, EUA).

Na Tabela 3 está demonstrada a quantidade de RNA obtida em cada amostra utilizada nesse experimento. Foram extraídos um total de 62 amostras, sendo 17 do grupo Gir de alta produção, 19 do Holandês de alta produção, 16 do Gir de baixa produção e 10 do Holandês de baixa produção.

Tabela 2: Quantificação realizada com 1 μ L da amostra obtida após o procedimento de extração do RNA das células da granulosa para cada repetição por grupo.

Grupo	Quantificação do RNA (ng/μL)
Alta produção	
Gir 1	12,7
Gir 2	18,6
Gir 3	16,4
Gir 4	19,9
Gir 5	23,3
Gir 6	17,7
Holandês 1	12,8
Holandês 2	12,4
Holandês 3	12,2
Holandês 4	14,5
Holandês 5	19,9
Holandês 6	12,5

Baixa produção	
Gir 1	21,4
Gir 2	13,2
Gir 3	23,5
Gir 4	15,1
Gir 5	14,7
Gir 6	13,9
Holandês 1	20,3
Holandês 2	21,0
Holandês 3	19,4
Holandês 4	16,4
Holandês 5	12,6
Holandês 6	15,0

4.3.5 SÍNTESE DO cDNA

A transcrição reversa foi realizada com o kit comercial SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix (Invitrogen, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Brevemente, 4 μL ($\sim 60\text{ng}/\mu\text{L}$) de RNAa foram utilizados em cada reação de síntese de cDNA. Uma reação contendo RNAa, primer hexâmero aleatório, tampão de anelamento e água livre de RNase/DNase foi incubada por 5min a 65°C . Em seguida, 12 μL de um mix (2X First-Strand reaction mix e SuperScriptIII/ RNaseOUT Enzyme mix) foi adicionado à reação e esta foi incubada a 25°C por 10min, seguida de incubação a 50°C por 50min e 85°C por 5 min (ANEXO C). O volume final foi de 20 μL ($\sim 1.200\text{ ng}/\mu\text{L}$) de cDNA por reação. Este material permaneceu estocado a -80°C até posterior utilização.

4.3.6 PRIMERS ESPECÍFICOS

Os primers utilizados nesse estudo já haviam sido descritos na literatura e estão listados na Tabela 2.

Tabela 3: Sequência dos primers específicos utilizados para o estudo de expressão gênica em células da granulosa bovinos, temperaturas de ligação, tamanho dos produtos e fonte de acesso às sequências no GenBank e/ou referência bibliográfica.

Produto	Sequência do primer	Temperatura de pareamento	Tamanho do produto (pb)	N° de acesso no GenBank/ Referência
β-ACTINA (endógeno)	F 5'GACATCCGCAAGGACCTCTA3' R 5'ACATCTGCTGGAAGGTGGAC3'	53°C	205	NM_173979
GAPDH (endógeno)	F 5'GAGCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG3' R 5'CCAACGTGTCTGTTGTGGATCTGA 3'	53°C	237	NM_00103403 4.1 Mourot et al., (2006)
IGF1R	F 5'CGCTGGATGTCCCCTGAGT3' R 5'GTTGTCCGGCTTGCCAGAA3'	53°C	179	NM203322.2
BAX	F 5'TTTGCTTCAGGGTTTCATCCAGGA3' R 5'CAGCTGCGATCATCCTCTGCAG3'	64°C	174	NM173894
STAR	F - 5' CTACAGACATGTGCGCAGCATG R - 5' CATGCGCTCCACAAGCTCTTC	53°C	384	NM1741892
INHA	F 5' CCTCGGATGGAGGTTACTCTTTT3' R 5' CGGGATTCCCTTAGATGCAA3'	56°C	83	NM_174094.3 Mihn et al., 2006
LHR	F - 5' GCCTCAGCCGACTATCACTC 3' R - 5' CCGAGGGAGATTTGTAAACG 3'	50°C	223	Wohlres-Viana, (2013)
PRDX1	F5'ATGCCAGATGGTCAGTTCAAG3' R5'CCTTGTTTCTTGGGTGTGTTG3'	53°C	224	Mourot et al., (2006)

4.3.7 PCR CONVENCIONAL

Inicialmente foi realizado um teste para avaliar a especificidade dos primers selecionados nas amostras em estudo através da PCR convencional. A reação contendo tampão, MgCl₂, dntp, taq e os primers foram incubadas por 94°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, anelamento a temperatura específica de cada primer por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. A quantidade de primer foi de 0,3 micromolar, com excessão do primer para BAX e BCL2 que foi de 0,2 micromolar. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% e corados com brometo de

etídio. O controle negativo foi a reação de PCR contendo todos os reagentes necessários exceto cDNA.

4.3.8 QUANTIFICAÇÃO DO CDNA POR PCR EM TEMPO-REAL

Foi realizado um teste para otimização das reações, onde foram estabelecido as quantidades de cDNA (8ng) e de primer (5uM para todos os primers utilizados) com a melhor eficiência de reação. A quantificação do cDNA foi através de método de PCR em Tempo-Real. Para as reações foram utilizado o kit comercial Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. De forma breve, a reação contendo cDNA, par de primers, Master Mix e 0,1 U Taq DNA Polimerase, em um volume final de 25 μ L, foi incubada a 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, anelamento a temperatura específica para cada primer (Tabela 3) por 30 segundos e extensão a 60°C por 30 segundos. Controles negativos foram preparados com a reação de PCR contendo todos os reagentes necessários exceto cDNA. As amostras foram então incubadas no aparelho ABI PRISM 7300 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems, USA). A reação de qPCR foi realizada em duplicata para cada amostra (Gir de alta produção; Gir de baixa produção; Holandês de alta produção; Holandês de baixa produção).

A quantificação dos amplicons obtidos foi realizada usando-se o método do C_T (cycle threshold) comparativo, com os resultados expressos relativos a genes de referência endógena e um grupo calibrador. O C_T corresponde ao ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de detecção (threshold), servindo como base para comparação entre as amostras. O threshold pode ser automático ou estabelecido pelo usuário, sendo posicionado na região de amplificação exponencial ou geométrica das curvas de amplificação onde a eficiência da PCR é maior. Serve como uma referência do ponto no qual todas as amostras possuem uma mesma intensidade de fluorescência, ou seja uma

mesma quantidade de produto da PCR. Neste experimento os genes de referência endógena foram GAPDH e β -actina.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de produção de COC, COC Graus I, II ou III, total de viáveis, degenerados, total de estruturas, clivados, embriões D7, embriões D8 e total de embriões relacionados a primeira etapa do trabalho foram submetidos a ANOVA e diferenças entre grupos comparadas pelo teste Tukey, com $p > 0,05$. Diferenças percentuais (COC viáveis e taxa de embriões) foram comparadas por Qui-quadrado. Foi realizado um teste de correlação entre total de COC, COC viáveis e taxa de embrião para os animais da raça Gir e Holandesa. Os dados de PCR em Tempo-Real foram submetidos a ANOVA e diferenças entre grupos comparadas pelo teste Tukey (ANEXO D). Os resultados são expressos como média \pm EPM (erro padrão da média).

5 RESULTADOS

PARTE I

A primeira parte do trabalho consistiu na caracterização de fenótipos em doadoras das raças Gir e Holandesa com relação à eficiência absoluta e relativa na PIVE. Foram analisados dados de aspirações e produção *in vitro* de embriões.

A primeira avaliação foi da eficiência absoluta, considerando-se a produção de oócitos na aspiração folicular e também a produção *in vitro* de embriões. Observou-se diferença significativa na maioria dos parâmetros analisados entre as raças Gir e Holandesa, como demonstrado na Tabela 4. A raça Gir apresentou maiores ($P>0,05$) médias de produção de COC total e viáveis do que os animais da raça Holandesa, assim como maior ($P>0,05$) percentual de COC viáveis, parâmetros estes que apresentam associação direta com a produção *in vitro* de embriões. A média de estruturas consideradas degeneradas foi similar e dos parâmetros analisados foi a única que não apresentou diferença.

Tabela 4: Comparativo entre as raças Gir e Holandesa com relação aos parâmetros de aspiração folicular.

Parâmetro	Gir	Holândes
COC Grau I	0,6±0,1 ^a	0,2±0,0 ^b
COC Grau II	1,9±0,2 ^a	0,6±0,1 ^b
COC Grau III	9,1±0,5 ^a	6,0±0,3 ^b
Total de viáveis	11,6±0,6 ^a	6,8±0,3 ^b
% de viáveis	61,6 ^a	51,9 ^b
Degenerados	7,5±0,4 ^a	6,5±0,4 ^a
Total de estruturas	19,1±0,9 ^a	13,3±0,6 ^b

a,b Valores seguidos de letras diferente na mesma linha diferem ($P>0,05$)

Para efeito de análise da produção de embriões, foi considerada também a raça do touro cujo sêmen foi utilizado para a fertilização dos oócitos. Dessa maneira objetivou-se avaliar se existem diferenças também no potencial de desenvolvimento *in vitro* dos complexos *cumulus*-oócito (COC) em função da interação raça da doadora x raça do touro, considerando-se os cruzamentos descritos no item 4.3.2.2. Assim como para os dados de OPU, para todos os parâmetros considerados houve diferença em função da raça da doadora, mas não da raça do touro, como demonstrado na Tabela 5. A diferença entre as duas raças foi observada já na avaliação da clivagem, com média maior de oócitos clivados quando a matriz em era da raça Gir. Esta diferença persistiu no número de embriões, com maiores médias na raça Gir em relação a raça Holandesa.

Tabela 5: Comparativo entre as raças Gir e Holandesa com relação aos parâmetros de produção de embriões *in vitro*.

Parâmetro	Gir x Gir*	Gir x HPB	HPB x HPB	HPB x Gir
Clivados**	9,7±0,8 ^a	10,3±0,6 ^a	4,7±0,4 ^b	5,2±0,4 ^b
Embriões D7***	5,6±0,6 ^a	5,6±0,4 ^a	1,8±0,2 ^b	2,4±0,2 ^b
Embriões D8***	1,0±0,2 ^a	1,0±0,1 ^a	0,4±0,1 ^b	0,5±0,1 ^b
Total de embriões	6,7±0,6 ^a	6,5±0,4 ^a	2,2±0,3 ^b	3,0±0,3 ^b
Taxa de embriões (%)*****	55,4 ^a	54,9 ^a	32,5 ^b	40,8 ^b

*Raça materna x raça paterna

a,b Valores seguidos de letras diferente na mesma linha diferem (P>0,05)

** Oócitos apresentando 2 ou mais divisões celulares após 48-72 horas de cultivo, indicando a ocorrência de fecundação

*** Número de embriões que atingiram o estágio de blastocisto no 7º dia de cultivo

**** Número de embriões que atingiram o estágio de blastocisto no 8º dia de cultivo

***** Blastocisto formado por oócito submetido aos processos de MIV, FIV e CIV

Para analisar o comportamento do parâmetro taxa de embriões, foi feita uma demonstração gráfica das taxas obtidas para cada doadora utilizada (Figuras 3 e 4). Observa-se que, em ambas as raças não existe uma concentração de animais em torno da média, mas uma dispersão gradual em direção aos extremos, demonstrando a distribuição não normal da característica. Também se observa em ambas as raças que algumas doadoras alcançam a taxa máxima de produção de embriões, ou seja, todos os oócitos utilizados foram convertidos em blastocistos. Em relação ao total de animais utilizados, este fato foi observado em 12,6% (34/270) das doadoras holandês e em 17,4% (95/546) das doadoras Gir, não diferindo (P>0,05) entre as raças. No extremo oposto, um maior percentual de doadoras da raça Holandesa não produziu nenhum embrião, quando comparadas com aquelas da raça Gir (29,6% [80/270] vs. 24,3% [133/546], respectivamente, P<0,05).

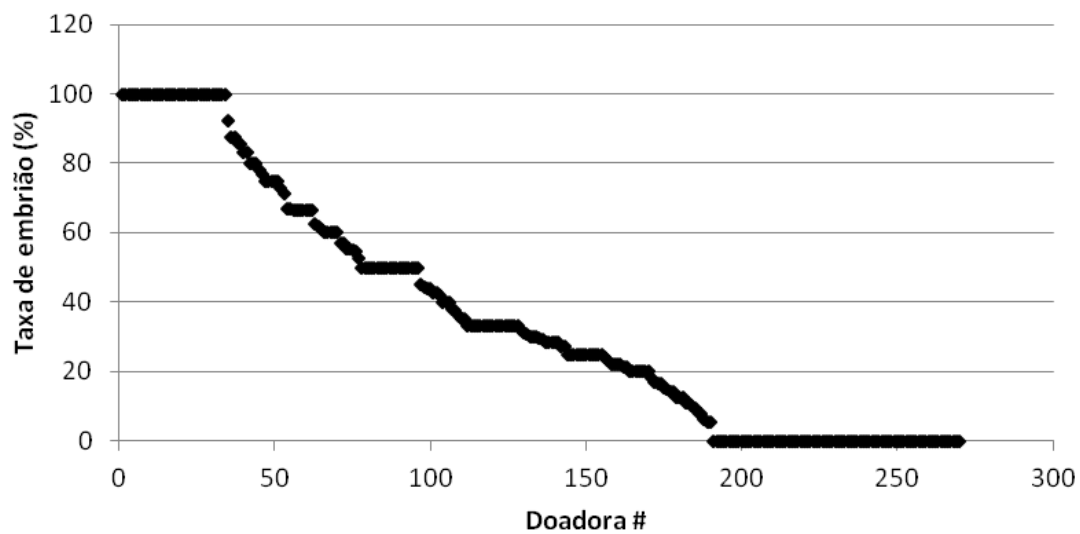


Figura 3: Distribuição das doadoras da raça Holandesa baseado na produção de embriões (%).

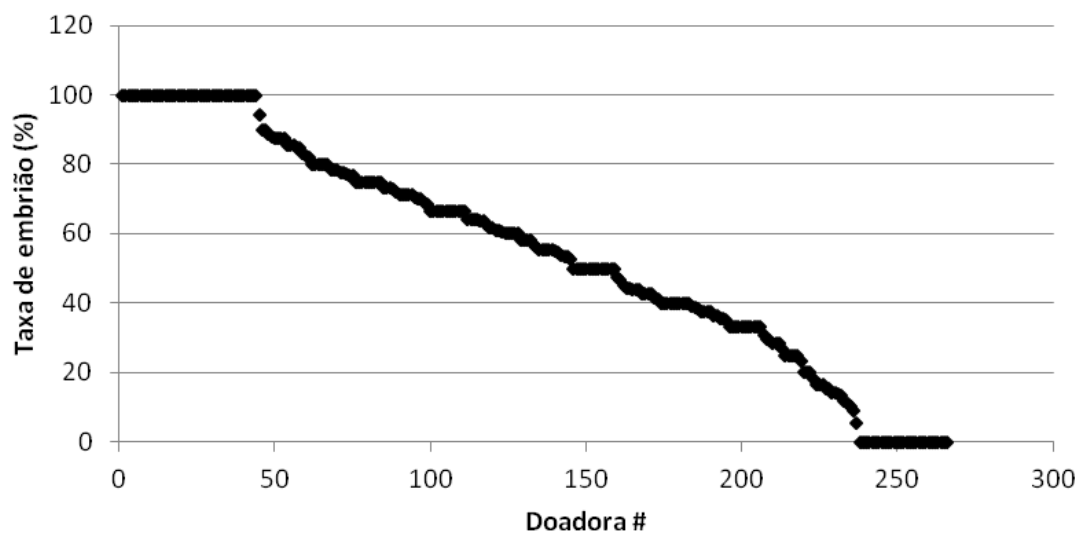


Figura 4: Distribuição das doadoras da raça Gir baseado na produção de embriões (%).

