

PRISCILA VENDRAMINI SILVA

**EXPRESSÃO GÊNICA EM FOLÍCULOS E TECIDO OVARIANO
DURANTE O CICLO ESTRAL DE SUÍNOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Genética e Melhoramento, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

PRISCILA VENDRAMINI SILVA

**EXPRESSÃO GÊNICA EM FOLÍCULOS E TECIDO OVARIANO
DURANTE O CICLO ESTRAL DE SUÍNOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Genética e Melhoramento, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 28 de julho de 2008.

Pesq. Marta F. M. Guimarães
(Co-orientadora)

Prof. José Domingos Guimarães
(Co-orientador)

Prof. Paulo Sávio Lopes

Pesq. Marco Antonio Machado

Prof^a. Simone Eliza Facioni Guimarães
(Orientadora)

Ao meu querido avô Morbello Vendramini (*in memoriam*),

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do curso e à CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

À professora Simone, que desde a iniciação científica sempre me deu grande apoio e tem me auxiliado na busca do conhecimento, pela orientação, confiança e amizade.

À Dra. Marta, pelos ensinamentos e conselhos, por ser sempre tão solícita. Ao professor JD, pela grande colaboração e pelas importantes sugestões para a realização deste trabalho.

Aos funcionários da Granja de Melhoramento de suínos da UFV, pela grande ajuda e disponibilidade durante a condução do experimento na granja. Ao Maurício, Hugo, Alberto e Miguel, pela colaboração na coleta de dados e manejo dos animais na granja de suínos.

Aos professores Paulo Sávio Lopes e Robledo de Almeida Torres, do Departamento de Zootecnia, pelos ensinamentos que auxiliaram na minha formação acadêmica.

A toda a equipe do Labtec, pela agradável convivência em grupo. Aos amigos Isabela, Katiene, Marcos Yamaki, Bruna, Nicola, Mário, Débora, Jairo, Fernanda, Rose e Juliana, pela amizade, pelos momentos de descontração e incentivo.

Aos meus tios Marcelo e Sylvia, pelo carinho e apoio durante toda a minha jornada em Viçosa.

Aos meus pais, em especial à minha mãe, pelos valiosos ensinamentos, por estar sempre comigo em pensamento, torcendo por mim e me fortalecendo com suas palavras e seu exemplo de vida.

Aos meus queridos avôs Inah e Morbello, pelo amor, pelo amparo e por tudo o que eles representam na minha vida. Às minhas irmãs Daniela, Juliana e Érica e aos meus sobrinhos queridos, pelo estímulo, atenção e carinho.

BIOGRAFIA

Priscila Vendramini Silva, filha de Décio Evandro da Silva e Livia Vendramini, nasceu em São Paulo – SP, em 05 de abril de 1982.

Em maio de 2002, ingressou no curso de Bioquímica, na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, concluindo a graduação em outubro de 2006.

Em outubro do mesmo ano, iniciou o Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação para obtenção do título de *Magister Scientiae*, em Genética e Melhoramento, dia 28 de julho de 2008.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Morfologia Ovariana e Ciclo Estral em suínos	3
2.2. Dinâmica do Desenvolvimento Folicular	5
2.2.1. Origem e formação do folículo primordial	5
2.2.2 Foliculogênese	6
2.2.3 Atresia Folicular e Apoptose da célula da granulosa	8
2.3 Estudo da expressão gênica no ovário	11
2.3.1 IGFs e IGFBPs	11
2.3.2 EGF	14
2.3.3 Caspases	15
2.3.4 p53	16
2.4. PCR quantitativo em Tempo Real	18
3.3 Quantificação das células	22
3.4 Extração do RNA total	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Indução do Estro em fêmeas pré-púberes	21
3.2 Coleta de material	22
3.5 Síntese da primeira fita de cDNA	24
3.6 Desenho dos primers	24
3.7 Cálculo da eficiência de amplificação	25
3.8 Reação de RT-PCR em tempo real	26
3.9 Análise dos resultados de expressão gênica	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5. CONCLUSÕES	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

RESUMO

SILVA, Priscila Vendramini; M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2008. **Expressão gênica em folículos e tecido ovariano durante o ciclo estral de suínos.** Orientadora: Simone Eliza Facioni Guimarães. Co-orientadores: Marta Fonseca Martins Guimarães e José Domingos Guimarães.

Durante o ciclo estral, uma rede de eventos hormonais e de fatores de crescimento celular atua de maneira autócrina e parácrina para regular o desenvolvimento folicular. Esses eventos são caracterizados por grande dinamismo na expressão gênica e no acúmulo de transcritos gerados. No presente estudo, avaliou-se a expressão dos genes *IGF-I*, *EGF*, *IGFBP (1, 2, 3 e 5)* e dos genes da cascata de apoptose celular (*caspase 3* e *p53*) em células foliculares e no tecido ovariano de fêmeas suínas nos dias 0, 6, 12 e 18 do ciclo estral por meio da técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). O RNA total das células foliculares e do tecido ovariano foi extraído para cada animal e utilizado como molde para a síntese da primeira fita de cDNA. O gene *GAPDH* foi utilizado como controle endógeno. Os resultados da expressão gênica foram analisados por regressão linear, considerando os dados de expressão gênica variável dependente e os dias do ciclo estral variáveis independentes (0, 6, 12 e 18 dias). Todos os genes analisados apresentaram expressão, sendo que o gene *IGFBP2* apresentou perfil de expressão linear aumentando durante o ciclo estral ($P < 0,02$), e o gene *IGFBP3* apresentou perfil de expressão quadrático ($P < 0,01$). Para os demais genes estudados, não foi verificado efeito da expressão gênica em função dos dias do ciclo estral. A técnica de qPCR mostrou-se eficiente na detecção de transcritos de baixa abundância e no maior entendimento da dinâmica folicular ovariana. Estudos devem ser ampliados para outros genes relacionados e de outras vias metabólicas para melhor entendimento dos estádios fisiológicos envolvidos na foliculogênese em suínos.

ABSTRACT

SILVA, Priscila Vendramini; M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2008. **Gene expression on follicles and ovarian tissue during estrous cycle from swine.** Adviser: Simone Eliza Facioni Guimarães. Co-advisers: Marta Fonseca Martins Guimarães and José Domingos Guimarães.

During a regular estrous cycle, a network of hormonal events, which consist of hormones and growth factors, interact to regulate ovarian follicular growth through autocrine and paracrine mechanisms. These events are marked by a high dynamism of gene expression and level of transcripts in the ovary tissue. Therefore, the objective of the present study was to characterize the expression of genes *IGF-I*, *IGFBP (1, 2, 3 e 5)*, *EGF* and genes related to follicular atresia (*caspase 3* and *p53*) in follicle cells and ovary tissue in sows during 0, 6, 12 e 18 days of estrous cycle through real-time quantitative PCR (qPCR) technique. The total RNA was extracted from follicle cells and ovary tissue for each animal, and used to synthesize the first strand cDNA. The *GAPDH* gene was used as endogenous control. The results of gene expression were analyzed using linear regression with gene expression as dependent variable and days of estrous cycle as independent variables. The expression of each gene was detected on follicle cells and ovary tissue, *IGFBP2* gene increased sequentially during the estrous cycle ($P<0,02$) and *IGFBP3* gene shows a quadratic expression pattern ($P<0,02$). For others genes the level of expression did not change during estrous cycle. The qPCR showed to be efficient for detection of low levels of transcripts and leads to a better understanding of follicle development dynamics. Studies should be done to examine the expression of other related genes as well genes of other metabolic pathways in order to broaden our understanding about the follicular stages of folliculogenesis in the pig.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os programas de melhoramento genético de suínos têm alcançado progresso próximo ao desejado para as características de desempenho e carcaça, tais como taxa de crescimento, percentual de carne e eficiência alimentar. Esse progresso tem se refletido na cadeia produtiva de carne suína no Brasil, que apresenta um dos melhores desempenhos econômicos internacionais, ocupando a quarta posição mundial, com uma produção de 3,0 milhões de toneladas em 2007 (ABIPECS, 2007).

Atualmente, maiores esforços têm sido direcionados para aumentar a eficiência produtiva por meio do melhoramento do desempenho reprodutivo das fêmeas suínas. Dentre as características reprodutivas, o tamanho da leitegada é um componente importante na redução de custos e na produtividade da atividade suinícola. Apesar da variabilidade genética existente, o tamanho da leitegada é uma característica complexa formada por muitos componentes (taxa de ovulação, capacidade uterina, sobrevivência embrionária e pós-natal), apresentando baixa herdabilidade, com expressão limitada pelo sexo e medida somente após a maturidade sexual.

A taxa de ovulação é um dos principais componentes que determinam o tamanho da leitegada, sendo definida como o número de oócitos liberados por estro (Knox, 2005). Durante o ciclo estral, hormônios e fatores de crescimento celular atuam de maneira autócrina e parácrina para regular o desenvolvimento folicular. Esses eventos são caracterizados por grande dinamismo na expressão gênica e no acúmulo de transcritos gerados.

Nesse sentido, o entendimento do controle de características reprodutivas requer, além do conhecimento da seqüência de DNA, a integração dos aspectos genéticos e fisiológicos que incluem o conjunto de transcritos, de proteínas e dos dados fenotípicos, a partir de uma grande variedade de técnicas, tais como seqüenciamento, avaliação da expressão gênica e análises mutacionais e transgênicas (Pomp et al., 2001).

Devido à importância da foliculogênese no sucesso reprodutivo em suínos e com o objetivo de melhor compreender os mecanismos moleculares envolvidos durante o desenvolvimento e a degeneração folicular

de porcas, alguns genes, cujos produtos são mediadores da dinâmica de desenvolvimento folicular, como o fator de crescimento semelhante à insulina (*IGF-I*), proteínas de ligação do IGF (*IGBFP 1, 2, 3 e 5*), fator de crescimento epidérmico (*EGF*), *caspase 3* e *p53*, foram selecionados para caracterização de seu perfil de expressão, visando à detecção de genes que possam ser testados e validados como marcadores do desenvolvimento e da atresia folicular.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Morfologia Ovariana e Ciclo Estral em suínos

Os ovários são estruturas pares localizadas na cavidade abdominal e pélvica do sistema reprodutor feminino (Coffey, 1997). Desempenham dupla função no organismo: estimulam o desenvolvimento e a liberação de óvulos e a síntese de hormônios esteróides. Ambas as funções são interdependentes, complementares e necessárias para o sucesso reprodutivo (Pineda, 1989).