Para avaliar a relação entre eficiência absoluta (produção total de oócitos) e eficiência relativa (embriões produzidos por oócito utilizado), as doadoras de ambas as raças foram estratificadas com base na taxa de produção de embriões, e a produção de COC foi comparada entre os extratos. Não se observou diferença ($P > 0,05$) na produção de COC entre doadoras que posteriormente foram classificadas nos extratos de maior (80 a 100%) ou menor (0 a 20%) taxas de produção de embriões em ambas as raças. Da mesma forma, não houve correlação significativa entre os dois parâmetros.

A maior eficiência da produção de embriões na raça Gir, quando comparada à Holandesa, também se reflete na distribuição no número de doadoras classificadas em cada extrato. Na raça Gir este número é crescente na medida em que se consideram os extratos com maior taxa de embriões, enquanto na raça Holandesa ocorre o inverso (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6: Produção de COC e COC viáveis (média±EPM) em doadoras da raça Gir, ranqueadas em extratos de 20% baseado na produção de embriões (%).

Extrato	N	Total COC's	COC's viáveis	Taxa de embrião (%)
I	67	17±1.3 ^{ab}	9.7±0.7 ^{ab}	80-100%
II	61	21.2±1.8 ^{ab}	13.4±1.1 ^a	60-79%
III	55	22.5±1.9 ^a	13.9±1.2 ^a	40-59%
IV	39	20.3±2.7 ^{ab}	12.6±1.8 ^{ab}	20-39%
V	44	13.6±2.5 ^b	7.9±1.6 ^b	0-19%

a,b Valores seguidos de letras diferente na mesma coluna diferem (P<0,05)

Tabela 7: Produção de COC e COC viáveis (média±EPM) em doadoras da raça Holandesa, ranqueadas em extratos de 20% baseado na produção de embriões (%).

Extrato	N	Total COC's	COC's viáveis	Taxa de embrião (%)
I	44	12±1.4 ^{ab}	5.6±0.7 ^b	80-100%
II	26	15.8±2.0 ^{ab}	7.4±1.0 ^{ab}	60-79%
III	36	14.8±1.6 ^{ab}	7.8±0.8 ^{ab}	40-59%
IV	64	17±1.5 ^a	9.1±0.7 ^a	20-39%
V	100	10.3±0.8 ^b	5.2±0.5 ^b	0-19%

a,b Valores seguidos de letras diferente na mesma coluna diferem (P<0,05)

Para confirmar a dissociação entre os fenótipos eficiência absoluta (caracterizado pela produção de COC) e eficiência relativa (caracterizado pela taxa de embriões), simulou-se qual seria o ganho de eficiência relativa na raça Holandesa caso houvesse uma pré-seleção das doadoras em função da produção de COC, de forma a tornar as médias desta característica equivalentes entres as duas raças. O resultado da simulação demonstra que, mesmo com o aumento hipotético das médias de produção de COC, a produção total de embriões na raça holandesa permaneceria inferior ($P < 0,05$) à da raça Gir (Figura 5).

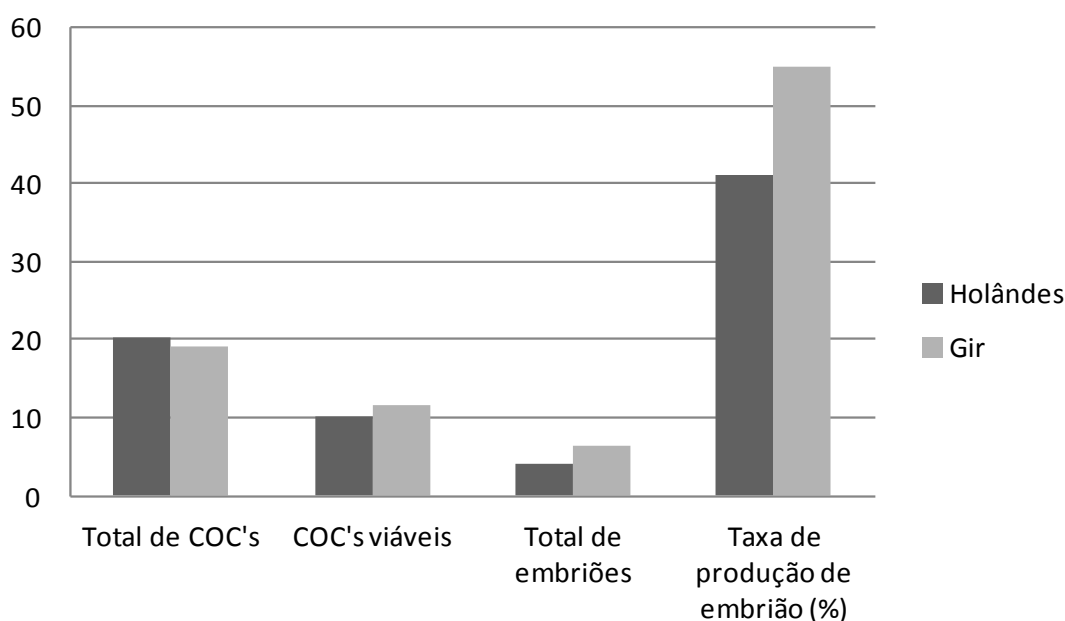


Figura 5: Seleção hipotética de doadoras Holandês do 1º e 2º extrato com base na produção de COC.

PARTE II

Na segunda parte do estudo foi realizada a avaliação das possíveis variações no padrão de expressão gênica de alguns genes importantes para manutenção e sobrevivência das células da granulosa mantidas em co-cultivo com os embriões, tais como LHR, IGFR, STAR, PRDX1, BAX e INH-A, de forma a prospectar possíveis marcadores de eficiência da PIVE e caracterizar as bases moleculares das diferenças entres raças.

Os resultados de produção de embriões em animais das raças Gir e Holandesa analisados na primeira parte do trabalho foram utilizados para definição dos grupos amostrais. Foram comparados animais com taxas de produção iguais ou acima da média (equivalentes aos extratos I a III), e denominados de “alta produção”, com aqueles apresentando os piores resultados (extrato V), e denominados de “baixa produção”. Desta forma, foram estabelecidos quatro grupos amostrais: Holandês alta produção, Holandês baixa produção, Gir alta produção e Gir baixa produção. Nas Tabelas 8 a 11 é possível observar a produção média de cada grupo e a variação de produção dos animais dentro de cada grupo, bem como a quantidade média de RNA obtido nas amostras. A eficiência do processo de extração de RNA nas amostras foi limitado pela baixa quantidade de células presentes em cada co-cultivo.

Tabela 8: Total de COC e taxa de produção de embriões (%) de animais com alta produção de embriões da raça Holandesa e a variação de produção dos animais que tiveram células da granulosa coletadas para análise da expressão. Total de COC coletados e a quantidade de RNA (ug/ul) extraído das células.

Holandês alta produção			
	Total de COC	Taxa de produção de embriões	RNA (ug/ul)
repetição 1	25	100%	19,9
repetição 2	7	66%	12,5
repetição 3	14	50%	12,8
repetição 4	17	50%	12,4
repetição 5	8	50%	12,2
repetição 6	9	50%	14,5
Média	13,33	61%	14,05

Tabela 9: Total de COC e taxa de produção de embriões (%) de animais com baixa produção de embriões da raça Holandesa e a variação de produção dos animais que tiveram células da granulosa coletadas para análise da expressão. Total de COC coletados e a quantidade de RNA (ug/ul) extraído das células.

Holandês baixa produção			
	Total de COC	Taxa de produção de embriões	RNA (ug/ul)
repetição 1	20	10%	19,4
repetição 2	10	0%	20,3
repetição 3	18	0%	21
repetição 4	16	0%	16,4
repetição 5	34	0%	12
repetição 6	11	0%	15
Média	18,17	2%	17,35

Tabela 10: Total de COC e taxa de produção de embriões (%) de animais com alta produção de embriões da raça Gir e a variação de produção dos animais que tiveram células da granulosa coletadas para análise da expressão. Total de COC coletados e a quantidade de RNA (ug/ul) extraído das células.

Gir alta produção			
	Total de COC	Taxa de produção de embriões	RNA (ug/ul)
repetição 1	14	100%	18,6
repetição 2	14	71%	16,4
repetição 3	25	61%	17,7
repetição 4	18	50%	19,9
repetição 5	13	50%	22,3
repetição 6	22	50%	12,7
Média	17,67	64%	17,93

Tabela 11: Total de COC e taxa de produção de embriões (%) de animais com baixa produção de embriões da raça Gir e a variação de produção dos animais que tiveram células da granulosa coletadas para análise da expressão. Total de COC coletados e a quantidade de RNA (ug/ul) extraído das células.

Gir baixa produção			
	Total de COC	Taxa de produção de embriões	RNA (ug/ul)
repetição 1	12	17%	15,1
repetição 2	38	14%	13,2
repetição 3	33	13%	21,4
repetição 4	34	13%	23,5
repetição 5	16	0%	14,7
repetição 6	11	0%	13,9
Média	24	10%	16,97

5.1 PCR CONVENCIONAL

Foi realizado um teste preliminar para validar a eficiência dos primers com as amostras em questão. Dos 14 primers testados, oito anelaram no cDNA molde já que foi observada a presença de bandas no tamanho exato do fragmento esperado, como ilustrado na no gel de eletroforese representado na Figura 6. Foram testados dois primers para o receptor de LH (LHR 2 e LHR 8) e o que apresentou amplificação foi o primer LHR2, selecionado para o estudo. Alguns

genes (CYP17, P450, FSHR, CASPASE3, BCL2) que não apresentaram amplificação foram descartados para as posteriores análises.

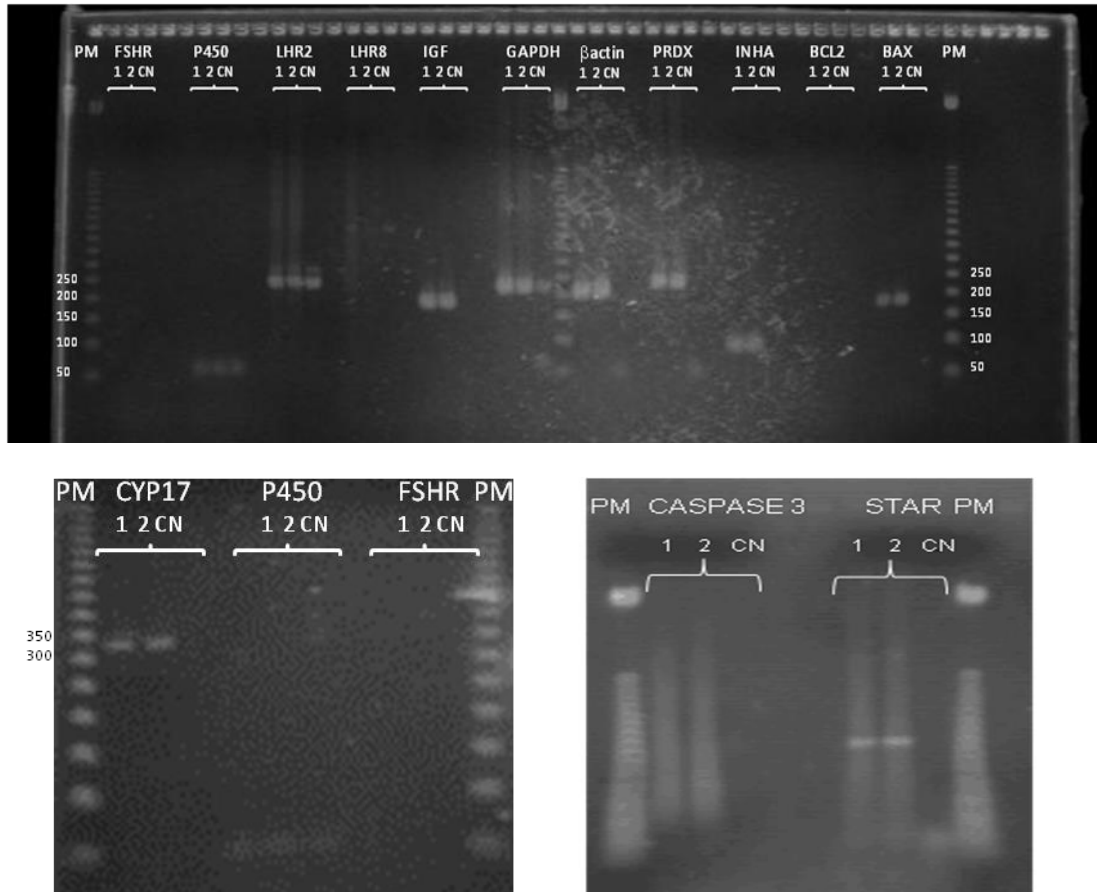


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose (2%) demonstrando a identificação do mRNA dos genes IGF-1r (peso molecular: 179pb), P450arom (peso molecular: 300pb), FSHr (peso molecular: 104pb), INHA (peso molecular: 83pb), CYP17A1 (peso molecular: 329pb), LHR2 (peso molecular: 223pb), LHR8 (peso molecular: 425pb), GAPDH (peso molecular: 237pb), β -actina (peso molecular: 205pb), PRDX1 (peso molecular: 224pb), BCL2 (peso molecular: 72pb), BAX (peso molecular: 174pb), STAR (peso molecular: 394pb), CASPASE3 (peso molecular: 359pb). PM, peso molecular (50pb); pb, pares de bases.

5.2 PCR EM TEMPO-REAL

Inicialmente foi realizado um teste no PCR em Tempo-Real com cada primer para avaliar a eficiência e a especificidade. Todos os primers selecionados apresentaram pico de dissociação. Quando se analisa as curvas

de dissociação dos genes testados é possível perceber que não há picos referentes a dímeros de *primers* ou produtos inespecíficos. A ausência destes picos é uma das condições para os estudos de expressão quando se utiliza o corante *Sybr Green*, já que este se liga a qualquer dupla fita de DNA e a presença de picos inespecíficos poderia levar a uma alteração nos valores de expressão, e com isso, um falso positivo. As curvas de dissociação dos genes utilizados podem ser observadas nas Figuras 7 a 14.

Os valores de eficiência das reações para cada amostra foram calculadas pelo *software* LinRegPCR (REMAKERS et al., 2003). Na tabela 12 estão apresentados os valores de eficiência das reações que levaram a identificação da melhor condição da PCR em Tempo-Real para cada gene (ANEXO E).

Tabela 12: Eficiência da reação para cada gene utilizado para o estudo de expressão gênica das células da granulosa co-cultivadas com embriões bovinos.

Gene	Eficiência
β -actina	2,00
GAPDH	1,85
IGF1R	1,79
INHA	1,85
BAX	1,80
PRDX1	1,90
STAR	1,71
LHR2	1,83

5.3 QUANTIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPO-REAL

A quantificação relativa se baseia na frequência relativa dos transcritos do gene alvo em relação a um gene de expressão constitutiva. Neste trabalho os genes de referência endógena foram GAPDH e β -actina, sendo este último utilizado para as análises, pois apresentou uma eficiência maior.

Na avaliação da taxa de produção (alta e baixa) dentro da raça Gir, não houve diferença da expressão relativa dos genes avaliados (Figura 7).

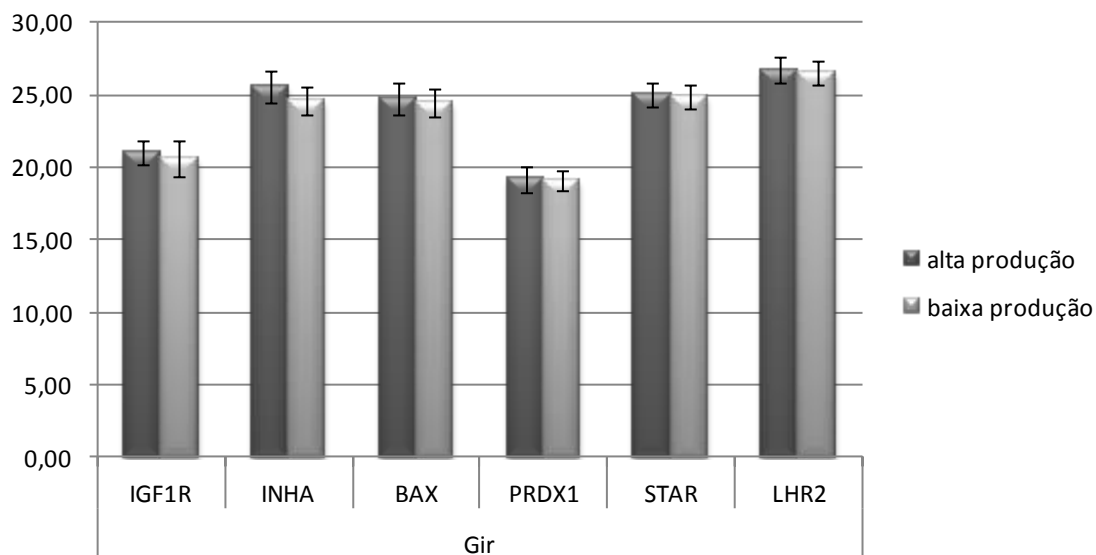


Figura 7: Expressão relativa (média±EPM) dos genes IGF1R, INHA, BAX, PRDX1, STAR, LHR2 em células da granulosa co-cultivada com embriões de animais da raça Gir com alta e baixa produção.

Na raça Holandesa, a expressão relativa dos genes avaliados também não diferiu entre os grupos de animais com alta e baixa produção de embriões (figura 8).

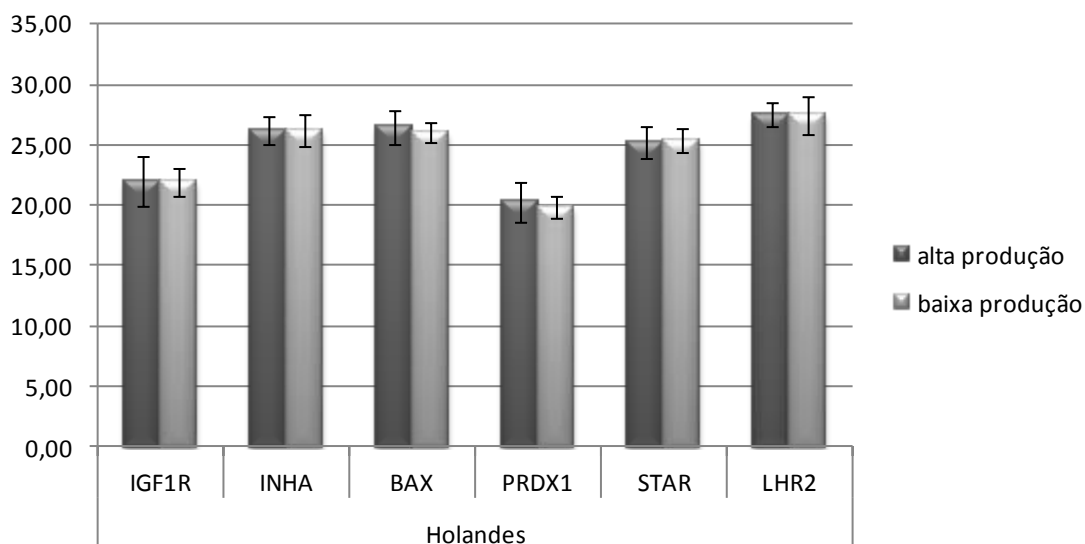


Figura 8: Expressão relativa (média±EPM) dos genes IGF1R, INHA, BAX, PRDX1, STAR, LHR2 em células da granulosa co-cultivada com embriões de animais da raça Holandesa com alta e baixa produção.

Quando as raças foram comparadas dentro das categorias de alta produção de embriões, as células da granulosa de animais da raça Holandesa apresentou um gene (PRDX1) sobre-expresso ($P < 0,05$), enquanto o restante dos genes avaliados não apresentou diferença entre as raças (Figura 9).

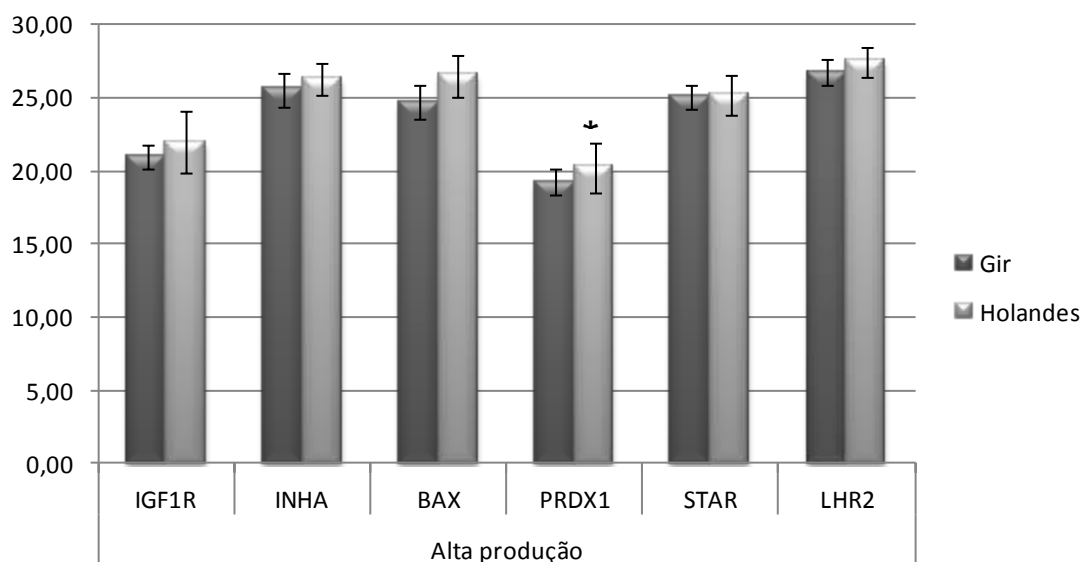


Figura 9: Expressão relativa (média±EPM) dos genes IGF1R, INHA, BAX, PRDX1, STAR, LHR2 em células da granulosa co-cultivada com embriões de animais das raças Gir e Holandesa com alta produção na PIVE (*, $p < 0,05$).

Com relação aos animais de baixa produção de embriões, nenhum dos genes estudados apresentou diferença significativa de expressão relativa entre as raças (Figura 10).

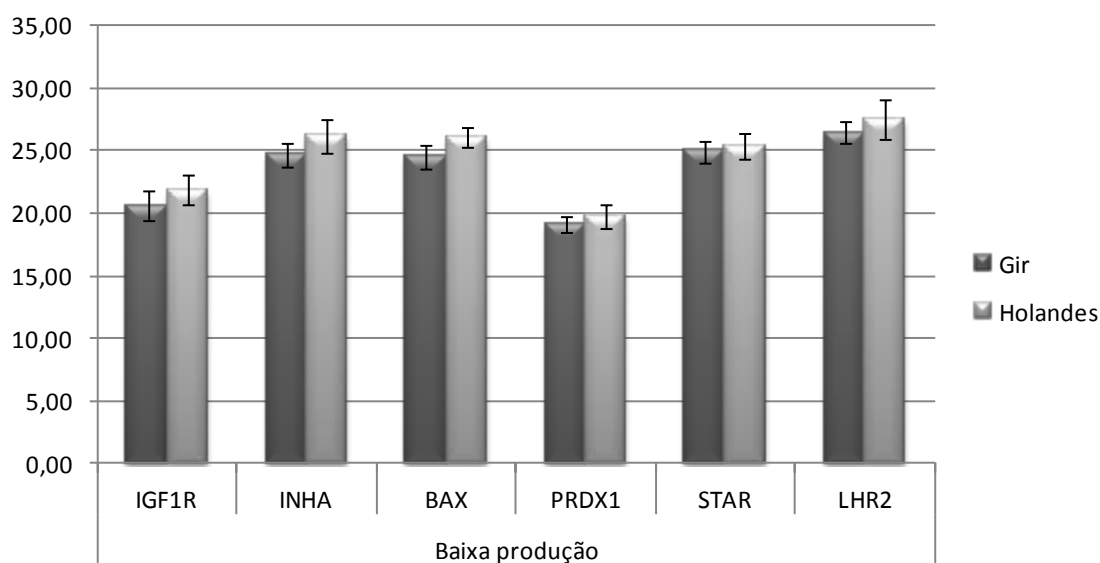


Figura 10: Expressão relativa (média±EPM) dos genes β -actina, IGF1R, INHA, BAX, PRDX1, STAR, LHR2 em células da granulosa co-cultivada com embriões de animais das raças Gir e Holandesa com baixa produção na PIVE.

Sabendo que os animais da raça Gir apresentam uma maior produção de embriões na PIVE em relação aos animais da raça Holandesa (Grázia et al., 2012), para efeito de comparação o grupo de animais da raça Gir com alta produção de embriões foi escolhido como grupo controle e os restantes como grupos testes. Dessa maneira, os outros 3 grupos (Gir baixa, Holandês alta e Holandês baixa) foram sempre comparados com o grupo Gir alta.

Foram avaliados nesse experimento 6 genes (IGFI, INHA, BAX, PRDX1, STAR, LHR) com funções diferentes que demonstrassem de uma maneira mais global o funcionamento das células da granulosa e pudessem servir como um marcador de eficiência de produção na PIVE. De todos os genes que foram avaliados somente o PRDX1 mostrou diferença significativa no grupo Holandês alta ($P > 0,05$) comparado com os grupos de Gir, tanto com alta produção quanto com baixa produção (Figura 11). Nenhum dos outros genes avaliados no estudo apresentou diferença significativa de expressão relativa em nenhum dos grupos.

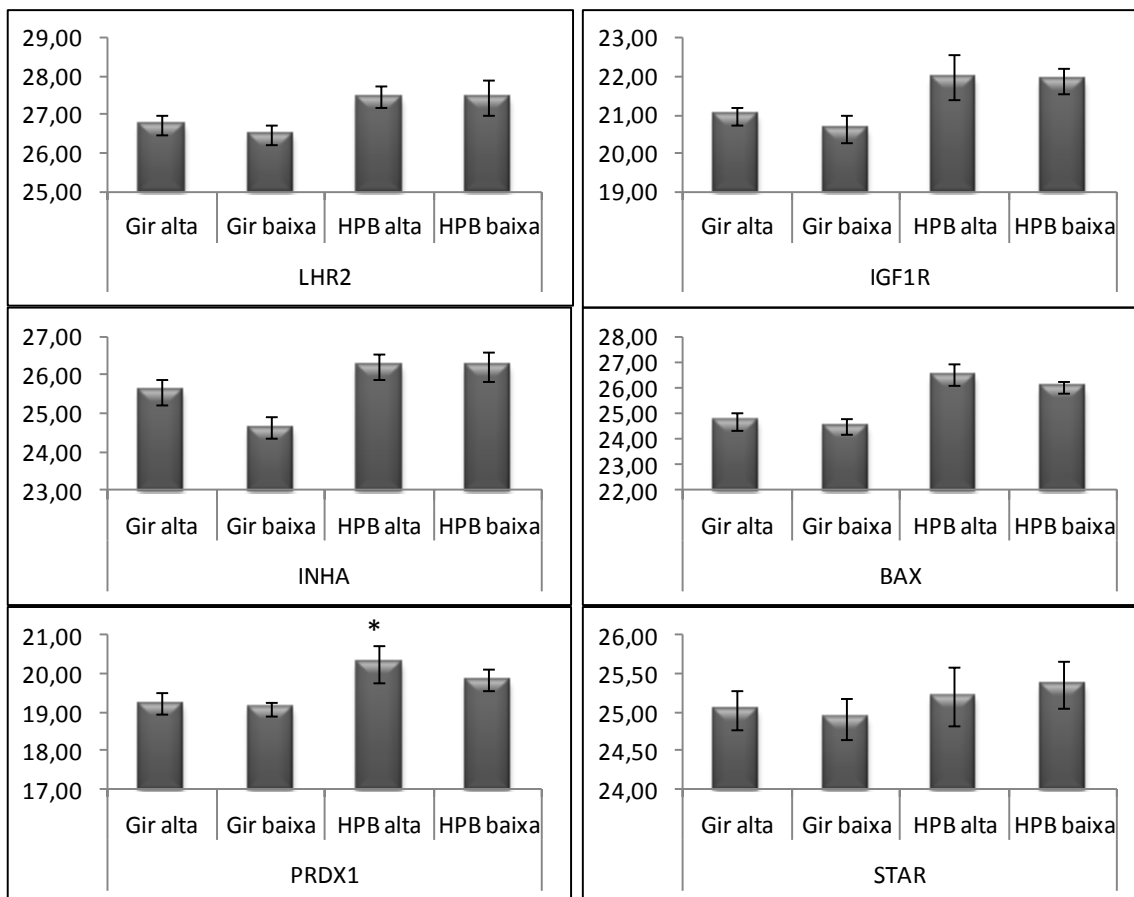


Figura 11: Expressão relativa dos genes B-actina, IGF1R, INHA, BAX, PRDX1, STAR, LHR2 nas células da granulosa co-cultivadas com embriões bovinos de vacas Gir e Holandês. Dentro de cada gene, o asterisco indica um diferença significativa na expressão relativa.

Afim de validar os resultados do PCR em Tempo-Real os amplicons obtidos na reação foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida nativa (8%) para a observação dos fragmentos correspondentes aos transcritos amplificados. Na figura 12, é possível observar os fragmentos de todos os genes amplificados com os tamanhos esperados. Para os genes β -actina, PRDX1 e LHR2 pode se perceber a presença de um fragmento no controle negativo em função da contaminação com amostra da pipeta utilizada no momento da aplicação do gel, porém quando observou-se a curva de dissociação (ANEXO E) a amostra do controle negativo não apresentou pico, indicando ausência do produto amplificado.