A forma dos ovários varia de acordo com a espécie e o estágio do ciclo estral. Nos suínos, os ovários se assemelham a cachos de uvas, em decorrência do grande número de folículos e corpos lúteos salientes (Hafez e Hafez, 2004). O ovário é composto por uma região cortical e uma medular. A camada superficial do ovário é revestida por um epitélio denominado túnica albugínea, abaixo da qual está situado o córtex que contém grande massa de folículos em vários estádios de desenvolvimento, corpos lúteos e elementos do estroma (Reece, 2005). A região medular, responsável pela nutrição e sustentação do ovário, consiste de tecido conectivo frouxo, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e terminações nervosas que atingem o ovário mediante seu hilo (Hafez e Hafez, 2004).

O estro e a ovulação são decorrentes de um fenômeno que envolve o eixo hipotálamo-hipófise-ovário. O hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) secretado pelo hipotálamo atua na hipófise levando à liberação dos hormônios gonadotróficos folículo-estimulantes (FSH) e luteinizantes (LH). O FSH estimula o desenvolvimento folicular e a síntese de estrógenos pelas células da granulosa. O LH estimula a ovulação, o desenvolvimento, a manutenção e a função do corpo lúteo. Os estrógenos são responsáveis pelos sintomas do estro e pelo pico de LH que desencadeará a ovulação (Coffey, 1997).

A espécie suína atinge a puberdade entre seis e sete meses de idade. As taxas de ovulação são mais pronunciadas no terceiro estro após a puberdade (Reece, 2005). A duração do período do cio puberal geralmente é

mais curta (47 horas) que as posteriores (56 horas) e as porcas jovens (marrãs) têm um período de cio mais curto. Os oócitos são liberados entre 42 e 48 horas após o início do cio, e a duração do processo ovulatório é de aproximadamente 3,8 horas (Anderson, 2004).

Após a ovulação, cada tecido folicular rompido forma o corpo lúteo responsável pela produção e secreção de progesterona. Esse hormônio tem influência negativa sobre o desenvolvimento folicular, inibindo a secreção de FSH e LH por meio da supressão da liberação do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo (Coffey, 1997). O período de atividade do corpo lúteo é chamado de fase luteínica com duração de 16 a 17 dias em porcas. A fase folicular compreende o período de regressão do corpo lúteo até a ovulação, com duração de três a seis dias (Pineda, 2003). Durante a fase folicular, os folículos em crescimento secretam quantidades cada vez maiores de estrogênio que produz a liberação de LH por meio da atuação sobre o hipotálamo e a hipófise anterior, resultando na ovulação e na formação do corpo lúteo. Com a regressão do corpo lúteo, a secreção de progesterona é reduzida e o ciclo se repete (Coffey, 1997).

O ciclo estral é o período que compreende dois estros consecutivos, caracterizado por mudanças fisiológicas e no padrão de comportamento da fêmea, resultando na liberação de óvulos capazes de ser fertilizados e na formação do corpo lúteo (Hafez et al., 2004). Na espécie suína, o ciclo estral dura aproximadamente 21 dias, variando entre 17 e 25 dias e pode ser dividido em quatro fases distintas: proestro (fase folicular), estro (receptividade sexual), metaestro (desenvolvimento inicial do corpo lúteo) e diestro (período da fase madura do corpo lúteo) (Dukes, 1993). As fêmeas suínas são poliéstricas contínuas e somente prenhez ou disfunção endócrina interrompem sua ciclicidade (Hafez et al., 2004).

O estro (dia 0 a 2 do ciclo) é o período de receptividade das fêmeas, caracterizado por modificações comportamentais como inquietação, redução do apetite, aceitação da monta, hiperemia e edema vulvar, com duração média de 2 dias (Dukes, 1993). É determinado, principalmente, pelo nível de estrógeno circulante, ocorrendo a ovulação, durante ou pouco depois desse período, induzida pela redução dos níveis séricos de FSH e aumento dos níveis de LH, culminando com a ruptura do folículo ovariano e liberação do

folículo de Graaf (Frandsen, 1979).

O metaestro (dia 2 a 6 do ciclo) é a fase pós-ovulatória caracterizada pela atividade secretória de esteróides pelo corpo lúteo (Frandsen, 1979). Nessa fase, a concentração de progesterona aumenta abruptamente após o dia 2, alcançando valores máximos entre os dias 8 e 12 do ciclo, cuja função principal nessa espécie é manter a gestação (Foxcroft e Van de Wiel, 1982).

O diestro (dia 6 a 16) é período relativamente curto em animais poliétricos. Nessa fase, o endométrio suíno sintetiza PGF 2α durante a metade final da fase luteínica, provocando a regressão do corpo lúteo. Nesse período, os pulsos de LH e FSH estimulam o desenvolvimento de novos folículos e posterior ovulação (Foxcroft e Van der Wiel, 1982).

O proestro (dia 16 a 21) caracteriza-se pela fase de preparação do cio quando ocorre a maturação folicular e o desenvolvimento dos folículos sob o estímulo do FSH secretado pela hipófise anterior (Foxcroft e Van der Wiel, 1982). Durante essa fase, o folículo ovariano aumenta de diâmetro, devido ao aumento do líquido folicular que contém estrógeno. As concentrações de estrógeno no plasma periférico aumentam com o declínio e o desaparecimento da progesterona, atingindo valores máximos dois dias antes do cio, refletindo o rápido crescimento e maturação dos folículos de Graaf durante o final do proestro (Anderson, 2004).

2.2. Dinâmica do Desenvolvimento Folicular

2.2.1. Origem e formação do folículo primordial

Em mamíferos, a oôgenese ocorre no início da vida fetal, permanecendo estacionada no dictióteno da primeira prófase meiótica até a fase adulta sexualmente madura (Picton et al., 1998).

A oôgenese tem início com a formação das células germinativas primordiais (PGCs), precursoras móveis dos oócitos, que migram do seu sítio de origem para o ovário em desenvolvimento em resposta a estímulos quimiostáticos, como citocinas e fatores de sinalização (Gosden, 1995). Uma vez estabelecidas, essas células perdem a mobilidade e são referidas como oogônias (Picton et al., 1998). A população de oogônia prolifera por meio de divisões mitóticas por tempo determinado de acordo com a espécie. Após o

início da meiose, as células germinativas, agora chamadas de oócitos primários, continuam a fase de divisão passando pelas fases de leptóteno, zigóteno e paquíteno da prófase I da meiose antes de atingir a fase de diplóteno (Gosden e Bownes, 1995). Em suínos, a transição de oogônia a oócito estende-se por pelo menos até 35 dias de vida pós-natal. A meiose começa ao redor do 40° dia do desenvolvimento embrionário. O estágio de diplóteno inicia-se por volta do 50° dia e quase todas as células estão nessa fase cerca de 20 dias após o nascimento. A pequena quantidade de oogônias e a ausência de mitose oogonial indicam a conclusão da oogênese por volta do dia 100 do desenvolvimento fetal (Hafez, 2004).

Na fase de diplóteno, os oócitos continuam a aumentar de volume, com intensa replicação e reorganização das organelas citoplasmáticas. Nessa fase, os oócitos primários permanecem em um estado inativo até a puberdade quando os folículos selecionados estão aptos a ovular (Picton, 2001). Durante esse processo, os oócitos da região medular do ovário perdem a ligação com pontes intercelulares e são envolvidos por uma única camada plana ou poliédrica de células pré-granulosas, dando origem ao folículo primordial (Gosden e Bownes, 1995). A estrutura do folículo se torna completa com o surgimento de muitas camadas de células do estroma que se diferenciam em células da teca após o início do crescimento folicular. Uma vez estabelecida, a unidade folicular promove um ambiente controlado e isolado de substâncias que possam danificar o oócito. Oócitos não incorporados em folículos primordiais tendem a degenerar (Gandolfi, 2005).

Uma das modificações mais visíveis que ocorrem durante a oogênese em mamíferos é a formação da Zona Pelúcida (ZP), matriz extracelular constituída por glicoproteínas que circundam o oócito, estabelecendo regiões de contato com a camada interna das células da granulosa (as células do *cumulus*) (Richards, 1994). O contato intracelular permite a passagem de pequenas moléculas (<1500 Mr) envolvidas no metabolismo do oócito e na regulação da meiose (Gosden e Bownes, 1995).

2.2.2 Foliculogênese

A foliculogênese pode ser definida como o processo de desenvolvimento dos folículos ovarianos que tem início no recrutamento dos

folículos primordiais e termina com a formação do folículo de Graaf ou pré-ovulatório (Picton, 2001) ou morte celular (atresia). O processo de desenvolvimento folicular e de sobrevivência depende da sinalização endócrina e parácrina envolvendo fatores de crescimento secretados pelas células da granulosa, células da teca, células intersticiais do estroma e oócitos (Manabe et al., 2004).

Quando os folículos primordiais atingem a fase de crescimento, as células da granulosa começam a se dividir, o oócito se torna maior e circundado pela zona pelúcida. Gradualmente, os folículos se tornam secundários e são definidos como folículos pré-antrais. A fase inicial de crescimento é considerada independente de estímulos gonadotrópicos (Hafez, 2004), entretanto, alguns estudos sugerem a presença de receptores de FSH nesses folículos imaturos (Nussey e Whitehead, 2001).