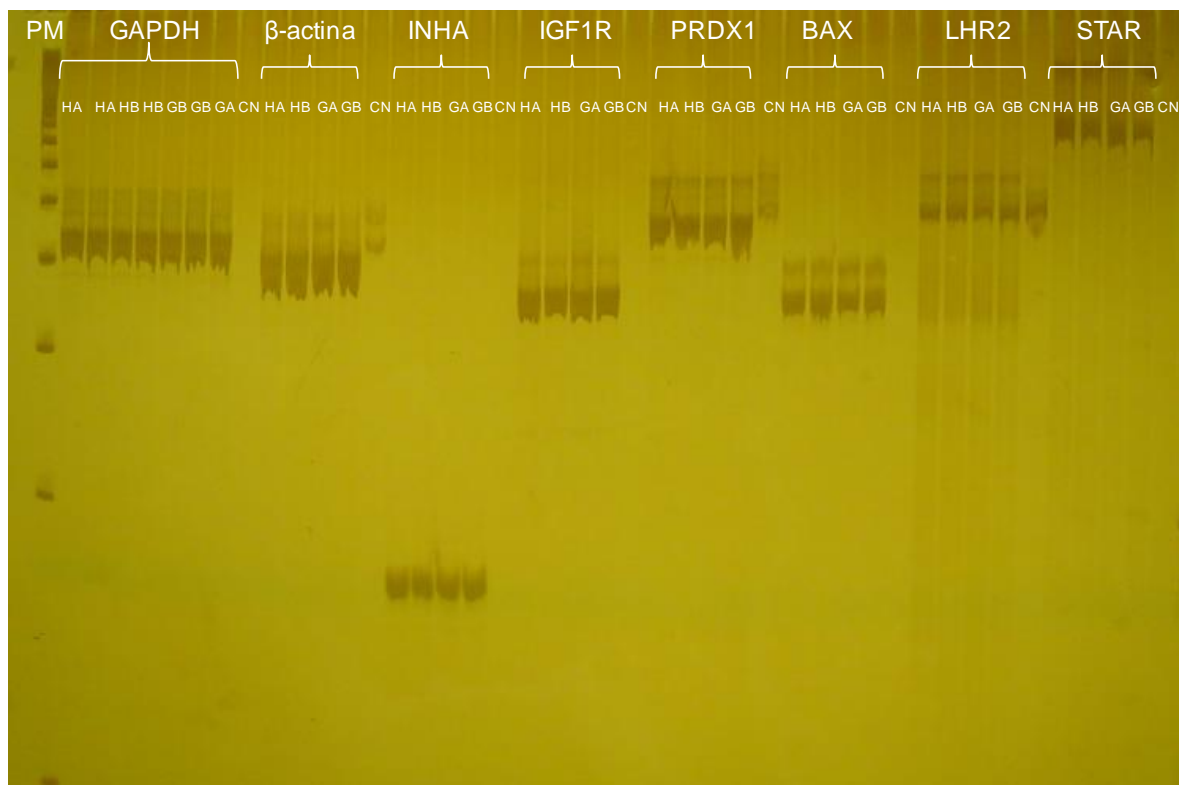


Figura 12: Gel de poliacrilamida nativa (8%) de algumas amostras resultantes da amplificação por PCR em Tempo-Real para os transcritos dos genes GAPDH (237 pb), β -actina (205 pb), INHA (83 pb), IGF1R (179 pb), PRDX1 (224 pb), BAX (174 pb), LHR2 (223 pb) e STAR (384 pb). HA, Holandês alta produção; HB, Holandês baixa produção; GA, Gir alta produção; GB, Gir baixa produção; PM, marcador de peso molecular de 50 pares de bases; CN, controle negativo; pb, pares de base.

6 DISCUSSÃO

O processo de produção *in vitro* de embriões é complexo e, conseqüentemente, pode ser influenciado por diversos fatores, incluindo aqueles intrínsecos à técnica (BAVISTER, 1995), aos efeitos de ambiente (RENSIS e SCARAMUZZI, 2003), e também relacionados aos animais utilizados como doadores dos gametas (MOROTTI et al., 2013). Apesar do grande esforço realizado no aperfeiçoamento dos meios e sistemas de cultivo, os resultados da produção *in vitro* de embriões ainda são caracterizados por uma grande variação, que pode ser devida ao potencial de desenvolvimento dos oócitos utilizados (KRISHER, 2004; SENEDA et al., 2011). Diferenças na produção *in*

in vitro de embriões entre raças zebuínas e taurinas também tem sido relatadas na literatura (VIANA et al. 2004; PONTES et al., 2010), e poderiam ajudar na compreensão das bases fisiológicas das variações de resultados entre doadoras. No entanto, a maior parte dos trabalhos disponíveis reportando tais diferenças não investigou a associação entre possíveis marcadores moleculares relacionados à produção de embriões em sistemas *in vitro*, considerando o resultado individual das doadoras. Uma das dificuldades para este tipo de estudo é a abordagem clássica normalmente utilizada, na qual a necessidade de se utilizar os próprios embriões como modelo inviabiliza parcerias com a iniciativa privada, além de impedirem avaliações subsequentes de resultados relacionados à gestação e parto. O sistema mais comumente utilizado para PIVE, contudo, oferece a possibilidade alternativa de investigarmos as bases das variações na produção de embriões via estudo das células da granulosa utilizadas em co-cultivo. Estas células são provenientes da própria doadora e seu funcionamento está intimamente relacionado ao potencial de desenvolvimento do oócito (GILCHRIST, LANE e THOMPSON, 2008). Além disso, os co-cultivos são descartados ao fim do processo, e as CG utilizadas estão amplamente disponíveis como material experimental. O presente estudo foi desenhado para investigar a magnitude das diferenças de produção de embriões *in vitro* entre as raças Gir e Holandesa, através da análise retrospectiva de resultados de produção de uma central comercial. A partir dos resultados destas análises, propôs-se definir na população de doadoras extratos de produção de embriões que pudessem caracterizar subpopulações com fenótipos distintos, e investigar possíveis associações dos mesmos com perfis de expressão gênica das células da granulosa utilizadas nos co-cultivos.

Um dos grandes desafios existentes nos sistemas de OPU-PIVE é a otimização da logística do processo. A preparação de receptoras é iniciada antes mesmo da coleta dos oócitos (BARUSELLI et al., 2011; HASLER, 2014). Assim, o que se faz hoje é uma estimativa da quantidade de oócitos que devem ser coletados para que, ao chegar no final do processo, seja obtida uma quantidade de embriões suficiente para o número de receptoras preparadas. O sistema de cultivo empregado na produção *in vitro* de embriões passou por uma evolução ao longo dos anos, objetivando-se o aperfeiçoamento não só dos meios de cultivo, mas de todo o processo envolvido (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW,

2006). Isso permitiu um aumento da produção média de embriões (HASLER, 2000), com algumas baterias alcançando taxas de conversão oócito/embrião de 100%, conforme observado no presente trabalho. No entanto, a grande variação de produção entre indivíduos ainda existe, tornando a logística do processo mais complicada. A produção de embriões *in vitro*, tem a interferência de vários fatores, tais como, qualidade do oócito, sistema de cultura (meios de cultivo, tensão de oxigênio, temperatura), interação touro/vaca, raça da doadora, variação individual (KRUIP, BEVERS e KEMP, 2000; KRISHER, 2004; CAMARGO et al., 2006; LONERGAN et al., 2006; VIANA e CAMARGO, 2007). No presente estudo, os resultados de produção de embriões foram obtidos de um mesmo laboratório, no qual todos os procedimentos foram todos realizados por um mesmo técnico sob as mesmas condições de cultivo. Dessa forma, algumas variáveis que interferem no processo foram evitadas.

Atualmente a maneira mais utilizada para adequar a relação entre embriões produzidos e receptoras disponíveis é realizar uma predição da produção de embriões com base na estimativa indireta do número de oócitos de cada indivíduo, via contagem de folículos por meio de ultrassonografia. Assim, é possível ter ideia da quantidade de oócitos que cada doadora pode produzir e, conseqüentemente, da quantidade potencial de embriões. De maneira geral, os animais que produzem mais COC produzem mais embriões em números absolutos. Desta forma, as diferenças observadas entre raças zebuínas e taurinas podem estar relacionadas à maior população folicular da raça Gir, quando comparada à Holandesa (VIANA, 2008 e MOSSA et al., 2012). A técnica empregada rotineiramente para recuperação de oócitos possivelmente não tem influência direta na diferença observada entre as raças, uma vez que foi demonstrada uma grande correlação entre o número de folículos observados e COC recuperados (VIANA et al., 2013 [in press]). No entanto, essa característica possa ser influenciada por diversas variáveis, tais como, manejo, nutrição, idade, condição corporal e condições ambientais (VIANA e BOLS, 2005). Outros autores também relataram uma maior produção de oócitos totais e viáveis na raça Gir em relação a raça Holandesa (VIANA et al. 2004; PONTES et al., 2010). A tendência natural é que a média de produção de oócitos aumente de geração em geração, uma vez que essa característica apresenta um fundo genético em bovinos (EVANS et al., 2012). Normalmente, doadoras que produzem mais

oócitos são prioridades nas baterias de OPU/FIV, e as filhas dessas doadoras com alta produção de COC tem grande probabilidade de também serem boas produtoras de COC (EVANS et al., 2012). Contudo, isso não implica em um aumento na eficiência do processo no futuro.

Em condições naturais de reprodução, animais com alta contagem de folículos antrais tem maior probabilidade de apresentar altos índices de prenhez (EVANS et al., 2012). Em um outro estudo, com humanos, a contagem de folículos antrais foi considerado um bom indicativo de quais pacientes seriam ou não bom respondedor aos protocolos hormonais, mas não um preditivo de eficiência em relação a produção de embriões e taxas de concepção (STYER e TOTH; 2011). No presente trabalho, com a estratificação das doadoras baseado na taxa de produção de embriões, foi possível perceber que a qualidade dos oócitos recuperados parece interferir mais nos resultados do que a quantidade. A quantidade de COC produzido não indicou a produção de embriões da doadora. Animais com alta produção de oócitos não tiveram necessariamente alta taxa de produção de embriões, da mesma maneira que animais com baixa produção de oócitos não tiveram obrigatoriamente uma taxa de produção de embriões baixa. Até o presente momento não há marcadores que permitem avaliar a qualidade do oócito sem comprometê-lo. Uma alternativa é tentar aumentar a quantidade de oócito de boa qualidade antes da aspiração, o que se pode fazer através de diversos protocolos hormonais já descritos (RAMOS et al., 2006; ROSEN, 2011; STYER e TOTH, 2011; WARZYCH et al., 2013).

Com o objetivo de confirmar essa dissociação entre os fenótipos eficiência absoluta (caracterizado pela produção de COC) e eficiência relativa (caracterizado pela taxa de embriões), simulou-se uma seleção de doadoras da raça Holandesa, baseado no fenótipo produção de COC. Confirmou-se que mesmo selecionando somente as doadoras com a maior produção dentre as incluídas no estudo, não foi possível aumentar a eficiência de produção de embriões. A maior taxa de embriões observada na raça Gir, não apresenta relação com a reserva ovariana e consequente produção de COC. As maiores taxas de conversão (oócito que se desenvolve até o estágio de blastocisto) observada se deve, possivelmente, a uma melhor qualidade dos oócitos nessa raça. Com os resultados apresentados, o fenótipo relacionado a alta produção de COC, embora fácil de avaliar e não invasivo, não se mostrou um bom

indicativo de maior eficiência de produção de embriões na PIVE em nenhuma das duas raças. Não deve ser utilizado como ferramenta de seleção na tentativa de aumentar a eficiência na produção de embriões de doadoras da raça Holandesa, sendo importante buscar alternativas mais seguras. Dessa maneira, a possibilidade de entender e avaliar as variações no padrão de expressão gênica entre os fenótipos de ambas as raças, buscando possíveis marcadores para prever o potencial eficiência das doadoras na PIVE, almejando que a raça Holandesa alcance a eficiência da raça Gir.

A raça do touro não teve participação nas diferenças constatadas de produção total de embriões. Essas diferenças ficaram relacionada somente a raça da doadora. Já foi demonstrado que o gameta feminino é o responsável pelo desenvolvimento inicial do embrião (SCHULTZ, 2002), sugerindo que a qualidade do oócito pode ser distinta entre as duas raças e a causa primária por essa diferença (SENEDA et al., 2001). Isso reafirma a necessidade entender os motivos que levam a essa grande variação de resultados e buscar alternativas para aumentar a eficiência dos animais.

O comportamento individual com relação a taxa de produção de embriões, foi muito similar entre as duas raças e é possível perceber que mesmo com todo o desenvolvimento do sistema de cultura ao longo desses anos não foi suficiente para diminuir ou mesmo evitar a grande variação entre indivíduos, embora tenha possibilitado um aumento na produção média. A qualidade dos oócitos continua sendo de extrema importância para que os animais apresentem uma boa produção de embriões. O primeiro requisito para o sucesso na PIVE são oócitos de boa qualidade, com boas características morfológicas e de desenvolvimento (SENEDA, 2001 e NAGANO et al., 2006). Alguns estudos inclusive afirmam que a qualidade do oócito utilizado nos programas de reprodução assistida pode ser o fator limitante para aumentar a eficiência de produção de embriões de alguns animais. Porém, os oócitos são influenciados pela condição corporal do momento, manejo, nutrição, a idade do animal, condições ambientais entre outras, dessa maneira sendo possível variações entre os animais (RIZOS et al., 2002; VIANA e BOLS, 2005; WARZYCH et al., 2013).

No presente trabalho os animais foram coletados em regiões de clima tropical úmido, que apresenta temperaturas mais elevadas podendo refletir sobre os processos fisiológicos e causar um efeito sobre folículos antrais (ROTH et al.,

2000). Já foi relatado que raça Holandesa apresenta um baixo potencial de desenvolvimento *in vitro* o ano inteiro por não ser adaptada ao clima tropical, produzindo oócitos de menor qualidade, e conseqüentemente taxas de blastocistos inferiores (ROTH et al., 2000). Nesse caso o clima pode ter tido influencia na diferença encontrada entre as duas raças. Além disso, estudos *in vitro* já demonstraram que em condições de estresse térmico embriões de animais zebuínos apresentam maior capacidade de desenvolvimento em comparação aos embriões de animais taurinos (BARROS et al., 2003; PAULA-LOPES et al., 2003). Esses resultados diferem do trabalho de Pontes et al. (2010) que observaram uma média similar de produção *in vitro* de embrião entre as raças Gir e Holandesa. Nesse estudo, a produção de embriões média encontrada de cada raça foi mais baixa do que a observada no presente trabalho. Essa diferença é devido ao calculo que se baseou na quantidade total de oócitos e não sobre a quantidade de oócitos viáveis.

A grande variação das taxas de produção de embriões entre as doadoras (de 0% a 100%), sugere que além da qualidade do próprio gameta, uma interação oócito/sistema pode ser o responsável por essa variação de resultados em uma mesma bateria de OPU/FIV. Levando em consideração que todo o sistema esteja funcionando de maneira adequada, os resultados obtidos nesse estudo indica que o sistema de CIV não é o limitante e nem justifica por si só a diferença entre as raças, uma vez que foi único para as duas raças e que em ambas algumas doadoras alcançaram a produção máxima de 100% de embrião.

O desenvolvimento e crescimento dos folículos ovarianos ocorrem de maneira altamente coordenada, e durante esse processo uma estreita comunicação entre o gameta feminino (oócito) e as células somáticas que estão ao seu redor (teca, granulosa e células do cumulus) se estabelece, sendo de extrema importância para a qualidade do oócito (Gilchrist et al., 2007). Em roedores os fatores secretados pelo oócito afetam a expressão gênica das células do cumulus, dessa maneira um oócito de pior qualidade poderia influenciar o padrão de expressão dessas células de maneira diferente de um oócito de boa qualidade (SUGIURA et al., 2005). Em bovinos os oócitos regulam dentre outras funções, a esteroidogênese e morte celular dessas células (LI et al., 2000 e HUSSEIN et al., 2005).

O gene PRDX1 foi o único gene avaliado nas células da granulosa mantidas em co-cultivo que apresentou diferença de expressão entre os grupos estudados. Esse gene participa na via de proteção das células contra o estresse oxidativo. Em suínos, já foi descrito que as células da granulosa possuem um efeito protetor sobre os oócitos contra o estresse oxidativo no ambiente *in vitro* (TATEMOTO et al., 2000). A alteração no padrão de expressão desse gene foi entre os grupamentos genético (Gir e Holandês), dessa maneira a diferença de expressão parece não ter relação com a produção dos animais. A super-expressão do gene PRDX1 em células de animais Holandês corrobora com o estudo de Silva et al., 2013, que demonstrou em taurinos expressão aumentada de genes relacionados a proteção contra o estresse. Em um outro estudo, foi observado que o gene PRDX1 é super-expresso nos embriões de ambas as raças produzidos *in vitro* em relação aos produzidos *in vivo* (WOHLRES-VIANA et al., 2010). Possivelmente o ambiente interfere mais na expressão gênica das células do que a eficiência de produção dos indivíduos. O ambiente de cultivo utilizado na PIVE, por mais que existam tentativas de aproximar do que acontece *in vivo* é ainda um ambiente estressante para as células (CAMARGO et al., 2006). Nesse mesmo estudo, foi encontrada uma maior quantidade de transcritos desse gene em embriões da raça Gir quando comparado com embriões da raça Holandesa, levando em consideração somente embriões produzidos *in vivo*. Sabendo da estreita comunicação existente entre oócito e células do cumulus (células utilizadas na monocamada), é possível que em condições normais as células do cumulus de animais da raça Gir também apresentem uma maior quantidade de transcritos em relação as células dos animais Holandês. Essa quantidade mais elevada de transcrito pode permitir o uso, para a síntese de proteínas, de forma mais rápida em condições de estresse, como é o caso do ambiente de cultivo, evitando os possíveis danos as células. Isso reforça as evidências de que embriões da raça apresentam maior potencial de desenvolvimento *in vitro* do que embriões taurinos

Alterações na expressão de outros genes também eram esperadas, uma vez que já foram descritas diferenças moleculares entre essas duas raças (CAMARGO et al., 2007 e WOHLRES-VIANA et al., 2010). Entretanto, já foi demonstrado que a diferença de expressão de alguns genes observada *in vivo* não se repete quando se analisa os embriões produzidos *in vitro* (WOHLRES-

VIANA et al., 2010). Da mesma maneira que existem diferenças no padrão de expressão de alguns genes entre as raças, é possível que existam mecanismos diferentes também, para regulação da expressão e degradação de transcritos. No presente trabalho o material analisado foi obtido de ambiente *in vitro*, que é o mesmo para ambas as raças. Dessa forma, o padrão de expressão pode ter sido amenizado, direcionando para um mesmo padrão. O fato de não ter sido encontrada diferença de expressão na grande maioria dos genes utilizados nesse estudo, não significa que o padrão de expressão dos genes avaliados para as duas raças sejam sempre iguais. Os resultados podem ter sido mascarados ou modificados em função do sistema de cultivo adotado. Os mecanismos moleculares de uma célula fazem parte de uma complexa rede de sinalização e isso deve ser levado em consideração. Além dessa característica comum que pode ter influenciado os resultados de expressão, existem outras possíveis explicações.

A apoptose é um processo intrínseco que controla a morte celular e ocorre naturalmente nos organismos vivos (ZIMMERMANN et al. 2001). Possivelmente também ocorre no ambiente *in vitro* por se tratar de um sistema artificial, como já foi demonstrado em embriões desenvolvidos *in vitro* (GJORRET et al., 2007; WARZYCH et al., 2007). Esse processo de morte celular programada, ocorre através de um balanço entre genes pró-apoptóticos (BAX) e outros anti-apoptóticos, como por exemplo o Bcl2. No presente estudo não foi utilizado nenhum gene anti-apoptótico o que torna difícil qualquer afirmação a respeito da ocorrência de apoptose nas células. Porém, é provável que esse processo ocorra em células da granulosa mantidas em co-cultivo. Devido a grande variação de células em processo de apoptose e ainda vivas, e conseqüentemente grande diferença na quantidade inicial de mRNA é possível que quantificação da expressão relativa dos genes apoptóticos através do PCR em Tempo-Real tenha sido dificultada.

O gene STAR é um componente da via de luteinização, na qual é o responsável pela mobilização e entrega do colesterol para as mitocôndrias, um dos passos limitantes da esteroidogênese (DEVOTO et al., 2002). Após a ovulação, as células da granulosa sofrem a luteinização formando o corpo lúteo, o qual irá secretar progesterona. Em folículos pré-ovulatórios, já foi demonstrado que essas células não expressam STAR, enquanto que células da granulosa já

luteinizadas esse gene se encontra super-regulado (MORITA et al., 2012). O resultado constatado para esse gene pode ser em função do tamanho dos folículos puncionados. Folículos preferencialmente imaturos, variando de 3 a 8 mm são aspirados (FAIR et al., 2003), e conforme já descrito em condições normais não apresentam expressão do gene STAR (MORITA et al., 2012). Embora para uma mesma doadora folículos de diversos tamanhos sejam puncionados. Entretanto, já foi demonstrado que, independente da origem, essas células podem sofrer luteinização quando mantidas *in vitro* (MONTAÑO et al., 2009). Sendo assim, é possível que as células mesmo mantidas em co-cultivo com embriões também expressam o gene STAR em função da luteinização, mas como demonstrado essa expressão não difere entre as raças e não apresenta correlação com a produção de embriões dos animais.

Alguns trabalhos tem sugerido que o receptor de LH (LHR) começa a ser exposto pelas células da granulosa após o folículo tornar-se dominante, momento no qual passa a ser menos dependente de FSH (MIHN et al., 2006 e MONTAÑO et al., 2009). Entretanto, alguns estudos já demonstraram que células da granulosa obtidas de folículos menores também podem apresentar expressão, contudo de algumas formas variáveis de mRNA LHR (WOHLRES-VIANA et al., 2013 [in press]). Por outro lado, também já foi observado que essas células da granulosa oriundas de folículos menores não adquirem LHR funcional até a dominância ocorrer (DRIANCOURT et al., 2001 e NOGUEIRA et al., 2007). No presente estudo, de maneira geral, folículos não dominantes foram aspirados e não se teve controle do tamanho exato dos folículos, dos quais foram recuperado os COC. Mas corroborando com os nossos resultados já foi demonstrado que as células da granulosa podem expressar LHR (MONTAÑO et al., 2009).

Estudo com células da granulosa coletadas *in vivo* de folículos de diversos tamanhos e em vários momentos do ciclo estral nas raças Gir e Holandesa, mostrou que o IGFIR não foi um fator limitante para ação do IGF1 sobre as células da granulosa. Na raça Holandesa, não foi encontrada diferença de expressão do IGFIR nas fases de pré-divergência, no momento de divergência e após a divergência. No entanto, na raça Gir houve diferença de expressão no momento de divergência, o qual apresentou um aumento da expressão desse gene (ARASHIRO, 2012). Outras diferenças também já foram demonstradas com

relação ao funcionamento do sistema IGF entre bovinos zebuínos e taurinos (ALVAREZ et al., 2000). Os resultados obtidos no presente estudo corroboram o trabalho de Armstrong et al. (2000) que observou expressão do gene IGFBP3 nas células da granulosa e também da teca de folículos antrais. Esses folículos são normalmente aspirados para produção de embriões *in vitro*. Entretanto, os resultados diferem dos encontrados na literatura que demonstram diferença de expressão para esse gene entre as raças Gir e Holandesa.

Nos bovinos, os principais eventos que ocorre durante o ciclo estral são: recrutamento dos folículos, crescimentos dos folículos, seleção, dominância, atresia dos folículos subordinados e posteriormente ovulação do folículo dominante (DRIANCOURT, 2001). O folículo dominante, dentre outras funções, produz inibina A que influencia o desenvolvimento dos folículos subordinados, tornando-os atrésicos (BAO et al., 1997). Nas raças Gir e Holandesa, existe uma diferença de expressão do gene INHA nas células da granulosa obtidas de folículos de tamanhos diferentes. Na raça Holandesa, a expressão relativa desse gene foi super-regulada em folículos de 10 mm em relação a folículos de 6 e 8 mm, enquanto na raça Gir a expressão relativa de INHA em folículos de 4 mm apresentou sub-regulada em comparação com folículos de 6 mm. No entanto, em folículos de 8 e 10 mm a expressão desse gene foi super-regulada em relação aos folículos de 6 mm (ARASHIRO et al., 2012). No presente estudo, as células da granulosa foram obtidas de folículos pequenos, variando de 3 a 8 mm, e foi evitado aspirar os folículos possivelmente dominantes, que produzem inibina.

Os resultados do presente estudo poderia contribuir para o entendimento da diferença de produção de embriões na PIVE entre as duas raças. Entretanto, nenhum outro gene mostrou diferença significativa entre esses dois grupos, com exceção do PRDX1. Dessa maneira, não se pode concluir muita coisa a respeito diferença. São necessários mais evidências ou outros possíveis marcadores para afirmar os possíveis motivos da diferença de produção entre Gir e Holandês.

Estudos posteriores com o objetivo de avaliar a expressão relativa dos mesmo genes utilizados nesse trabalho, porém com células da granulosa coletadas *in vivo*, serão necessários para avaliar as reais diferenças existentes no padrão de expressão desses marcadores entre as raças Gir e Holandesa,

eliminando a possibilidade de falso-positivos e negativos que podem ser induzidos pelo sistema de cultivo. Dessa maneira, o conhecimento do histórico de produção dos animais na PIVE possibilita a elaboração de correlações das possíveis diferenças de expressão dos genes com a produção de embriões na PIVE (alta e baixa) e entre as raças (Gir e Holandês).

7 CONCLUSÕES

Existem diferenças fenotípicas quanto ao potencial como doadora para PIVE entre as raças Gir e Holandesa, e também dentro de cada raça.

As diferenças entre raças estão relacionadas ao número e qualidade de complexos cumulus-oócito recuperados por aspiração folicular, e também à eficiência na PIVE. Entretanto, os dois fenótipos não estão aparentemente relacionados, i.e., animais com maior produção de oócitos não são, necessariamente, os que apresentam maiores taxas de produção de embriões.

A análise de expressão gênica em células da granulosa utilizada em co-cultivo com embriões não demonstrou diferenças que pudessem ser associadas a eficiência de produção de embriões *in vitro*, nem explicar as diferenças de produção entre as duas raças em questão.

REFERÊNCIAS

ABBAS, K.; BRETON, J.; DRAPIER, J.C. 2008. The interplay between nitric oxide and peroxiredoxins. **Immunobiology**, **213 (9-10)**: 815-822.

ADAMS, G. P.; JAISWAL, R.; SINGH, J.; MALHI, P. 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, **69 (1)**: 72-80.

ALVAREZ, P.; SPICER, L.J.; CHASE Jr.; C.C.; PAYTON, M.E.; HAMILTON, T.D.; STEWART, R.E.; HAMMOND, A.C.; OLSON, T.A.; WETTEMANN, R.P. 2000. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. **Journal of Animal Science**, **78**: 1291–1302.

ARASHIRO, E. K. N. 2012. **Adequação de metodologia para o estudo *in vivo* da vascularização e da caracterização do fluido folicular e células da granulosa**. Tese acadêmica, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, Minas Gerais, 65p.

ARMSTRONG, D. G.; GUTIERREZ, C. G.; BAXTER, G.; GLAZYRIN, A. L.; MANN, G. E.; WOAD, K. J.; HOGG, C. O.; WEBB, R. 2000. Expression of mRNA encoding IGF-I, IGF-II and type 1 IGF receptor in bovine ovarian follicles. **Journal Endocrinology**, **165 (1)**: 101-113.

AUSTIN, E. J.; MIHM, M.; EVANS, A. C.; KNIGHT, P. G.; IRELAND, J. L.; IRELAND, J. J.; ROCHE, J. F. 2001. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. **Biology Reproduction**, **64 (3)**: 839-848

BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N. S.; GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; MARTINS, C. M.; RODRIGUES, C. A.; BÓ, G. A. 2011. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. **Theriogenology**, **76**: 1583-1593.

BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; SALES, J. N. S. 2007. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, **31 (2)**: 205-211.

BAVISTER, B. D. 1995. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Human Reproduction Update**, **1 (2)**: 91-148.

BEG, M. A.; GINTHER, O. J. 2006. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. **Reproduction**, **132 (3)**: 365-377.

BIGGERS, J. D. 2002. Thoughts on embryo culture conditions. **Reproduction Biomedical Online**, **4 (1)**: 30-38.

BO, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTINEZ, M. F. 2003. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, **78 (3-4)**: 307-326.

BUDD, D. C.; SPRAGG, E. J.; RIDD, K.; TOBIN, A. B. 2004. Signalling of the M3-muscarinic receptor to the anti-apoptotic pathway. **Biochemical Journal**, **381**: 43-49.

CAMARGO, L. S.; VIANA, J. H.; RAMOS, A. A.; SERAPIAO, R. V.; DE SA, W. F.; FERREIRA, A. M.; GUIMARAES, M. F.; DO VALE FILHO, V. R. 2007. Developmental competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* dairy cows in a tropical environment. **Theriogenology**, **68 (4)**: 626-632.

CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; RAMOS, A.A.; VALE FILHO, V.R. 2006. Factors influencing *in vitro* embryo production. **Animal Reproduction**, **3 (1)**: 19-28.

CARVALHO, J. B. P.; CARVALHO, N. A. T.; REIS, E. L.; NICHI, M.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. 2008. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, **69**: 167-175.

CHAE, H. Z.; CHUNG, S. J.; RHEE, S. G. 1994. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. **Journal Biology Chemical**, **269 (44)**: 27670-27678.

CLARK, B. J.; WELLS, J.; KING, S. R.; STOCCO, D. M. 1994. The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). **The Journal of biological chemistry**, **269 (45)**: 28314-28322.

DEVOTO, L.; KOHEN, P.; VEGA, M.; CASTRO, O.; GONZÁLEZ, R. R.; RETAMALES, I.; CARVALHO, P.; CHRISTENSON, L. K.; STRAUSS, J. F. 2002. Control of human luteal steroidogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, **186**: 137-141.

DRIANCOURT, M. A. 2001. Regulation of ovarian Follicular dynamics in farm animals implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, **55**: 1211-1239.

Embrapa Gado de Leite.

<http://www.cnpq.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0290b.php>. Acessado em: 24/06/2013.

- ELVIN, J. A.; YAN, C.; MATZUK, M. M. 2000. Oocyte-expressed TGF- β superfamily members in female fertility. **Molecular and Cellular Endocrinology**, **159**: 1-5.
- EVANS, A. C.; MOSSA, F.; WALSH, S. W.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L.; SMITH, G. W.; IRELAND, J. J. 2012. Effects of maternal environment during gestation on ovarian folliculogenesis and consequences for fertility in bovine offspring. **Reproduction Domestic Animal**, **47**: 31-37.
- FACÓ, O.; LÔBO, R. N. B.; FILHO, R. M.; MARTINS, G. A.; OLIVEIRA, S. M. P.; AZEVEDO, D. M. M. R. 2008. Efeitos genéticos aditivos e não-aditivos para características produtivas e reprodutivas em vacas mestiças Holândes x Gir. **Revista Brasileira de Zootecnia**, **37 (1)**: 48-53.
- FAIR, T.; HULSHOF, S. C. J.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. 1997. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. **Anatomy Embriology**, **195**: 327-336.
- FAIR, T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**, **78**: 203-216.
- GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J.; MYLLYMA, S.; KAIVO-OJA, N.; DRAGOVIC, R. A.; HICKEY, T. E.; RITVOS, O.; MOTTERSHEAD, D. G. 2007. Molecular basis of oocyte-paracrine signaling that promotes granulosa cell proliferation. **Journal of Cell Science**, **119 (18)**: 3811-3821.
- GILCHRIST, R. B.; LANE, M. L.; THOMPSON, J. G. 2008. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. **Human Reproduction Update**, **14 (2)**: 159-177.
- GJORRET, J. O.; FABIAN, D.; AVERY, B.; MADDOX-HYTTEL, P. 2007. Active caspase-3 and ultrastructural evidence of apoptosis in spontaneous and induced cell death in bovine *in vitro* produced pre-implantation embryos. **Molecular Reproduction and Development**, **74 (8)**: 961-971.
- GLISTER, C.; TANNETTA, D. S.; GROOME, N. P.; KNIGHT, P. G. 2001. Interactions between follicle-stimulating hormone and growth factors in modulating secretion of steroids and inhibin-related peptides by nonluteinized bovine granulosa cells. **Biology of Reproduction**, **65 (4)**: 1020-1028.
- GRÁZIA, J. G. V.; PALHÃO, M. P.; TAVARES, L. L.; CAMARGO, L. S. A.; VIANA, J. H. M. 2012. Eficiência na produção *in vitro* de embriões mestiços F1 utilizando-se doadoras das raças Gir (*Bos taurus indicus*) ou Holandesa (*Bos taurus taurus*). **Animal Reproduction**, **9 (3)**: 133.
- GUERIN, P.; EL MOUATASSIM, S.; MENEZO, Y. 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, **7 (2)**: 175-189.