Dentre as espécies animais, a suína destaca-se pela presença de grande número de folículos, compreendendo 30-90 folículos com 1 a 2 mm de diâmetro e 30-50 folículos com 2 a 7 mm de diâmetro durante a fase lútea do ciclo estral (Guthrie et al., 1995). Durante a fase folicular, o número de folículos pequenos e médios decresce dramaticamente, restando 10 a 20 folículos (Guthrie et al., 1995; Hafez, 2004). Os folículos destinados a ovular aumentam de tamanho entre os dias 14 e 16 do ciclo estral, atingindo 7 a 10 mm antes da ovulação (Cox, 1997). O padrão de desenvolvimento folicular de suínos é caracterizado pela ativação contínua, crescimento lento até o estágio de folículo antral, e rápido crescimento de 4 a 5 mm seguido por atresia (Guthrie, 2005). A ausência de ondas foliculares durante a fase lútea nas porcas poderia ser explicada pela atuação de hormônios (inibinas e estradiol) sintetizados pelo seu corpo lúteo, regulando negativamente os níveis de FSH e mantendo a concentração necessária para o recrutamento folicular (Driancourt, 2001).

A maturação dos folículos ovarianos envolve os seguintes estádios: iniciação, crescimento, seleção, ovulação e luteinização. Esses eventos estão sob controle endócrino. Uma vez que o folículo inicia seu crescimento, concentrações basais de gonadotrofinas, FSH e LH mantêm seu crescimento até o estágio de folículo antral. Os pequenos folículos antrais são selecionados para continuar crescendo por aumentos sutis nas

concentrações basais de gonadotrofinas. Uma vez selecionados, os folículos crescentes dominantes adquirem características funcionais específicas que lhes permitem diferenciar-se e passar para o estágio pré-ovulatório e sintetizar estradiol. Elevados níveis desse hormônio induzem a síntese de gonadotrofinas, que, por sua vez, estimulam a ovulação e a luteinização de folículos pré-ovulatórios (Richards, 1994). Entretanto, a maior parte dos folículos antrais se degenera e durante cada ciclo estral apenas uma parte é selecionada para a ovulação (Guthrie, 2005).

2.2.3 Atresia Folicular e Apoptose da Célula da Granulosa

Nos ovários de mamíferos, mais de 99% dos folículos, considerando a concepção até sua formação, sofrem um processo degenerativo conhecido como atresia que pode ocorrer em vários estádios do desenvolvimento folicular (Tilly, 1996). Em suínos, a maior taxa de ovulação e o tamanho da leitegada são verificados nas porcas da raça Meishan, que apresentam maior número de folículos terciários no dia 16 do ciclo estral e menor número de folículos atrésicos em relação às raças européias. A atresia limita o número de oócitos disponíveis para fertilização (Matsui et al., 2003). Dessa forma, a alta prolificidade da raça Meishan pode estar relacionada a diferenças no recrutamento folicular e na atresia (Manabe et al., 2004).

A degeneração folicular pode ser reconhecida pela presença das seguintes mudanças morfológicas: presença de núcleo picnótico e de corpos apoptóticos na célula da granulosa, seguida pela retração da camada de células da granulosa da membrana basal do folículo e fragmentação da membrana basal (Hirshfield, 1989).

A degeneração folicular nos ovários de mamíferos é primeiramente induzida pela apoptose das células da granulosa, que constitui um componente essencial para a função e para o desenvolvimento ovariano (Manabe et al., 1996). Durante a vida fetal, a apoptose ocorre principalmente nos oócitos, enquanto na vida adulta é detectada nas células da granulosa de folículos secundários e antrais (Hussein, 2005).

Em suínos, as células da granulosa situadas na superfície interna da parede folicular são as primeiras a sofrer apoptose (Sugimoto et al., 1998). A

identificação de diferenças em relação ao sítio de início desse processo em diferentes espécies sugere que os estímulos que induzem a via da sinalização da apoptose podem diferir entre as espécies (Manabe et al., 2004).

A apoptose ou morte celular programada é um mecanismo celular essencial para o desenvolvimento embrionário e para a homeostase de tecidos adultos, visando a eliminar células desnecessárias, infectadas ou danificadas geneticamente pela ativação de um programa de autodestruição celular intrínseco e controlado (Vaux, 1993). A morte da célula apoptótica pode ser induzida por estímulos ambientais ou fisiológicos, envolvendo gasto de energia pela célula e é freqüentemente regulada durante a transcrição ou a tradução (Guthrie, 1995).

A ativação bioquímica da apoptose pode ocorrer por duas vias de sinalização principais: a via extrínseca (citoplasmática) e a via intrínseca (mitocondrial). A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de morte, tais como Fas/APO-1/CD95, receptores 1 e 2 do fator de necrose tumoral (TNFR), interferon (IFN) e receptores 4 e 5 do fator de necrose tumoral relacionado à apoptose (TRAIL) (Nagata, 1997). Esta ligação é capaz de ativar a cascata de caspases intracelulares, com pelo menos 14 caspases já identificadas (Grutter, 2000).

A via intrínseca ou mitocondrial é freqüentemente ativada em resposta a danos no DNA, envolvendo a ativação de um membro pró-apoptótico da família Bcl-2 (principalmente Bax) (Hussein, 2005). Os membros pró e anti-apoptóticos da família Bcl-2 regulam a liberação do citocromo *c* a partir da membrana mitocondrial interna. O citocromo *c* liberado e a protease ativadora do fator 1 (Afa-1) ligam-se à caspase-9, formando o apoptossomo. A caspase 9 ativada inicia o processo e cliva as caspases efetoras subseqüentes (2, 3, 7, 8, 9 e 10) ativando a cascata de caspases que leva à morte celular por apoptose (Budihardjo, 1999).

Matsui et al. (2003) demonstraram que a via apoptótica dependente da mitocôndria contribui para a amplificação e propagação da morte por apoptose das células da granulosa em suínos. A via de apoptose mediada por receptor nas células da granulosa em suínos, proposta por Manabe et al.

(2004), está ilustrada na Figura 1 e pode ser descrita da seguinte maneira: (1) ligantes específicos se ligam ao domínio extracelular dos receptores de morte celular, resultando na trimerização e ativação dos seus domínios de morte intracelulares (DD); (2) os DD dos receptores interagem com o domínio DD da proteína adaptadora Fas associada ao domínio de morte (FADD) por meio de uma interação homofílica; (3) a FADD ativa uma caspase iniciadora (pró-caspase 8 ou FLICE), uma molécula bipartida contendo um domínio efetor de morte N-terminal (DED) e um domínio C-terminal (DD); (4) a pro-caspase 8 é ativada por auto-proteólise e a caspase 8 ativa cliva a proteína Bid, sua forma truncada libera o citocromo *c* da mitocôndria, e o citocromo *c* se liga ao fator de ativação de protease (Apaf-1), cuja oligomerização é dependente de ATP, recrutando a caspase 9 e formando um complexo multiprotéico denominado apoptosomo; e (5) a caspase 9 é ativada por mudanças conformacionais e ativa as caspases efetoras *downstream* (caspase 3) induzindo a morte celular (Manabe et al., 2004). Entretanto, a interação ligante-receptor de morte não resulta necessariamente na morte celular, indicando a importância de inibidores da via de sinalização apoptótica (Matsuda-Minehata, 2006), como as proteínas inibitórias intracelulares conhecidas como FLICE (cFLIPs e cFLIP_L, formas curta e longa, respectivamente) que são altamente expressas nas células da granulosa, onde atuam como fatores anti-apoptóticos de sobrevivência (Goto et al., 2004). Além disso, alguns sistemas de receptores de morte celular possuem receptores “*decoy*” que atuam como inibidores da morte celular induzida por ligantes na célula da granulosa (Manabe et al., 2004).

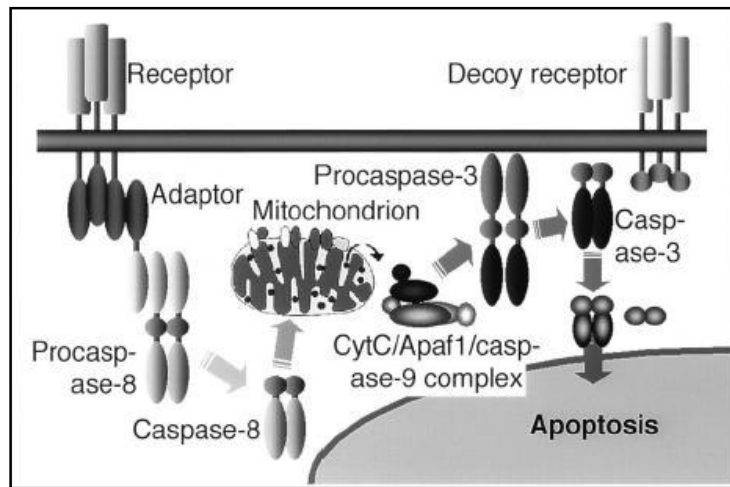


Figura 1. Ilustração esquemática da via de sinalização da apoptose mediada por receptores de morte nas células da granulosa dos folículos ovarianos de porcas, proposta por Manabe et al. (2004).

2.3 Estudo da expressão gênica no ovário

Com o intuito de compreender melhor os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento e na degeneração folicular de porcas, alguns genes cujos produtos são mediadores da dinâmica de desenvolvimento folicular foram selecionados para estudo nesta dissertação. A seguir, será feita a descrição dessas moléculas e de sua participação no desenvolvimento ovariano.

2.3.1 IGFs e IGFBPs

Diversos estudos têm mostrado que o sistema IGF, formado pelos fatores de crescimento semelhante à insulina (IGFs, *Insulin-like Growth Factors*) e proteínas de ligação do IGF (IGFBPs, *Insulin-like Growth Factor Binding Proteins*), exerce importante função no controle do desenvolvimento folicular e atresia em animais domésticos (Monget et al., 2002). O sistema IGF é composto por diferentes elementos: dois ligantes (IGF-I e IGF-II), dois tipos de receptores (IGFR-I e IGFR-II) e seis proteínas de ligação do IGF (IGFBP1, 2, 3, 4, 5 e 6), que se ligam ao IGF-I e IGF-II com alta afinidade (Jones e Clemmons, 1995; LeRoith et al., 1995; Rajaram et al., 1997).