- HASHIMOTO, S. 2009. Application of *In vitro* Maturation to Assisted Reproductive Technology. **Journal of Reproduction and Development**, **55** (1): 1-10.
- HASLER, J. F. 2000. *In vitro* culture of bovine embryos in Menezes's B2 medium with or without coculture and serum: the normalcy of pregnancies and calves resulting from transferred embryos. **Animal Reproduction Science**, **60**: 81-91.
- HASLER, J. F. 2014. Forty-years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. **Theriogenology**, **81**: 152-169.
- HUSSEIN, T. S.; FROILAND, D. A.; AMATO, F.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R. B. 2005. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. **Journal of Cell Science**, **118**: 5257-5268.
- IRELAND, J. L.; GOOD, T. E.; KNIGHT, P. G.; IRELAND, J. J. 1994. Alterations in amounts of different forms of inhibin during follicular atresia. **Biology of Reproduction**, **50** (6): 1265-1276.
- JONES, G. M.; TROUNSON, A. O.; VELLA, P. J.; THOUAS, G. A.; LOLATGIS, N.; WOOD, C. 2001. Glucose metabolism of human morula and blastocyst-stage embryos and its relationship to viability after transfer. **Reproduction Biomedical Online**, **3** (2): 124-132.
- KNIGHT, P. G.; GLISTER, C. 2001. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. **Reproduction**, **121** (4): 503-512.
- KNIJN, H. M.; WRENZYCKI, C.; HENDRIKSEN, P. J.; VOS, P. L.; HERRMANN, D.; VAN DER WEIJDEN, G. C.; NIEMANN, H.; DIELEMAN, S. J. 2002. Effects of oocyte maturation regimen on the relative abundance of gene transcripts in bovine blastocysts derived *in vitro* or *in vivo*. **Reproduction**, **124** (3): 365-375.
- KRISHER, R. L. The effect of oocyte quality on development. **Journal of Animal Science**, **82**: 14-23.
- KRUIP, T. A. M.; BEVERS, M. M.; KEMP, B. 2000. Environment of oocyte and embryo determines health of IVP offspring. **Theriogenology**, **53** (2): 611-618.
- LEYENS, G.; DONNAY, I.; KNOOPS, B. 2003. Cloning of bovine peroxiredoxins-gene expression in bovine tissues and amino acid sequence comparison with rat, mouse and primate peroxiredoxins. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, **136** (4): 943-955.
- LI, R.; NORMAN, R. J.; ARMSTRONG, D. T.; GILCHRIST, R. B. 2000. Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. **Biology of Reproduction**, **63**: 839-845.

LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D.; EVANS, A. C. 2006. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, **65 (1)**: 137-152.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; KANKA, J.; NEMCOVA, L.; MBAYE, A. M.; KINGSTON, M.; WADE, M.; DUFFY, P.; BOLAND, M. P. 2003. Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. **Reproduction**, **126 (3)**: 337-346.

MANI, A. M.; FENWICK, M.; CHENG, Z.; SHARMA, M. K.; SINGH, D.; WATHES, D. C. 2010. IGF1 induces up-regulation of steroidogenic and apoptotic regulatory genes via activation of phosphatidylinositol-dependent kinase/AKT in bovine granulosa cells. **Reproduction Research**, **139**: 139-151.

McPHERRON, A. C.; LEE, S. J. 1993. GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor-beta superfamily containing a novel pattern of cysteines. **Journal Biology Chemical**, **268**: 3444-3449.

McGRATH, S A.; ESQUELA, A. F.; LEE, S. J. 1995. Oocyte-Specific expression of growth/differentiation factor -9. **Molecular Endocrinology**, **9 (1)**: 131-136.

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

MILAZZOTTO, M. P.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D. 2008. Biotecnologias da Reprodução Animal: Biologia molecular aplicada à biotecnologia. **Ciências Veterinária dos Trópicos**, **11 (1)**: 145-148.

MONTAÑO, E.; OLIVERA, M.; RUIZ-CORTÉS, Z. T. 2009. Association between leptin, LH and its receptor and luteinizing and progesterone accumulation (P4) in bovine granulosa cell *in vitro*. **Reproduction Domestic Animal**, **44**: 699-704.

MORITA, Y.; WADA-KIRAIKE, O.; YANO, T.; SHIRANE, A.; HIRANO, M.; HIRAIKE, H.; KOYAMA, S.; OISHI, H.; YOSHINO, O.; MIYAMOTO, Y.; SONE, K.; ODA, K.; NAKAGAWA, S.; TSUTSUI, K.; TAKETANI, Y. 2012. Resveratrol promotes expression of SIRT1 and StAR in rat ovarian granulosa cells: an implicative role of SIRT1 in the ovary. **Reproductive Biology and Endocrinology**, **10**: 1-14.

MOROTTI, F.; SANCHES, B. V.; PONTES, J. H. F.; BASSO, A. C.; SIQUEIRA, E. R.; LISBOA, L. A.; SENEDA, M. M. 2013. Pregnancy rate and birth rate of calves from a large-scale IVF program using reverse-sorted semen in *Bos indicus*, *Bos indicus-taurus*, and *Bos Taurus* cattle. **Theriogenology**, 1-6.

MOSSA, F.; WALSH, S. W.; BUTLER, S. T.; BERRY, D. P.; CARTER, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G. W.; IRELAND, J. J.; EVANS, C. O. 2012. Low

numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. **Journal Dairy Science**, **95**: 2355-2361.

NAGANO, M.; KATAGIRI, S.; TAKAHASHI, Y. 2006. Relationship between bovine oocyte morphology and *in vitro* developmental potential. **Zygote**, **14**: 53-61.

NEVES, J. P.; MIRANDA, K. L.; TORTORELLA, R. D. 2010. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, **39**: 414-421.

NOGUEIRA, M. F. G.; BURATINI JR, J.; PRICE, C. A.; CASTILHO, A. C. S.; PINTO, M. G. L.; BARROS, C. M. 2007. 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**, **74**: 680-686.

NUMABE, T.; OIKAWA, T.; KIKUCHI, T.; HORIUCHI, T. 2000. Birth weight and birth rate of heavy calves conceived by transfer of *in vitro* or *in vivo* produced bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, **64 (1-2)**: 13-20.

OFFENBERG, H.; THOMSEN, P. D. 2005. Functional challenge affects aquaporin mRNA abundance in mouse blastocysts. **Molecular Reproduction Development**, **71 (4)**: 422-430.

PAULA-LOPES, F. F.; CHASE, C. C.; AL-KATANANI, Y. M.; KRININGER, C. E.; RIVERA, R. M.; TEKIN, S.; MAJEWSKI, A. C.; OCON, O. M.; OLSON, T. A.; HANSEN, P. J. 2003. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. **Reproduction**, **125**: 285-294.

PESCADOR, N.; STOCCO, D. M.; MURPHY, B. D. 1999. Growth factor modulation of steroidogenic acute regulatory protein and luteinization in the pig ovary. **Biology of reproduction**, **60 (6)**: 1453-1461.

POLLACK, S. E.; FURTH, E. E.; KALLEN, C. B.; ARAKANE, F.; KIRIAKIDOU, M.; KOZARSKY, K. F.; STRAUSS, J. F. 1997. Localization of the steroidogenic acute regulatory protein in human tissues. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, **82 (12)**: 4243-4251.

PONTES, J. H.; SILVA, K. C.; BASSO, A. C.; RIGO, A. G.; FERREIRA, C. R.; SANTOS, G. M.; SANCHES, B. V.; PORCIONATO, J. P.; VIEIRA, P. H.; FAIFER, F. S.; STERZA, F. A.; SCHENK, J. L.; SENEDA, M. M. 2010. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, **74 (8)**: 1349-1355.

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

RAMOS, A. A.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; CAMARGO, L. S. A.; VIANA, J. H. M.; HENRY, M. R. J. M. 2006. Protocolos de produção *in vitro* de embriões na raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, **58 (3)**: 341-347.

REGASSA, A.; RINGS, F.; HOELKER, M.; CINAR, U.; THOLEN, E.; LOOFT, C.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. 2011. Transcriptome dynamics and molecular cross-talk between bovine oocyte and its companion cumulus cells. **BMC Genomics**, **12**: 57.

RENSIS, F. D.; SCARAMUZZI, R. J. 2003. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow – a review. **Theriogenology**, **60**: 1139-1151.

RHODES, F. M.; FITZPATRICK, L. A.; ENTWISTLE, K. W.; DE'ATH, G. 1995. Sequential changes in ovarian follicular dynamics in *Bos indicus* heifers before and after nutritional anoestrus. **Journal Reproduction Fertility**, **104 (1)**: 41-49.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, **61 (2)**: 234-248.

ROBERT, C.; GAGNE, D.; LUSSIER, J. G.; BOUSQUET, D.; BARNES, F. L.; SIRARD, M. A. 2003. Presence of LH receptor mRNA in granulosa cells as a potential marker of oocyte developmental competence and characterization of the bovine splicing isoforms. **Reproduction**, **125 (3)**: 437-446.

ROSEN, M. P. 2011. Do oocyte quality and quantity as measured by antral follicle count decline in parallel?. **Fertility and Sterility**, **95 (2)**: 482-483.

ROTH, Z.; MEIDAN, R.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. 2000. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, **120**: 83–90.

SARTORELLI, E. S.; CARVALHO, L. M.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J.; BARROS, C. M. 2005. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, **63 (9)**: 2382-2394.

SCHAMS, D.; BERISHA, B. 2002. Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, **23 (1-2)**: 53-65.

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

SCHULTZ, R. M. 2002. The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. **Human Reproduction Update**, **8 (4)**: 323-331.

SENEDA, M. M.; ESPER, C.BR.; GARCIA, J.BM.; ANDRADE, E.BR. 2001. Aspectos técnicos e biológicos da obtenção de oócitos bovinos: revisão de literatura. **Ciências Agrárias**, **23 (1)**: 101-110.

SILVA, C. F.; SARTORELLI, E. S.; CASTILHO, A. C. S.; SATRAPA, R. A.; PUELKER, R. Z.; RAZZA, E. M.; TICIANELLI, J. S.; EDUARDO, H. P.; LOUREIRO, B.; BARROS, C. M. 2013. Effects of heat stress on development, quality and survival of *Bos indicus* and *Bos Taurus* embryos produced in vitro. **Theriogenology**, **79**: 351-357.

SMITH, M. F.; MCINTUSH, E. W.; SMITH, G. W. 1994. Mechanisms associated with corpus luteum development. **Journal Animal Science**, **72 (7)**: 1857-1872.

SOYAL, S. M.; AMLEH, A.; DEAN, J. 2000. FIG α , a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. **Development**, **127**: 4645-4654.

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

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

STEWART, R. E.; SPICER, L. J.; HAMILTON, T. D.; KEEFER, B. E. 1995. 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 Animal Science**, **73 (12)**: 3719-3731.

STYER, A. K.; TOTH, T. L. 2011. Antral follicle count in clinical practice: building the bridge from ovarian reserve to *in vitro* fertilization outcome. **Fertility and Sterility**, **95 (2)**: 480-481.

SUGIURA, K.; PENDOLA, F. L.; EPPIG, J. J. 2005. Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. **Developmental Biology**, **279**: 20-30.

SUMMERS, M. C.; BIGGERS, J. D. 2003. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. **Human Reproduction Update**, **9 (6)**: 557-582.

TATEMOTO, H.; SAKURAI, N.; MUTO, N. 2000. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during *in vitro* maturation: role of cumulus cells. **Biology of Reproduction**, **63**: 805-810.

THE BOVINE HAPMAP CONSORTIUM. 2009. Genome-Wide Survey of SNP Variation Uncovers the Genetic Structure of Cattle Breeds. **Science**, **324**: 528-532.

THOMPSON, J. G.; GARDNER, D. K.; PUGH, P. A.; MCMILLAN, W. H.; TERVIT, H. R. 1995. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during *in vitro* pre-elongation development of ovine embryos. **Biology of Reproduction**, **53 (6)**: 1385-1391.

UYAR, A.; TORREALDAY, S.; SELI, E. 2013. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. **Fertility and Sterility**, **99 (4)**: 979-997.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A. M. 2006. Ovum pick up and *in vitro* production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. **Theriogenology**, **65 (5)**: 914-925.

VANDAELE, L.; MATEUSEN, B.; MAES, D. G. D.; KRUIF, A.; VAN SOOM, A. 2007. Temporal detection of caspase-3 and -7 in bovine *in vitro* produced embryos of different developmental capacity. **Reproduction and Fertility**, **133 (4)**: 709-718.

VIANA, J. H. M.; BOLS, P. E. J. 2005. Variáveis biológicas associadas a recuperação de complexos cumulus-oócito por aspiração folicular. **Acta Scientiae Veterinariae**, **33 (1)**: 1-4.

VIANA, J. H.; CAMARGO, L. S. A.; FERREIRA, A. M.; SA, W. F.; FERNANDES, C. A. C.; MARQUES JUNIOR, A. P. 2004. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. **Animal Reproduction Science**, **84 (1-2)**: 1-12.

VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A. 2000. A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, **35 (3)**: 915-924.

VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A.; FONSECA, J. F.; OLIVEIRA, A. P.; ARASHIRO, E. K. N.; FREITAS, C.; FERNANDES, C. A. C. 2008. Retrospective analysis of cumulus-oocyte complex yield in a Gyr (*Bos taurus indicus*) herd undergoing transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration. **Reproduction Fertility and Development**, **20 (1)**: 189-189.

VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; CAMARGO, L. S. A. 2000. Follicular Dynamics in Zebu Cattle. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, **35 (12)**: 2501-2509.

VIANA, J. H. M.; PALHÃO, M. P.; ARASHIRO, E. K. N.; FERREIRA, A. M.; FONSECA, J. F.; FERNANDES, C. A. C. 2004. Pre-synchronization of cows for cumulus oocyte complexes recover: Partial results. **Acta Scientiae Veterinariae**. **32**: 187.

VIANA, J. H. M. 2012. Levantamento estatístico da produção de embriões bovinos no Brasil em 2011: mudanças e tendências futuras. **O embrião**, **51**: 6-10.

WANDJI, S. A.; PELLETIER, G.; SIRARD, M. A. 1992. Ontogeny and cellular localization of 125I-labeled insulin-like growth factor-I, 125I-labeled follicle-stimulating hormone, and 125I-labeled human chorionic gonadotropin binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. **Biology of Reproduction**, **47 (5)**: 814-822.