Entretanto, a maior parte dos efeitos celulares dos IGFs no ovário é mediada pela ligação com o receptor tipo I (LeRoith et al., 1995).

A expressão do receptor tipo I parece ser modulada pela ação de gonadotrofinas e estrógenos nas células da granulosa (Adashi, 1998). A capacidade de o FSH induzir os receptores tipo I foi confirmada em estudos com camundongos hipofisectomizados tratados com esse hormônio. Esse tratamento resultou em um aumento significativo no acúmulo de transcritos para esse receptor (Adashi, 1998).

Os IGFs são hormônios peptídicos secretados por diferentes tecidos. Devido à sua reconhecida atividade promotora do crescimento celular, esses fatores também são conhecidos como somatomedinas (mediador dos efeitos da somatotrofina) (Jones e Clemmons, 1995). Os efeitos do IGF-I na proliferação e na diferenciação das células da granulosa foram verificados em camundongos (Adashi et al., 1990), ovinos (Campbell et al., 1995), suínos (Samaras et al., 1993) e humanos (Giudice, 1992). Entretanto, a resposta ao estímulo de proliferação ou de diferenciação das células da granulosa pelo IGF-I é variável de acordo com a espécie, com o estágio de desenvolvimento folicular e com as mudanças no perfil de expressão dos diferentes elementos do sistema IGF durante o crescimento folicular e a atresia (Mazerbourg et al., 2003).

Em ovários de suínos e roedores, transcritos do IGF-I estão localizados nas células da granulosa de folículos saudáveis, enquanto transcritos do IGF-II são encontrados nas células da granulosa de folículos saudáveis e atrésicos (Samaras et al., 1993; Zhou et al., 1996). Em suínos, o IGF-I exerce importante papel na foliculogênese, atuando na supressão da apoptose e na promoção da replicação das células da granulosa dos folículos pré-antrais, com potencial aplicação no desenvolvimento destes folículos *in vitro*, cujos oócitos estejam aptos para fertilização e desenvolvimento embrionário (Mao et al., 2004).

Embora a concentração da proteína IGF-I seja constante durante a fase folicular, sua biodisponibilidade pode ser regulada pela presença das proteínas de ligação do IGF no tecido folicular (Guthrie, 2005). As IGFBPs modulam os efeitos dos IGFs por mecanismos de regulação parácrinos e autócrinos. A origem dessa regulação pode depender do reconhecimento de

IGFBPs, que podem ser glicosiladas ou sofrer modificações pós-traducionais como fosforilação (Monget e Bondy, 2000). As IGFBPs modificam os efeitos dos IGFs por meio da regulação de seu transporte, de sua concentração nos compartimentos celulares e de sua interação com receptores celulares específicos, potencializando ou inibindo suas funções (Kostecká e Blahovec, 2002). O sistema IGF intra-ovariano está, dessa forma, envolvido na amplificação do sinal hormonal de gonadotrofinas (Adashi, 1998).

A IGFBP1 é uma proteína não glicosilada de 30 kDa, primeiramente isolada do fluido amniótico em humanos (Drop et al., 1979). É produzida pelas células do endométrio e decídua em humanos sob regulação do hormônio progesterona (Seppala et al., 1994). Está presente no fluido amniótico em concentrações 100 a 500 vezes superiores às do soro sanguíneo (Rajaram et al., 1997). O transcrito da IGFBP1 não foi detectado no ovário de camundongos e de suínos e não demonstra padrão consistente de expressão no ovário de humanos e de outros primatas (Zhou et al., 1996).

A IGFBP2 é uma proteína não glicosilada de 29 a 40 kDa, primeiramente identificada no fluido cérebro-espinhal de humanos e de camundongos (Spicer e Echterkamp, 1995). Sua expressão tem sido observada nas células da granulosa e nas células da teca em ovinos (Besnard et al., 1996), bovinos (Armstrong et al., 1998) e suínos (Samaras et al., 1992). Em muitas espécies, o aumento e o decréscimo na expressão do mRNA de IGFBP2 durante as fases de crescimento e de atresia, respectivamente, parecem explicar mudanças nos níveis intrafoliculares dessa proteína (Mazerbourg et al., 2003).

A IGFBP3 é uma proteína glicosilada de 150 kDa composta de duas subunidades de 28 e 53 kDa. É produzida pelas células lúteas da granulosa de suínos, camundongos e pelas células da teca e da granulosa em humanos (Spicer e Echterkamp, 1995). Sua concentração parece não mudar durante a foliculogênese na maioria das espécies, com exceção de ovinos. Nos folículos ovarianos, sua expressão é considerada baixa e parece não estar associada ao crescimento ou à atresia (Mazerbourg et al., 2003).

A IGFBP4 foi identificada primeiramente no soro sanguíneo de camundongos, possuindo peso molecular entre 24 a 30 kDa. Sua expressão

tem sido verificada em folículos pré-antrais de camundongos, células da teca humana (Spicer e Echterkamp, 1995) e células da teca e da granulosa em suínos (Mazerbourg et al., 2003).

A IGFBP5 é uma proteína de 29 a 31 kDa identificada primeiramente em folículos antrais e pré-antrais de camundongos e células do corpo lúteo em humanos (Spicer e Echterkamp, 1995). Em suínos, sua expressão ocorre nas células da granulosa. Os níveis e os sítios de expressão da IGFBP4 e da IGFBP5 diferem entre as espécies de mamíferos estudadas durante o crescimento folicular, sugerindo que essas proteínas possam ter funções específicas ou secundárias na foliculogênese ovariana. As mudanças nas concentrações dessas proteínas durante a foliculogênese podem ser atribuídas a dois processos: mudanças na expressão do mRNA e mudanças na degradação proteolítica (Mazerbourg et al., 2003).

2.3.2 EGF

O fator de crescimento epidérmico (EGF) é um polipeptídeo com potente atividade mitogênica em diversos tipos celulares *in vivo* e *in vitro* (Gospodarowicz e Bialecki, 1979). O EGF modula a diferenciação das células da granulosa de maneira parácrina ou autócrina, atuando como supressor do receptor de LH nas células da granulosa e como inibidor da produção de estradiol pelas células da teca em ratos (Mondschein e Schomberg, 1981).

O EGF atua por meio da ligação de alta afinidade com seu receptor transmembrana (EGF-R). O EGF-R pertence à classe dos receptores tirosina quinase e sua ligação ao EGF implica ativação da tirosina quinase do seu domínio intracelular e início da sinalização celular (Boonstra et al., 1995). A atividade de tirosina quinase do receptor adiciona grupos fosfatos aos resíduos de tirosina na cadeia vizinha. Proteínas sinalizadoras dentro da célula se ligam as tirosinas fosforiladas iniciando a cascata de transdução de sinal, resultando na ativação da síntese de DNA e no crescimento celular (Goodsell, 2003).

O EGF é membro da família das proteínas EGF com características estruturais e funcionais similares, que incluem o fator de crescimento de transformação- α (TGF- α), anfiregulina (AREG), epiregulina (ERG),

neuregulinas, betacelulinas (BTC) e fatores de crescimento semelhantes à EGF ligantes de heparina (HB-EGF) (Dreux et al., 2006). Dentre esses fatores, o EGF e TGF- α têm sido os mais investigados como reguladores da função ovariana (Singh et al., 1995). O EGF foi um dos primeiros fatores de crescimento identificados, como indutor da expansão das células do *cumulus* circundantes do oócito em camundongos (Dekel e Sherizly, 1985). Posteriormente, outros estudos verificaram que esse fator estava envolvido no processo de maturação de oócitos nos mamíferos em geral (Downs, 1989; Coskun e Lin, 1995; Lonergan et., 1996).

Em suínos, o EGF e o fator de crescimento de transformação- β (TGF- β) podem modular a esteroidogênese em células da teca e da granulosa executando importante papel no crescimento e na diferenciação celular (Hafez et al., 2004). A regulação da proliferação das células da granulosa nas porcas é resultado da ação combinada de fatores de crescimento adicionais, uma vez que a atividade mitogênica não é verificada sob o estímulo único de EGF (Keel e Davis, 1999). Fujinaga et al. (1992) demonstraram que receptores das células da granulosa dos folículos antrais e pré-antrais possuem maior capacidade de ligação ao EGF em relação às células lúteas, com ausência de ligação nas células da teca. Além disso, verificaram pequeno número de receptores específicos e de alta afinidade para o EGF nas células da granulosa. Esse número parece mudar durante o processo de diferenciação celular, indicando que o FSH pode influenciar na foliculogênese por meio da regulação de receptores de EGF nessas células.

2.3.3 Caspases

As caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*) constituem uma família de cisteína proteases, peptidases com cisteína no sítio ativo, capazes de reconhecer e clivar substratos após resíduos de ácido aspártico. As caspases são sintetizadas como precursoras inativas ou pró-enzimas devendo ser ativadas por clivagem proteolítica (Nicholson e Thornberry, 1997). A presença de ligações Asp-X entre os seus domínios sugere que sua ativação é autocatalítica, mediada por enzimas com especificidades similares, como outras caspases (Thornberry, 1998). Estudos sugerem que há distintas rotas de ativação de caspases na célula,

variando de acordo com o estímulo que inicia a apoptose (Slee et al., 1999).

As caspases são as principais moléculas efetoras da apoptose no ovário (Hussein, 2005). Pelo menos 14 caspases humanas já foram identificadas e classificadas em três grupos de acordo com sua especificidade: grupo I (caspases 1, 4, 5, 13); grupo II (caspases 2, 3 e 7); e grupo III (caspases 6, 8, 9, 10) (Grutter, 2000). Dentre estas, as caspases (3, 6, 7, 8, 9, 10) participam da apoptose (Boatright e Salvesen, 2003), enquanto um subgrupo dessa família está envolvido nos mecanismos de defesa inata, atuando como ativador de pró-citocinas (1, 4, 5) (Denault e Salvesen, 2002).

As caspases apoptóticas são classificadas como iniciadoras ou efetoras, de acordo com seu papel na cascata apoptótica. Caspases iniciadoras (8 e 9) são as primeiras a serem ativadas e constituem o primeiro passo da cascata de caspases, enquanto as efetoras (3, 6 e 7) são ativadas posteriormente e são responsáveis pela clivagem dos substratos (Boatright e Salvesen, 2003).

A Caspase 3 é uma caspase efetora da cascata apoptótica, responsável pela clivagem proteolítica total ou parcial de proteínas estruturais e funcionais em diferentes sistemas apoptóticos (Cohen, 1997). A caspase 3 é requerida para a ativação de quatro outras caspases (2, 6, 8 e 10) nessa via (Slee et al., 1999). Estudos em camundongos sugerem que a atividade da caspase 3 seja essencial para o desenvolvimento neural do embrião (Kuida et al., 1996) e regressão normal do corpo lúteo em camundongos (Carambula et al., 2002). Nessa espécie, a caspase 3 é expressa nas células da teca de corpos lúteos saudáveis assim como nas células da granulosa de folículos atrésicos, estando ausente em células da granulosa de folículos saudáveis. Sua expressão é regulada por gonadotrofinas e pode ser alterada durante o processo apoptótico nas células da granulosa (Boone e Tsang, 1998).

2.3.4 p53

O gene supressor de tumor p53 é um gene de resposta ao estresse que codifica uma proteína nuclear onco-supressora de 53 kDa (Hussein., 2005). A proteína p53 acumula-se no citoplasma durante a fase G1 participando da regulação do ponto de checagem e da transição para a fase

S. Está envolvida na manutenção da integridade do genoma, permitindo a ação de mecanismos de reparo do DNA ou remoção de células danificadas por meio do processo de apoptose (Lemoine, 1990).

A p53 atua como fator transcricional anti-proliferativo estimulando a taxa de transcrição de genes importantes para as funções celulares, como ilustrado no Quadro 1 (Levine, 1997). Possui muitas propriedades funcionais, podendo ativar 20 promotores diferentes, reprimir 26 diferentes promotores e *enhancers* e interagir com mais de 35 proteínas celulares e virais (Hussein, 2005). Os componentes que interagem com o p53 na via de apoptose incluem proteínas cinases que fosforilam a p53, gene *mdm2* (*murine of double minute 2*) e as proteínas GADD45 (*growth arrest and DNA damage inducible protein*) e p21Cip1/Waf (*wild-type p53-activated fragment 1*) (Haapajarvi et al., 1999).

Quadro 1 – Produtos de genes cuja transcrição é ativada pela p53.

Produtos de genes	Função celular
p21, WAF1, Cip1	Inibem cinases dependentes de ciclina, ligam-se a ciclinas e ao antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), promovendo a parada do ciclo celular.
MDM2	Produto de oncogenes, inativa a transcrição mediada pela p53 e forma uma <i>alça</i> de auto-regulação com atividade de p53.
GADD45	Induzida por danos no DNA liga-se à PCNA promovendo a parada no ciclo celular, envolvida diretamente na excisão de nucleotídeos e reparo.
Ciclina G	Ciclina de função desconhecida, não dependente de quinase.
Bax	Membro da família Bcl2 que promove apoptose, não sendo induzida pela p53 na célula.
IGFBP3	Proteína de ligação do IGF que bloqueia a sinalização de fatores de crescimentos mitogênicos.

Fonte: Adaptado de Levine (1997).

A expressão da proteína p53 nas células da granulosa de folículos atrésicos em camundongos foi verificada por Kim et al. (1999). Estudos têm sugerido que o sistema da proteína de membrana Fas com seu ligante FasL estão envolvidos no processo de apoptose dessas células atuando como mediadores da atresia folicular em ratos, por meio da via antígeno Fas/p53. Embora a proteína Fas e seu ligante sejam expressos em vários tecidos, somente a proteína Fas e seu transcrito têm sido descritos nas células da granulosa de roedores (Hakuno et al., 1996).

Tilly et al. (1995), com base em estudos de expressão da p53 durante a atresia folicular, verificaram que a inibição da expressão da p53 está associada à redução significativa do número de células apoptóticas da granulosa e de folículos atrésicos. Além disso, a superexpressão da proteína p53 é capaz de induzir a apoptose na presença de AMP cíclico, sugerindo sua possível função na atresia.

2.4. PCR quantitativo em Tempo Real

O PCR quantitativo em tempo real (qPCR) é um método eficiente para a quantificação dos níveis de transcritos de mRNA devido à sua acurácia, sensibilidade e reprodutibilidade (Nygard et al., 2007). Requer quantidades mínimas de RNA e dispensa manipulações após a reação (Radonic et al., 2004). É um método rápido e promove medidas simultâneas de expressão gênica em diferentes amostras para um número limitado de genes, auxiliando no entendimento de redes regulatórias complexas e identificação de genes relevantes nos processos biológicos e nos mecanismos de doenças (Hendriks-Balk et al., 2007).

A cinética da reação de amplificação é monitorada em cada ciclo, e os dados do sinal de fluorescência são coletados à medida que a reação ocorre, combinando a amplificação e a detecção em um único passo (Scheffe et al., 2006). Vários sistemas de detecção têm sido desenvolvidos para uso no qPCR, variando na especificidade do alvo de amplificação, no custo, no tipo de dye e na precisão. O SYBR green é um fluoróforo intercalante capaz de se ligar a qualquer fita dupla de DNA e emitir fluorescência, de forma que a intensidade do sinal emitido seja proporcional à quantidade de produto gerado na qPCR (Bustin e Nolan, 2004).

Existem dois diferentes métodos para a análise dos dados do PCR em tempo real: a quantificação absoluta e a relativa. A quantificação absoluta determina o número de cópias iniciais do transcrito de interesse, em função de uma curva padrão (Wong e Medrano, 2005). A quantificação relativa ou método comparativo se baseia na comparação da expressão do gene alvo com a referência interna por meio dos valores de C_t (*threshold cycle*) de cada amostra (Pfaffl et al., 2002). O valor de C_t é o número de ciclos de PCR requerido para que cada curva de amplificação alcance o

limiar de detecção. Esses valores são representativos do número de cópias do molde inicial, sendo usados para cálculo dos resultados experimentais (Heid et al., 1996; Ginzinger, 2002).

O método de quantificação relativa tem a vantagem de não necessitar da construção de curva padrão. Entretanto, as eficiências de amplificação do alvo e da referência endógena devem ser aproximadamente iguais para uma quantificação acurada. Para o cálculo da eficiência, utilizam-se, como molde, diluições seriadas do cDNA. Os resultados são representados em um gráfico (\log_{10} concentração $\times C_i$), e a inclinação da reta é utilizada para determinar a eficiência de reação (Livak e Schmittgen, 2001).

Em ambos os métodos, recomenda-se a normalização do gene alvo com um gene de referência ou endógeno para ajustar diferenças na quantidade de material inicial e na variação da eficiência de amplificação (Bustin et al., 2005). Os genes de referência selecionados devem apresentar expressão constitutiva entre as amostras, por exemplo, β -actina, GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase), RNA ribossomal, entre outros, e não devem sofrer influência do tratamento experimental (Giulietti et al., 2001; Ginzinger, 2002).

A qPCR tem contribuído para melhor entendimento da complexidade fisiológica do transcriptoma suíno, permitindo a identificação de genes candidatos para características de interesse, tais como as reprodutivas (Rothschild, 2003). Estudos têm sido realizados visando a estabelecer o perfil de expressão de genes que codificam fatores de crescimento e citocinas, envolvidos no crescimento e na apoptose celular nos tecidos reprodutivos de fêmeas suínas. Sakumoto et al. (2006) detectaram, por meio do qPCR, transcritos da IL-6 e da IL-4 e de seus receptores no corpo lúteo durante o ciclo estral de fêmeas suínas da raça Meishan, sugerindo que a IL-6 e a IL-4 são localmente produzidas, atuando na inibição da produção de esteróides pelas células luteínicas, por meio de seus receptores específicos. Wen et al. (2006) verificaram que o mRNA da proteína Stat3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) é altamente expresso no ovário, no oviduto e no útero, sugerindo que esta proteína atua na dinâmica ovariana em suínos. Outros estudos têm investigado o perfil da expressão dos genes envolvidos na atresia folicular, tais como IL-6 (Maeda et al., 2006)

e conexina 43 (Cheng et al., 2005). A expressão do mRNA para a IL-6 no tecido ovariano decresce durante a atresia folicular em suínos, sugerindo sua participação nas vias de transdução de sinal nas células ovarianas. O mRNA do gene da conexina 43 foi detectado nas células da granulosa de folículos secundários saudáveis e folículos terciários atrésicos, com ausência de expressão em folículos primordiais e primários, sugerindo sua participação na apoptose das células da granulosa durante a atresia folicular nessa espécie.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Indução do Estro em fêmeas pré-púberes

O experimento foi conduzido na Granja de Melhoramento Genético de Suínos da Universidade Federal de Viçosa, MG. Foram utilizadas 16 fêmeas das linhagens comerciais (Landrace x Large White x Pietrain), aos $203,81 \pm 13,57$ dias de idade e peso médio de $98,90 \pm 12,09$ kg no início do experimento.

A indução do estro em leitoas pré-púberes foi realizada pela administração de uma dose única (5 mL) de P.G 600 (Intervet América, Millsboro, D.E) de acordo com Estill (1999). Cada dose de P.G 600 é composta por 400 UI de eCG (gonadotrofina coriônica eqüina) e 200 UI de hCG (gonadotrofina coriônica humana). A detecção do estro foi realizada duas vezes ao dia, pela manhã e à tarde, na presença do varrão.