WARZYCH, E.; PERS-KAMCZYC, E.; KRZYWAK, A.; DUDZINSKA, S.; LECHNIAK, D. 2013. Apoptotic index within cumulus cells is a questionable marker of meiotic competence of bovine oocytes matured *in vitro*. **Reproduction Biology**, **13 (1)**: 82-87.

WARZYCH, E.; WRENZYCKI, C.; PEIPPO, J.; LECHNIAK, D. 2007. Maturation medium supplements affect transcript level of apoptosis and cell survival related genes in bovine blastocysts produced *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, **74 (3)**: 280-289.

WOHLRES-VIANA, S.; PEREIRA, M. M.; VIANA, J. H. M.; MACHADO, M. A.; CAMARGO, L. S. A. 2010. Comparison of gene expression in *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced *in vivo* or *in vitro*. **Livestock Science**, **140**: 62-67.

YAN, C.; WANG, P.; DeMAYO, J.; DeMayo, F. J.; ELVIN, J. A.; CARINO, C.; PRASAD, S. V.; SKINNER, S. S.; DUNBAR, B. S.; DUBE, J. L.; CELESTE, A. J.; MATZUK, M. M. 2001. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. **Molecular Endocrinology**, **15 (6)**: 854-866.

YADAV, P. S.; SAINI, A.; KUMAR, A.; JAIN, G. C. 1998. Effect of oviductal cell co-culture on cleavage and development of goat IVF embryos. **Animal Reproduction Science**, **51 (4)**: 301-306.

ZIMMERMANN, K. C.; BONZON, C.; GREEN, D. R. 2001. The machinery of programmed cell death. **Pharmacology Theriogenology**, **92 (1)**: 57-70.

**ANEXOS
(Protocolos)**

ANEXO A

PROTOCOLO DE COLETA DE CÉLULAS DA GRANULOSA PARA EXTRAÇÃO DE RNA

- Centrifugar as amostras por 10min a 2.500 rpm;
- Remover o sobrenadante (líq. folículo) e colocar em eppendorf para ser mantido a -20°C até o radioimunoensaio, ressuspender o pellet em 200µL de solução de NaCl 0,9%;
- Centrifugar por 3min a 2.500 rpm;
- Remover o sobrenadante e lavar novamente (repetindo a centrifugação) com 200µL de NaCl 0,9%;
- Centrifugar por 3min a 2.500 rpm;
- Remover o sobrenadante e ressuspender o pellet em 50µL de RNA later (o transporte pode ser feito à temperatura ambiente);
- Manter as amostras a -20°C até o momento da extração de RNA.

ANEXO B EXTRAÇÃO DE RNA (RNEASY MICRO KIT – QIAGEN)

Pontos importantes:

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

Antes de começar:

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

Procedimento:

- Lisar as células pela adição de 350 µl de RLT (c/ β-ME) no criotubo. Vortexar ou pipetar por +/- 1 min para homogeneizar.
- quando processar um número > 5000 células, adicionar 20ng de RNA carreador (5µl de uma solução de 4ng/µl - poly-A) ao lisado antes de homogeneizar.
- Adicionar 1volume de etanol 70% (350µl) ao lisado homogeneizado, e misturar bem pipetando. **Não centrifugar!**
 - Transferir a amostra, incluindo qualquer precipitado que possa ter se formado, para uma MinElute Spin Column em um tubo de coleta 2ml. Fechar o tudo com cuidado, e centrifugar por 15s a $\geq 8000 \times g$ (≥ 10000 rpm). Descartar o conteúdo do tubo de coleta.
 - Recoloque o SpinColumn no tubo de coleta e adicione 350µl de RW1. Centrifugar por 15s a $\geq 8000 \times g$ (≥ 10000 rpm) para lavar a coluna. Descartar o conteúdo do tubo de coleta.
 - Adicionar 10µl de DNase 1 estoque (stock) a 70µl de RDD (tubo 0,2ml). Misturar pipetando gentilmente invertendo o tubo (DNase é sensível a desnaturação física). **Não vortexar!**
 - Pipetar o mix de incubação DNase1 (80 µl) diretamente sobre uma membrana de sílica-gel MinElute, e coloque no tubo de coleta. Deixe em temperatura ambiente por 15min.
 - Adicionar 350µl de RW1 na SpinColumn , e centrifugar por 15s a $\geq 8000 \times g$ (≥ 10000 rpm) para lavar a coluna. Descartar o conteúdo e o tubo de coleta.
 - Transferir a SpinColumn para um novo tubo de coleta (2ml). Adicionar 500µl de RPE à coluna. Centrifugar por 15s a $\geq 8000 \times g$ (≥ 10000 rpm) para lavar a coluna. Descartar o conteúdo do tubo de coleta.
 - Adicionar 500µl de etanol 80% à SpinColumn. Feche o tubo gentilmente e centrifugue por 2 min a $\geq 8000 \times g$ (≥ 10000 rpm) para secar a membrana de sílica-gel. Descartar o conteúdo e o tubo de coleta.
 - Transferir a SpinColumn para um novo tubo de coleta (2ml). Abrir a tampa da SpinColumn, e centrifugar por 5min na maior velocidade. Descartar o conteúdo e o tubo de coleta. (secar a membrana).
 - Para eluição, transferir a SpinColumn para um novo tubo de coleta (1,5ml). Pipetar 14 µl de água RNase-free diretamente no centro da membrana de

sílica-gel. Fechar o tubo gentilmente, e centrifugar por 1 min na velocidade máxima para eluir. O volume final deve ser de 13 μ l.

ANEXO C
TRANSCRIÇÃO REVERSA (SuperScript™ III First-Strand Synthesis
SuperMix- Invitrogen)

Observações:

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

Procedimento:

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

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

- Em geral a concentração de RNA extraído de *pool* de cinco embriões e amplificado tem sido de ~70 ng/µl (~0,07 µg/µl).

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

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

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

Nota: 10% do volume da reação de PCR deve ser de cDNA não diluído (por exemplo, para uma reação de qPCR de 25 μ l, utilizar 2,5 μ l de cDNA não diluído).

ANEXO D
ANOVA E TESTE TUKEY DOS RESULTADOS DE EXPRESSÃO

Data 02/08/2013	Cliente não identificado82 Usuário não identificado82 Expressão JG	Hora 11:42:49
--------------------	--	------------------

Procedimento = Análise para modelos lineares

Objetivo = Análise de variância

Dependentes = PRDX1

Independentes= RACA TRATAMEN

Interação = RACA * TRATAMEN

Estatísticas Simples

Observações Perdidas = 0

Observações Válidas = 48

Distribuição dos Dados

Efeito	Código	Observações	
RACA	1	24	-----
RACA	2	24	-----
TRATAMEN	1	24	-----
TRATAMEN	2	24	-----

Interações	Identificação	Dados
RACA X TRATAMEN	1 1	12
RACA X TRATAMEN	1 2	12
RACA X TRATAMEN	2 1	12
RACA X TRATAMEN	2 2	12

Nome	Média	Desvio
------	-------	--------

PRDX1 2.28928 0.83868 83

Determinante = 0.100000E+01

Médias Estimadas

Variável Dependente	Efeito	Classes	Obser.	Médias Estimadas	Constantes
PRDX1	Média		48	2.289281	2.289281 0.1111065
PRDX1	RACA	1	24	2.409169	0.1198873 0.1571283
PRDX1	RACA	2	24	2.169394	-0.1198873 0.1571283
PRDX1	TRATAMEN	1	24	2.071779	-0.2175028 0.1571283
PRDX1	TRATAMEN	2	24	2.506784	0.2175028 0.1571283
PRDX1	RACA *TRATAMEN	1 1	12	2.481292	0.2896260
0.2222130	PRDX1	RACA *TRATAMEN	1 2	12	2.337045 -0.2896260
0.2222130	PRDX1	RACA *TRATAMEN	2 1	12	1.662265 -0.2896260
0.2222130	PRDX1	RACA *TRATAMEN	2 2	12	2.676523 0.2896260
0.2222130					

Análise de Variância

PRDX1

Fontes de Variação G.L. Soma de Quadrado Quadrado Médio F Signif.

RACA	1	0.6899025	0.6899025	1.164	0.28646
TRATAMEN	1	2.270758	2.270758	3.832	0.05664
RACA TRATAMEN	1	4.026394	4.026394	6.795	0.01243
Resíduo	44	26.07191	0.5925434		

Coeficiente de Variação = 33.625

T U K E Y

Variável = PRDX1 (0.5925434)

Interação RACA xTRATAMEN Comparações 5%

TRATAMEN	1	2
1	2.48 A	1.66 B
2	2.34 A	2.68 A

T U K E Y

Variável = PRDX1 (0.5925434)

Interação TRATAMENxRACA Comparações 5%

RACA	1	2
1	2.48 A	2.34 A
2	1.66 B	2.68 A

Procedimento = Análise para modelos lineares

Objetivo = Análise de variância

Dependentes = IGF1R

Independentes= RACA TRATAMEN

Interação = RACA * TRATAMEN

Estadísticas Simples

Observações Perdidas = 0

Observações Válidas = 48

Distribuição dos Dados

Efeito Código Observações

RACA	1	24	-----
RACA	2	24	-----
TRATAMEN	1	24	-----
TRATAMEN	2	24	-----

Interações	Identificação	Dados
RACA X TRATAMEN	1 1	12
RACA X TRATAMEN	1 2	12
RACA X TRATAMEN	2 1	12
RACA X TRATAMEN	2 2	12

Nome	Média	Desvio
IGF1R	1.89857	1.07957 85

Determinante = 0.1000000E+01

Médias Estimadas

Variável Dependente	Efeito	Classes	Obser.	Médias Estimadas	Constantes
IGF1R	Média		48	1.898569	1.898569 0.1539345
IGF1R	RACA	1	24	2.145386	0.2468171 0.2176962
IGF1R	RACA	2	24	1.651752	-0.2468171 0.2176962
IGF1R	TRATAMEN	1	24	1.707386	-0.1911827 0.2176962
IGF1R	TRATAMEN	2	24	2.089751	0.1911827 0.2176962
IGF1R	RACA *TRATAMEN	1 1	12	1.987425	0.3322173E-01 0.3078689
IGF1R	RACA *TRATAMEN	1 2	12	2.303347	-0.3322173E-01 0.3078689
IGF1R	RACA *TRATAMEN	2 1	12	1.427347	-0.3322173E-01 0.3078689
IGF1R	RACA *TRATAMEN	2 2	12	1.876156	0.3322173E-01 0.3078689

Análise de Variância

IGF1R

Fontes de Variação G.L. Soma de Quadrado Quadrado Médio F Signif.

RACA	1	2.924095	2.924095	2.571	0.11601	
TRATAMEN	1	1.754440	1.754440	1.543	0.22083	
RACA TRATAMEN	1	0.5297681E-01	0.5297681E-01	0.047	*****	
Resíduo	44	50.04557	1.137399			

Coeficiente de Variação = 56.173

Procedimento = Análise para modelos lineares

Objetivo = Análise de variância

Dependentes = INHA

Independentes= RACA TRATAMEN

Interação = RACA * TRATAMEN

Estatísticas Simples

Observações Perdidas = 0

Observações Válidas = 48

Distribuição dos Dados

Efeito Código Observações

RACA	1	24	-----
RACA	2	24	-----

TRATAMEN	1	24	-----
TRATAMEN	2	24	-----

Interações Identificação Dados

RACA	X TRATAMEN	1	1	12
RACA	X TRATAMEN	1	2	12
RACA	X TRATAMEN	2	1	12
RACA	X TRATAMEN	2	2	12

Nome	Média	Desvio
INHA	2.59435	1.47904 87

Determinante = 0.1000000E+01

Médias Estimadas

Variável Dependente	Efeito	Classes	Obser.	Médias Estimadas	Constantes
INHA	Média		48	2.594352	2.594352 0.1943628
INHA	RACA	1	24	3.076956	0.4826032 0.2748705
INHA	RACA	2	24	2.111749	-0.4826032 0.2748705
INHA	TRATAMEN	1	24	2.148917	-0.4454354 0.2748705
INHA	TRATAMEN	2	24	3.039788	0.4454354 0.2748705
INHA	RACA *TRATAMEN	1	1	12	2.411336 -0.2201842
0.3887255					
INHA	RACA *TRATAMEN	1	2	12	3.742575 0.2201842
0.3887255					
INHA	RACA *TRATAMEN	2	1	12	1.886498 0.2201842
0.3887255					
INHA	RACA *TRATAMEN	2	2	12	2.337000 -0.2201842
0.3887255					

Análise de Variância

INHA

Fontes de Variação G.L. Soma de Quadrado Quadrado Médio F Signif.

RACA	1	11.17948	11.17948	6.165	0.01691
TRATAMEN	1	9.523811	9.523811	5.252	0.02676
RACA TRATAMEN	1	2.327093	2.327093	1.283	0.26341
Resíduo	44	79.78478	1.813290		

Coeficiente de Variação = 51.904

Procedimento = Análise para modelos lineares

Objetivo = Análise de variância

Dependentes = BAX

Independentes= RACA TRATAMEN

Interação = RACA * TRATAMEN

Estadísticas Simples

Observações Perdidas = 0

Observações Válidas = 48

Distribuição dos Dados

Efeito Código Observações

RACA	1	24	-----
RACA	2	24	-----

TRATAMEN	1	24	-----
TRATAMEN	2	24	-----

Interações Identificação Dados

RACA	X	TRATAMEN	1	1	12
RACA	X	TRATAMEN	1	2	12
RACA	X	TRATAMEN	2	1	12
RACA	X	TRATAMEN	2	2	12

Nome	Média	Desvio	
BAX	1.43512	0.87422	88

Determinante = 0.1000000E+01

Médias Estimadas

Variável	Efeito	Classes	Obser.	Médias	Constantes
----------	--------	---------	--------	--------	------------

Dependente		Estimadas					
BAX	Média	48	1.435123	1.435123	0.1098929		
BAX	RACA	1	24	1.875885	0.4407622	0.1554120	
BAX	RACA	2	24	0.9943608	-0.4407622	0.1554120	
BAX	TRATAMEN	1	24	1.343315	-0.9180765E-01		
0.1554120							
BAX	TRATAMEN	2	24	1.526931	0.9180765E-01		
0.1554120							
BAX	RACA *TRATAMEN	1	1	12	1.903554	0.1194760	
0.2197858							
BAX	RACA *TRATAMEN	1	2	12	1.848217	-0.1194760	
0.2197858							
BAX	RACA *TRATAMEN	2	1	12	0.7830772	-0.1194760	
0.2197858							
BAX	RACA *TRATAMEN	2	2	12	1.205644	0.1194760	
0.2197858							

Análise de Variância

BAX

Fontes de Variação G.L. Soma de Quadrado Quadrado Médio F Signif.