As fêmeas foram pesadas no primeiro e segundoaios e apresentaram peso médio entre $120,10 \pm 12,52$ kg e $129,50 \pm 10,51$ kg, respectivamente. O primeiro cio foi diagnosticado aos $3,12 \pm 0,83$ dias, em média, após a administração de P.G 600, em nove (56,25%) das 16 fêmeas. Quatro (25,0%) das fêmeas não apresentaram sinais de proestro em até 10 dias após a administração de P.G 600 e foram tratadas com Preloban (Intervet América, Millsboro, D.E), apresentando cio após $5,75 \pm 1,89$ dias em média. A indução não foi necessária em três animais (18,75%), que apresentaram o cio naturalmente, no intervalo de $22,00 \pm 1,00$ dias e duração de $3,00 \pm 1,73$ dias no primeiro e de $2,66 \pm 0,57$ no segundo cio.

O ciclo estral durou em média $21,00 \pm 1,50$ dias, e as durações médias do estro no cio induzido e no cio subsequente foram de $2,56 \pm 1,09$ dias e $2,72 \pm 0,46$ dias, respectivamente. No segundo ciclo estral, os animais foram abatidos nos dias pré-determinados do ciclo, uma vez que o primeiro cio pode estar sujeito a flutuações hormonais que normalmente ocorrem nesta fase.

3.2 Coleta de material

As porcas foram abatidas após o segundo estro consecutivo em quatro grupos nos dias 0 (zero), 6, 12 e 18 do ciclo estral, considerando 0 (zero) o primeiro dia do cio. Cada grupo foi composto por quatro fêmeas, marcando dessa forma o estro (fase 1, dia 0), metaestro (fase 2, dia 6), diestro (fase 3, dia 12) e proestro (fase 4, dia 18), respectivamente.

O abate foi feito por atordoamento elétrico e sangria. Em seguida, os ovários foram coletados e transportados em isopor com gelo para o Laboratório de Biotecnologia Animal (LABTEC) no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, onde foi realizada a aspiração do líquido folicular dos folículos de 2-10mm de diâmetro com um aspirador de células a vácuo. Após a aspiração, as células foliculares foram peletizadas por centrifugação do líquido folicular a 5.000 x g, durante 6 minutos. As células foram ressuspensas com 500µL de tampão fosfato salino 1X (PBS 1X - *Phosphate Buffered Saline*) para lavagem e contagem do seu número. Em seguida, o córtex ovariano foi cortado e armazenado em *RNA holder* (BioAgency, São Paulo, SP, Brasil) e congelado a -20°C para posterior extração do RNA total deste tecido. A extração do RNA do córtex ovariano e das células da granulosa foi feita separadamente.

3.3 Quantificação das células

A contagem do número de células foliculares foi realizada utilizando o método hemocitométrico. A contagem, necessária para ajuste do volume de tampão utilizado na extração do RNA total, foi feita de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Número de células/mL} = \frac{N^{\circ} \text{ total de células}}{2} \times 50 \times 10.000$$

Para obter o número de células por mL de solução, multiplica-se o valor encontrado por 1.000, pois 1 mL equivale a 1.000 mm³ e multiplica-se o resultado por 10, pois na câmara é obtido o número de células por 0,1 milímetro cúbico (mm³), e, assim, o valor foi multiplicado por 10.000.

3.4 Extração do RNA total

O RNA total das amostras de células foliculares e de tecido ovariano foi extraído separadamente, utilizando-se o Kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. As células em suspensão foram peletizadas e ressuspensas em tampão RLT contendo β -mercaptoetanol (1%) para lise celular. O tampão RW1 contendo etanol foi adicionado ao lisado para promover condições favoráveis de ligação do RNA à membrana de sílica-gel. Foi realizado tratamento adicional com a enzima DNase I para remoção de resquícios de DNA que poderiam interferir na análise de PCR em Tempo Real. Nesse passo, foram adicionados à membrana o *mix* contendo 10 μ L de DNase I e 70 μ L de tampão RDD, fornecidos pelo Kit RNase-Free DNase set (Qiagen, Valencia, CA, EUA). A coluna foi lavada com o tampão RPE por duas vezes e o RNA ligado à coluna foi eluído em 50 μ L de água livre de RNase por centrifugação a 5.000 x g, durante três minutos.

O RNA total das amostras de tecido ovariano foi extraído utilizando-se em média 30mg do tecido previamente estocado em RNA *holder* (BioAgency, São Paulo, SP, Brasil). Após pesado, o tecido foi homogeneizado em tampão RLT, contendo β -mercaptoetanol (1%), utilizando o homogeneizador de tecidos Homomixer (Homomix). O lisado foi então centrifugado a 5.000 x g por 3 minutos para precipitação dos restos celulares, e somente o sobrenadante foi transferido para a coluna seguindo o mesmo procedimento descrito acima para a extração de RNA total das células foliculares.

A concentração de RNA das amostras de células foliculares e de tecido ovariano foi determinada em espectrofotômetro, e a qualidade e integridade foram verificadas pela razão OD_{260}/OD_{280} e em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídeo. O RNA total foi armazenado a -70°C até o momento de uso.

Foram utilizados como molde para a síntese da primeira fita de cDNA quantidades equivalentes de RNA provenientes das células foliculares e do tecido ovariano para o mesmo animal, com o objetivo de avaliar a expressão e o acúmulo de mensageiros das duas fontes, uma vez que a expressão

gênica pode variar de acordo com o tipo e compartimento celular.

3.5 Síntese da primeira fita de cDNA

A síntese da primeira fita do DNA complementar (cDNA) foi feita com o Kit SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). As reações foram feitas com o mix de RNA para cada animal e continham 1 µg de RNA total, 1µL do *primer* oligo(dT)₂₀ 50µM e 1µL de *Anneling Buffer*. A reação foi incubada a 65°C por 5 minutos e transferida para um recipiente com gelo por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 10 µL de *2X First-Strand Reaction Mix* e 2 µL de *SuperScript III/RNaseOUT Enzyme Mix* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A reação foi incubada a 50°C por 50 minutos, a 85°C por 5 minutos e resfriada no gelo. As concentrações de cDNA das amostras foram estimadas por espectrofotometria, e o cDNA fita simples foi estocado a -20°C até o uso na reação de qPCR.

3.6 Desenho dos primers

Os *primers* utilizados para amplificação dos fragmentos dos genes cujos produtos participam do desenvolvimento ovariano e do controle endógeno foram desenhados por meio do programa *PrimerQuest* (www.idtdna.com/Scitools/Applications/PrimerQuest) fornecido pela Integrated DNA Technologies, Inc (Coralville, IA) a partir de seqüências de nucleotídeos obtidas do banco de dados do GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

A especificidade dos *primers* foi verificada em gel de agarose 2% e a análise das curvas de dissociação possibilitou verificar a temperatura de desnaturação do produto amplificado, permitindo diferenciar produtos inespecíficos dos produtos esperados. Os conjuntos de *primers* utilizados podem ser visualizados na Tabela 1.

Tabela 1 - Seqüências de nucleotídeos, tamanho do *amplicon* e temperatura de anelamento (TA) dos *primers* utilizados para as reações de qPCR.

Gene	Seqüência de oligonucleotídeos	Amplicon (pb)	TA (°C)
GAPDH	F: CAAAGTGGACATTGTCGCCATCA R: AGCTTCCCATTCTCAGCCTTGA	124	60
IGF-I	F: TGCCCAAGGCTCAGAAGGAAGTA R: GGTAACCTCGTGCAGAGCAAAGGA	146	59
IGFBP1	F: CCCATCCTTTGGAACGCCATCAAT R: TGGCTAGTCTGTCCAGCACTTTGT	121	60
IGFBP2	F:AGCATGGCCTGTACAACCTCAAAC R: CTGCTGCTCGTTGTAGAAGAGAT	156	59
IGFBP3	F: GTCCACACCAAGATGGACGTGAT R: CATG TTCAGGA ACTTGAGGTGGT	188	60
IGFBP4	F: GGGCGTGTTTCATTCAGCACACATT R: GGAATGAGTGCTTTCTCTGGGT	95	60
IGFBP5	F: GCAAGCCAAGATCGAGAGAGACT R: TCAGCTTCTTTCTGCGGTCCTTCT	159	60
EGF	F: TGTATTGGTGCGATGCCAAGCAG R: AACACAGCTACCGCAAATGGGTG	114	60
Caspase 3	F:ATGCTGCAAATCTCAGGGAGACCT R:CACCATGGCTTAGAAGCACGCAA	159	60
p53	F: GAACAGCTTTGAGGTGCGTGTTT R: ATACTCGCCATCCAGTGGCTTCTT	182	60

GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, IGF-I: fator de crescimento semelhante à insulina, IGFBPs: proteínas de ligação do IGF, EGF: fator de crescimento epidérmico.

3.7 Cálculo da eficiência de amplificação

A eficiência de amplificação de cada gene foi calculada por meio da construção de uma curva de diluição em série de cDNA nas concentrações de 1, 10, 100 e 200 ng por reação. Foram consideradas eficientes aquelas reações em que a eficiência de amplificação do gene alvo e do gene referência foram aproximadamente iguais, com tolerância de 10% de variação em relação ao controle endógeno, tal como descrito por Livak e Schmittgen (2001).

A partir dos dados obtidos, um gráfico de C_t (*threshold cycle*) versus o \log_{10} da quantidade de cDNA utilizada na reação foi produzido. Foi utilizada a regressão linear para determinação do coeficiente angular da reta para determinar a eficiência de amplificação, de acordo com a equação

desenvolvida por Pfaffl (2001):

$$E = 10 \left(\frac{-1}{\text{inclinação da reta}} \right) - 1$$

Depois de verificada a eficiência para cada gene alvo e para o controle endógeno, foram escolhidas a diluição de cDNA e a concentração de *primer* que apresentavam maior eficiência para preparar as reações de quantificação relativa.

3.8 Reação de RT-PCR em tempo real

As reações foram efetuadas em termociclador *ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems* (*Applied Biosystems*, Foster City, C.A., EUA), utilizando o kit de SYBR Green[®] PCR Master Mix (*Applied Biosystems*, Foster City, C.A., EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Este kit contém todos os componentes (exceto *primer* e molde), necessários para as reações de PCR: tampão 2X, dNTPs, MgCl₂, SYBR Green I Dye, AmpliTaq Gold[®] DNA polimerase e ROX como referência passiva. As reações continham 12,5 µL desse mix, 5 µL de cDNA, *primer* e água, totalizando um volume final de 25 µL. As concentrações de *primer* e de cDNA foram otimizadas anteriormente para cada gene.

As condições de amplificação para todos os sistemas foram: 95°C durante 5 minutos; 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos; anelamento; e extensão a 60°C durante 60 segundos. Ao final dos 40 ciclos de amplificação, um passo adicional com elevação gradual da temperatura de 60°C a 94°C foi utilizado para obtenção da curva de dissociação.

A amplificação dos genes alvo e da referência endógena foi realizada em diferentes canaletas na mesma placa de reação. Todas as reações para um mesmo gene alvo foram feitas em duplicatas em placas ópticas de 96 poços, seladas com filme adesivo.

Os dados obtidos na reação de qPCR foram gerados pelo equipamento na forma de valores de C_t, que representam o ciclo de início da detecção do produto amplificado. Os valores médios de C_t foram subtraídos entre si para o cálculo de ΔC_t (C_t do alvo - C_t da referência

endógena), a fim de minimizar as possíveis variações quanto à quantidade de mRNA inicial e à eficiência na transcrição reversa. A quantidade de alvo, normalizada para a referência endógena, foi calculada pela fórmula $2^{-\Delta Ct}$ (Pfaffl, 2001; Livak e Schmittgen, 2001).

3.9 Análise dos resultados de expressão gênica

Para a análise dos dados de expressão gênica, foi utilizado o programa SAEG – Sistemas de Análises Estatísticas e Genéticas (v 8,0). Os resultados foram analisados por meio de regressão linear, considerando os dados de expressão de cada gene como variável dependente e os dias 0, 6, 12 e 18 do ciclo estral como variáveis independentes.

A normalidade dos dados de expressão de cada gene foi verificada por meio do Teste de Lilliefors, e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Cochran e Bartlett. Para o caso de falta de normalidade ou variância heterogênea, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal - Wallis.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O RNA total isolado das amostras de células foliculares e de tecido ovariano foi quantificado por espectrofotometria com razão OD_{260}/OD_{280} média de $2,1 \pm 0,028$. A integridade das amostras de RNA total foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,2%. A presença das bandas de RNA ribossomal 28S e 18S indica boa qualidade do RNA, como pode ser observado na Figura 2.

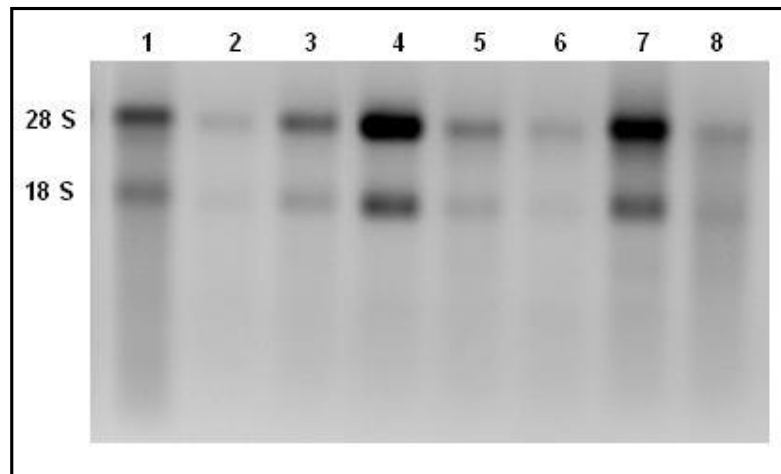


Figura 2 – Amostras de RNA total após eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídeo. Colunas 1 a 4 correspondem ao RNA extraído a partir de amostras de células foliculares. Colunas 5 a 8 correspondem ao RNA extraído a partir de amostras de tecido ovariano.

A curva de amplificação obtida a partir da diluição seriada de cDNA permitiu a determinação da melhor condição de amplificação para cada gene, na qual a eficiência de amplificação do gene alvo e a do controle endógeno foram aproximadamente iguais. As concentrações de oligonucleotídeos iniciadores e de cDNA utilizados nas reações de amplificação podem ser vistas na Tabela 2. Como a eficiência de amplificação para o gene IGFBP4 se mostrou abaixo do valor recomendado pela literatura, ele foi descartado da análise de expressão.

Tabela 2 - Concentração de *primer*, cDNA, temperatura de dissociação (TD) e eficiência da reação (E) para os genes analisados.

Gene	Primer (nM)	cDNA (ng/reação)	TD (°C)	E
IGF-I	400	100	78,9°C	0,986
IGFBP1	400	200	81,8°C	0,937
IGFBP2	400	100	85,2°C	0,967
IGFBP3	400	100	85,2°C	0,893
IGFBP4	200	100	76,2°C	0,480
IGFBP5	200	100	85,5°C	0,813
EGF	200	100	81,0°C	0,940
Caspase 3	400	100	75,8°C	0,810
p53	200	100	86,5°C	0,820
GAPDH	200	100	80,5 °C	0,910

IGF-I: fator de crescimento semelhante à insulina, IGFBPs: proteínas de ligação do IGF, EGF: fator de crescimento epidérmico, GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

A curva de dissociação gerada ao final dos ciclos de amplificação demonstrou que todos os oligonucleotídeos amplificaram um único fragmento, com ausência de amplificação inespecífica e dímeros de *primer*. Exemplos da curva de dissociação para os genes GAPDH e IGF-I são ilustrados nas Figuras 3 e 4.

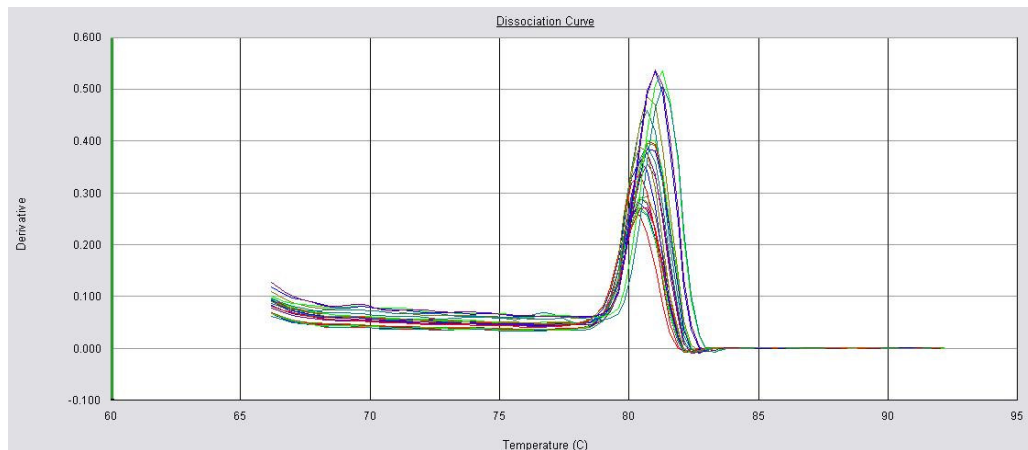


Figura 3 - Curva de dissociação para o gene *GAPDH* gerada a partir do equipamento *ABI Prism 7300 Sequence Detection System*.

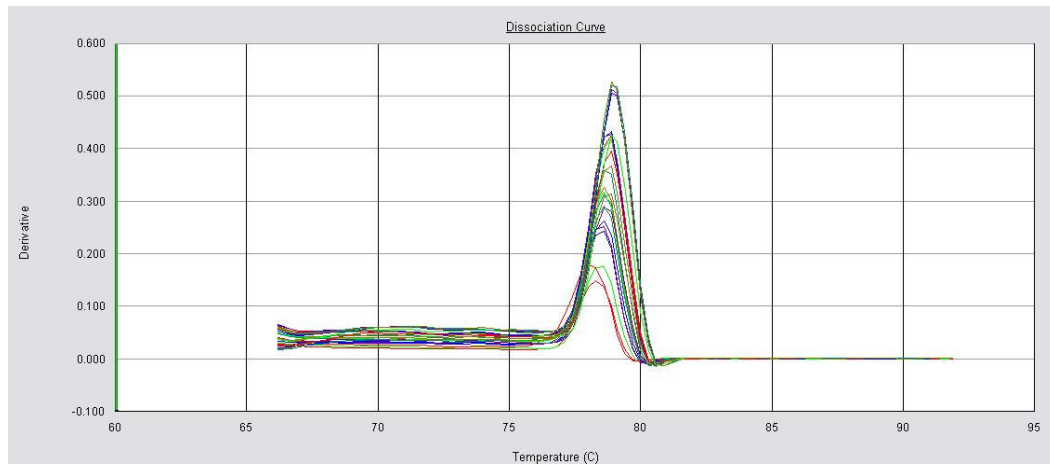


Figura 4 - Curva de dissociação para o gene *IGF-I* gerada a partir do equipamento *ABI Prism 7300 Sequence Detection System*.

O coeficiente de variação (CV) das duplicatas de C_t de cada amostra foi inferior a 5% para todos os genes analisados, indicando boa precisão e reprodutibilidade dos ensaios (dados não mostrados). Entretanto, observou-se maior variação no CV dos valores de C_t entre os animais de cada fase do ciclo estral, indicando variação individual existente entre os animais, como pode ser visto na Tabela 3.

Tabela 3 – Número de animais (N), média de C_t , desvio-padrão de C_t (DP) e coeficiente de variação (CV) para os genes analisados durante o ciclo estral.