RACA	1	9.325024	9.325024	16.087	0.00023	
TRATAMEN	1	0.4045749	0.4045749	0.698	*****	
RACA TRATAMEN	1	0.6851766	0.6851766	1.182	0.28287	
Resíduo	44	25.50546	0.5796696			

Coeficiente de Variação = 53.052

Procedimento = Análise para modelos lineares

Objetivo = Análise de variância

Dependentes = STAR

Independentes= RACA TRATAMEN

Interação = RACA * TRATAMEN

Estatísticas Simples

Observações Perdidas = 0
 Observações Válidas = 48

Distribuição dos Dados

Efeito	Código	Observações	
RACA	1	24	-----
RACA	2	24	-----
TRATAMEN	1	24	-----
TRATAMEN	2	24	-----

Interações	Identificação	Dados
RACA X TRATAMEN	1 1	12
RACA X TRATAMEN	1 2	12
RACA X TRATAMEN	2 1	12
RACA X TRATAMEN	2 2	12

Nome	Média	Desvio	
STAR	1.91716	0.85106	90

Determinante = 0.1000000E+01

Médias Estimadas

Variável Dependente	Efeito	Classes	Obser.	Médias Estimadas	Constantes
STAR	Média		48	1.917159	1.917159 0.1208897
STAR	RACA	1	24	1.676450	-0.2407089 0.1709638
STAR	RACA	2	24	2.157868	0.2407089 0.1709638
STAR	TRATAMEN		1 24	1.905509	-0.1164954E-01
STAR	TRATAMEN		2 24	1.928808	0.1164954E-01
STAR	RACA *TRATAMEN	1 1	12	1.754879	0.9007846E-01

STAR 0.2417793	RACA	*TRATAMEN	1	2	12	1.598021	-0.9007846E-01
STAR 0.2417793	RACA	*TRATAMEN	2	1	12	2.056140	-0.9007846E-01
STAR 0.2417793	RACA	*TRATAMEN	2	2	12	2.259596	0.9007846E-01

Análise de Variância

STAR

Fontes de Variação G.L. Soma de Quadrado Quadrado Médio F Signif.

RACA	1	2.781157	2.781157	3.965	0.05270
TRATAMEN	1	0.6514163E-02	0.6514163E-02	0.009	*****
RACA TRATAMEN	1	0.3894782	0.3894782	0.555	*****
Resíduo	44	30.86542	0.7014869		

Coeficiente de Variação = 43.687

Procedimento = Análise para modelos lineares

Objetivo = Análise de variância

Dependentes = LHR2

Independentes= RACA TRATAMEN

Interação = RACA * TRATAMEN

Estatísticas Simples

Observações Perdidas = 0

Observações Válidas = 48

Distribuição dos Dados

Efeito Código Observações

RACA	1	24	-----
RACA	2	24	-----
TRATAMEN	1	24	-----
TRATAMEN	2	24	-----

Interações	Identificação	Dados
RACA X TRATAMEN	1 1	12
RACA X TRATAMEN	1 2	12
RACA X TRATAMEN	2 1	12
RACA X TRATAMEN	2 2	12

Nome	Média	Desvio
LHR2	4.43195	2.18546

Determinante = 0.1000000E+01

Médias Estimadas

Variável Dependente	Efeito	Classes	Obser.	Médias Estimadas	Constantes	
LHR2	Média		48	4.431948	4.431948	0.3164256
LHR2	RACA	1	24	4.513779	0.8183102E-01	0.4474934
LHR2	RACA	2	24	4.350117	-0.8183102E-01	0.4474934
LHR2	TRATAMEN	1	24	4.212294	-0.2196547	0.4474934
LHR2	TRATAMEN	2	24	4.651603	0.2196547	0.4474934
LHR2	RACA *TRATAMEN	1	1	12	4.759191	0.4650664
LHR2	RACA *TRATAMEN	1	2	12	4.268368	-0.4650664
LHR2	RACA *TRATAMEN	2	1	12	3.665396	-0.4650664
LHR2	RACA *TRATAMEN	2	2	12	5.034838	0.4650664

Análise de Variância

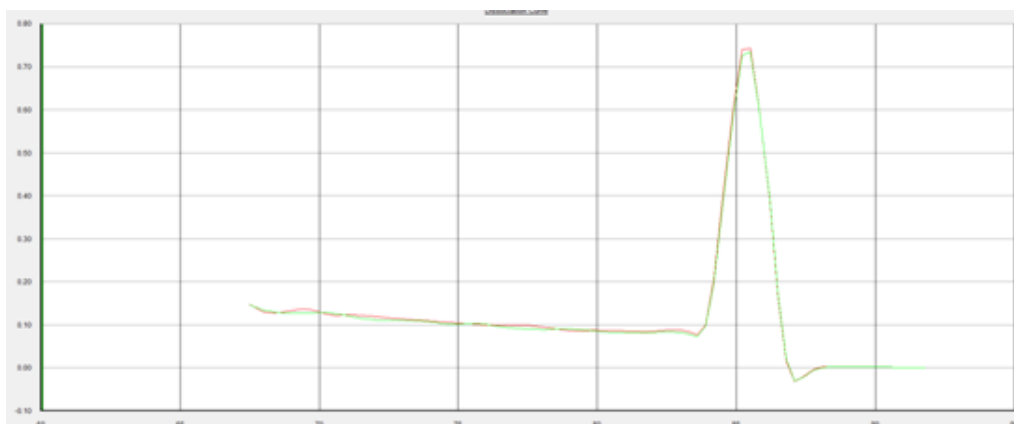
LHR2

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
RACA	1	0.3214231	0.3214231	0.067	*****
TRATAMEN	1	2.315912	2.315912	0.482	*****
RACA TRATAMEN	1	10.38176	10.38176	2.160	0.14875
Resíduo	44	211.4643	4.806008		

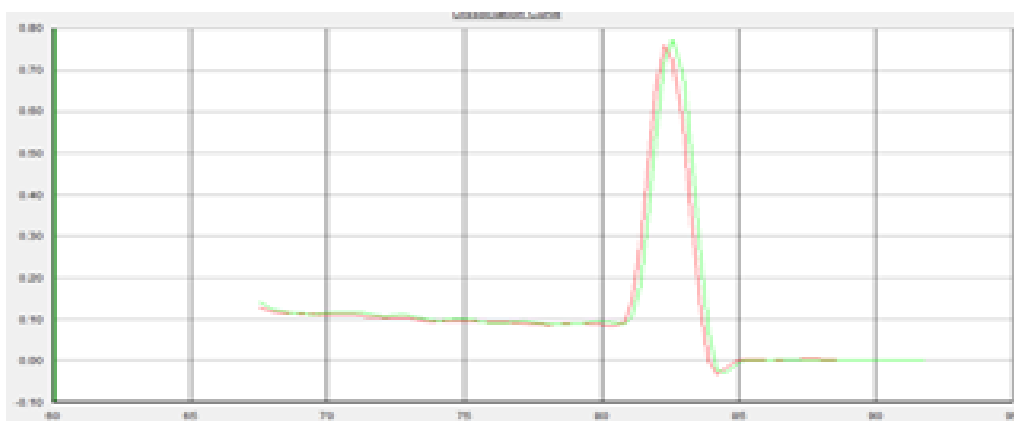
Coeficiente de Variação = 49.465

ANEXO E

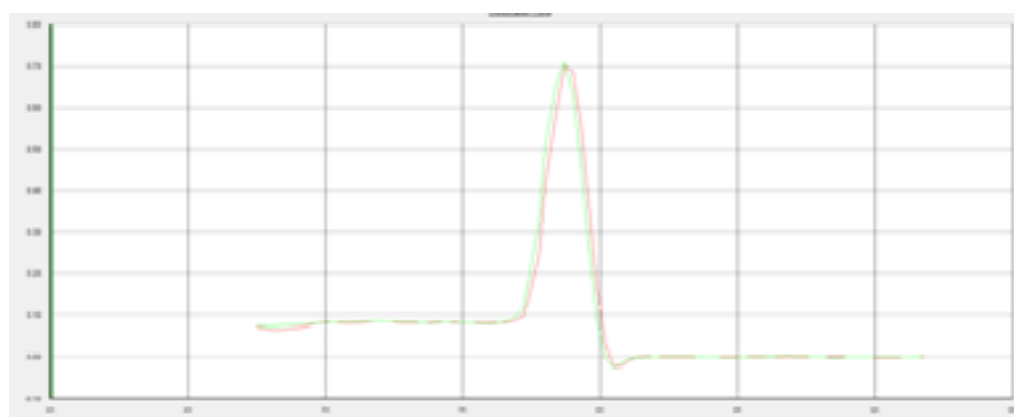
Curvas de dissociação dos genes



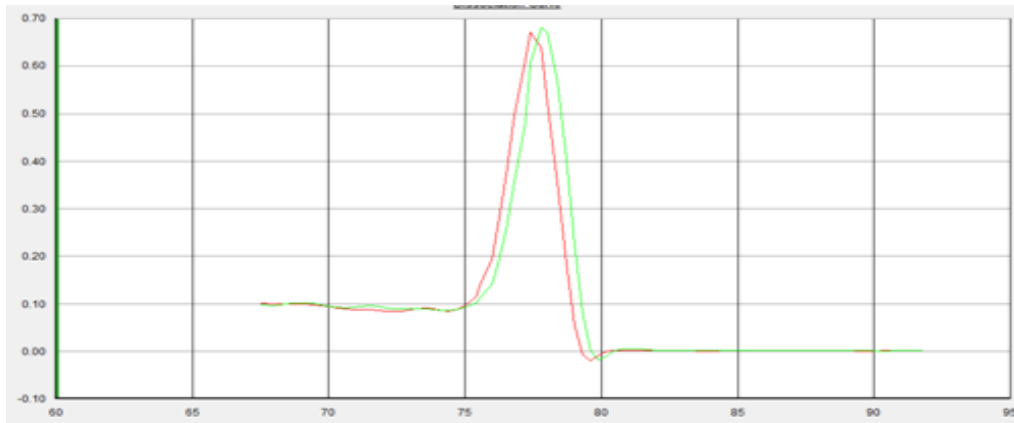
Curva de dissociação do gene β actina.



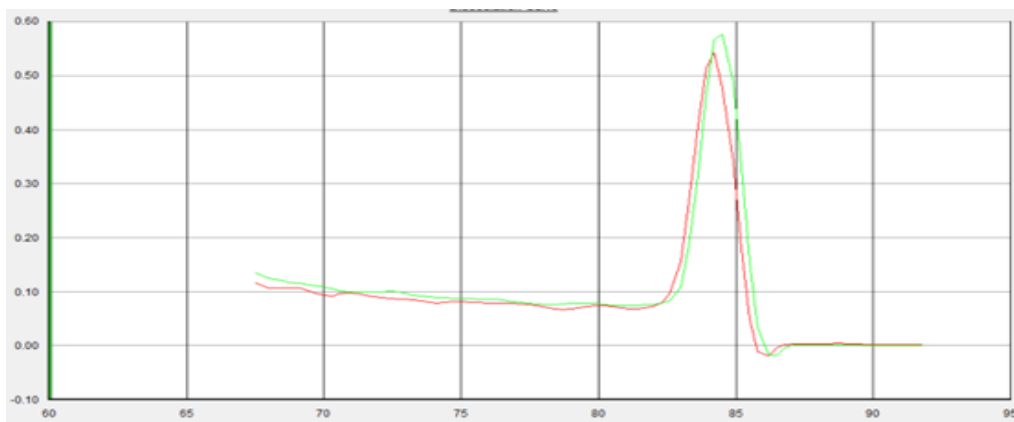
Curva de dissociação do gene GAPDH.



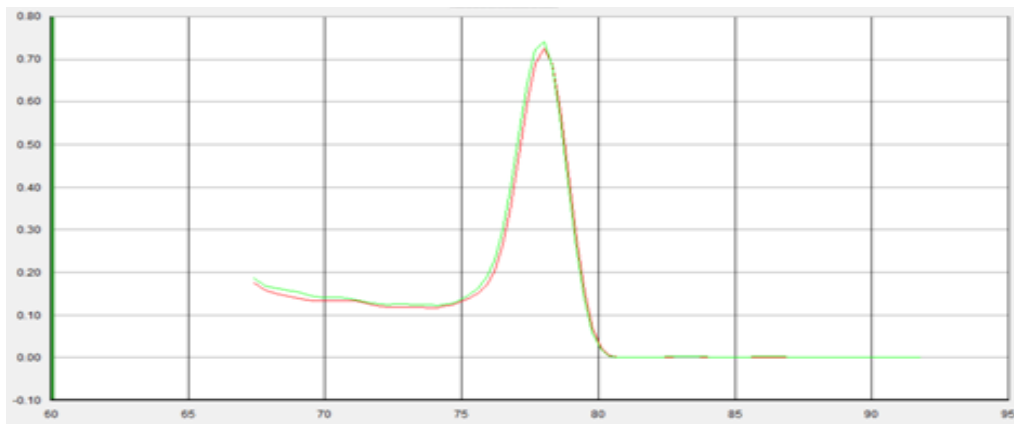
Curva de dissociação do gene PRDX1.



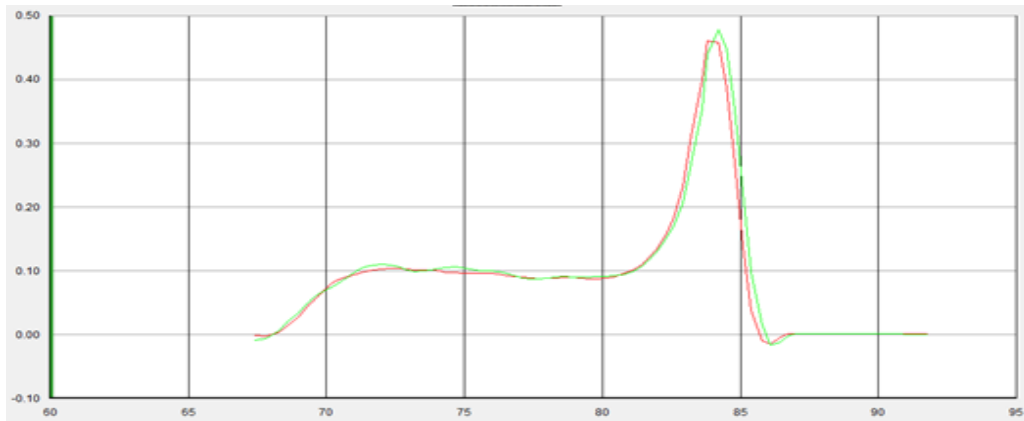
Curva de dissociação do gene LHR.



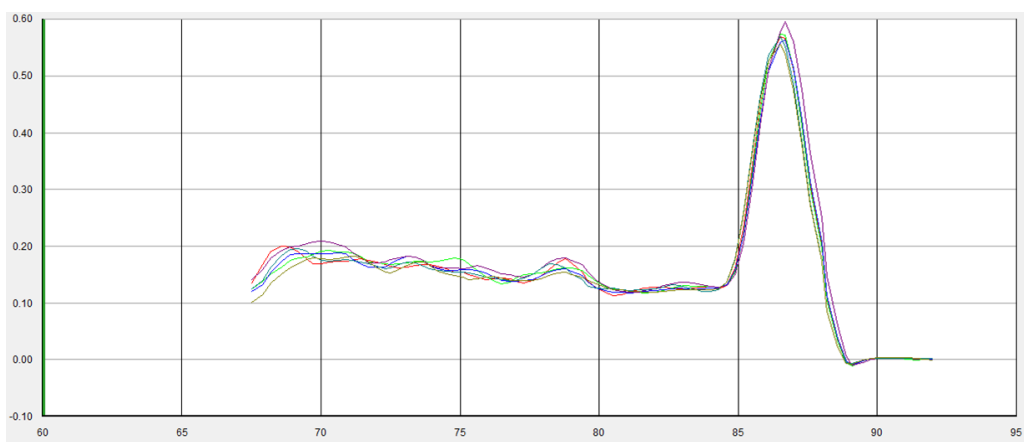
Curva de dissociação do gene IGFR.



Curva de dissociação do gene INHA.



Curva de dissociação do gene BAX.



Curva de dissociação do gene STAR.