Gene	Dias do ciclo estral	N	Média de C_t	DP	CV(%)
IGF-I	0	4	25,676	1,502	5,851
	6	4	27,210	1,367	5,024
	12	4	25,427	0,961	3,780
	18	4	25,867	0,886	3,424
IGFBP1	0	4	36,133	1,534	4,247
	6	4	31,476	1,904	5,221
	12	4	35,275	0,891	2,525
	18	4	34,799	0,689	1,981
IGFBP2	0	4	28,074	0,978	3,484
	6	4	28,368	0,827	2,915
	12	4	27,234	1,133	4,161
	18	4	26,135	1,000	3,825
IGFBP3	0	4	29,847	1,817	6,087
	6	4	27,374	2,151	7,860
	12	4	25,751	1,226	4,760
	18	4	27,725	1,580	5,690
IGFBP5	0	4	26,259	0,716	2,727
	6	4	27,612	0,741	2,684
	12	4	27,029	0,334	1,238
	18	4	26,325	0,572	2,174
EGF	0	4	34,011	1,273	3,742
	6	4	34,765	1,142	3,284
	12	4	33,634	2,226	6,618
	18	4	33,839	0,894	2,642
caspase 3	0	4	26,257	2,164	8,242
	6	4	27,287	1,992	7,301
	12	4	26,132	1,259	4,817
	18	4	26,279	1,241	4,724
p53	0	4	28,935	1,467	5,071
	6	4	29,300	1,773	6,053
	12	4	28,416	1,504	5,292
	18	4	28,203	1,868	3,078
GAPDH	0	4	22,323	1,505	6,741
	6	4	22,913	1,755	7,658
	12	4	22,250	1,109	4,985
	18	4	22,179	1,066	4,808

IGF-I: fator de crescimento semelhante à insulina, IGFBPs: proteínas de ligação do IGF, EGF: fator de crescimento epidérmico, GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

Os resultados da expressão gênica obtidos foram interpretados por meio da análise de regressão utilizando-se os valores individuais de expressão gênica em função dos dias 0, 6, 12 e 18 do ciclo estral. Para isso, foram verificadas a normalidade e a homogeneidade de variância dos dados de expressão para cada gene. Não foi verificado efeito dos dias do ciclo estral na expressão do gene IGF-I ($P>0,07$). Os valores médios de expressão por fase para esse gene podem ser visualizados na Tabela 4 e estão ilustrados na Figura 5.

Tabela 4 – Média da expressão relativa ($2^{-\Delta Ct} \times 1000$), desvio-padrão da média (DP) e coeficiente de variação (CV) nas fases do ciclo estral para o gene IGF-I

Gene	Dias do ciclo estral	Média ($2^{-\Delta Ct} \times 1000$)	DP	CV(%)
IGF-I	0	107,07	51,52	48,12
	6	59,26	39,09	65,96
	12	113,25	27,86	24,60
	18	85,36	47,88	56,09

$2^{-\Delta Ct} \times 1000$ – Unidades arbitrárias

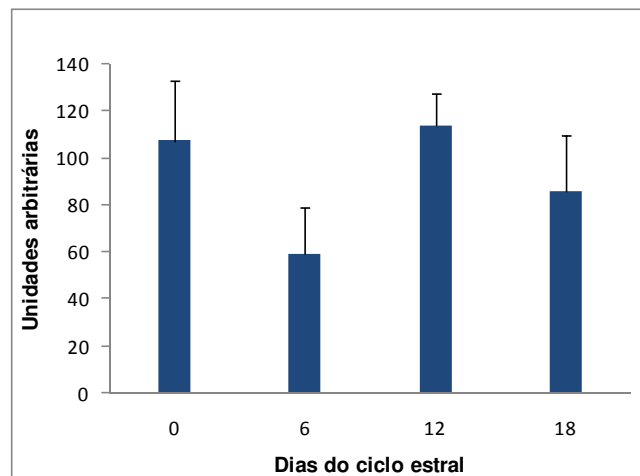


Figura 5 – Quantidade relativa de mRNA do IGF-I (Média±EPM) nas células foliculares e no tecido ovariano em função dos dias do ciclo estral.

Nesse estudo foi detectada abundância de transcritos do IGF-I nas células da granulosa e tecido ovariano de fêmeas suínas nos dias (0, 6, 12 e 18) referentes às fases estro, metaestro, diestro e proestro do ciclo estral, respectivamente. Os resultados obtidos corroboram os achados por Liu et al. (2000) que, por hibridização *in situ*, identificaram o transcrito do IGF-I nas

células da granulosa e nas células da teca externa durante a fase folicular na espécie suína, não havendo efeito do tipo celular ($P>0,1$) e do estágio de desenvolvimento folicular (2, 4, 6 ou 8mm) ($P>0,1$) na expressão desse gene.

Outros estudos demonstraram que a quantidade de mRNA de IGF-I na célula da granulosa na espécie suína aumenta aproximadamente 4,5 vezes ($P<0,01$) entre os dias 1 e 5 da fase folicular, estando positivamente correlacionada ao diâmetro folicular e à concentração de estradiol-17 β ; $r>0,7$ (Samaras et al., 1993).

Os resultados observados para a expressão relativa de mRNA para o IGF-I no presente trabalho podem estar relacionados com o caráter constitutivo dessa proteína ou devido aos transcritos não serem dependentes dos níveis de FSH (Zhou et al., 1997; Liu et al., 2000). Apesar de sua reconhecida importância biológica na foliculogênese, o IGF-I apresenta expressão constante durante o ciclo estral, com disponibilidade biológica regulada pelas IGFBPS no tecido folicular (Mazerbourg et al., 2003), não constituindo, a princípio, um bom indicador para o desenvolvimento folicular.

Os valores médios de expressão por fase para o gene IGFBP2 podem ser visualizados na Tabela 5 e estão ilustrados na Figura 6.

Tabela 5 – Média da expressão relativa ($2^{-\Delta Ct} \times 1000$), desvio-padrão da média (DP) e coeficiente de variação (CV) nas fases do ciclo estral para o gene IGFBP2

Gene	Dias do ciclo estral	Média ($2^{-\Delta Ct} \times 1000$)	DP	CV(%)
IGFBP2	0	21,55	10,18	47,24
	6	34,49	38,92	112,84
	12	37,62	17,40	46,25
	18	65,91	15,45	23,44

$2^{-\Delta Ct} \times 1000$ – Unidades arbitrárias

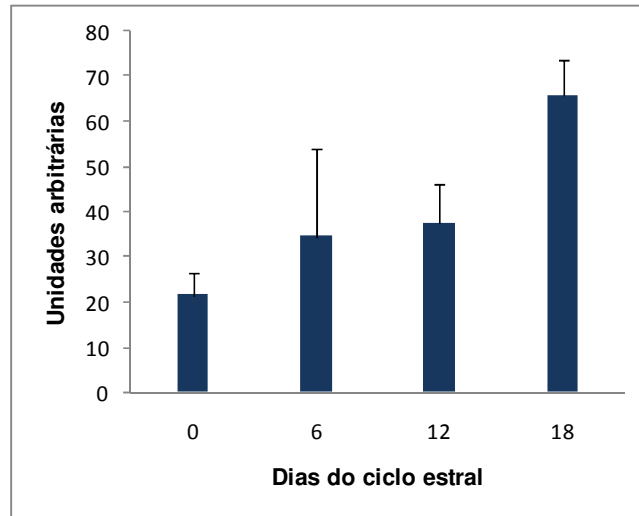


Figura 6 – Quantidade relativa de mRNA do IGFBP2 (Média±EPM) nas células foliculares e no tecido ovariano nos dias do ciclo estral.

O comportamento da curva da expressão gênica (y) em função dos dias do ciclo estral (x) foi descrito pelo modelo linear, equação $\hat{y} = 19,46 + 2,271x$; $R^2 = 0,348$ ($P < 0,02$), como pode ser visto na Figura 7.

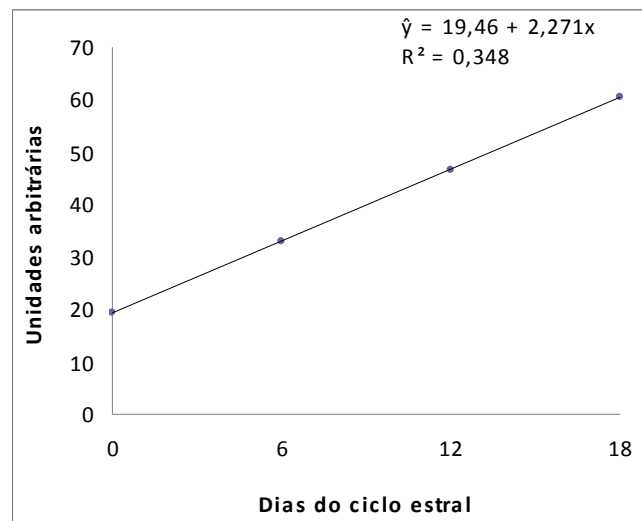


Figura 7 – Quantidade relativa de mRNA do IGFBP2 nas células foliculares e no tecido ovariano de suínos em função dos dias do ciclo estral.

O perfil de expressão em função dos dias do ciclo estral obtido no presente estudo foi linear ($P < 0,02$), com aumento da expressão ao longo

dos dias do ciclo estral. Outros estudos (Liu et al., 2000; Yuan et al., 1996) detectaram transcritos do IGFBP2 no tecido ovariano em porcas por meio da técnica de hidridização *in situ*.

Os dados de expressão da IGFBP2 no tecido ovariano em suínos obtidos no presente trabalho diferem daqueles obtidos anteriormente nessa espécie. Liu et al. (2000) verificaram, por meio de hibridização *in situ*, decréscimo na abundância de transcritos entre os dias 1 e 5 da fase folicular. Com a mesma abordagem técnica, Samaras et al. (1993) observaram que o mRNA do IGFBP2 decrescia durante o desenvolvimento folicular. Outros estudos também verificaram decréscimo da concentração da proteína no fluido folicular à medida que os folículos se tornavam maiores (Howard e Ford, 1992).

Os resultados obtidos no presente trabalho diferem do perfil de expressão esperado. Considerando a expressão do IGF-I constante durante o ciclo e sabendo-se que a IGFBP2 tem ação inibitória sobre o IGF-I, era esperado que, com o desenvolvimento folicular, a quantidade de mRNA para o IGFBP2 decrescesse, resultando no aumento da biodisponibilidade de IGF-I e conseqüente maturação dos folículos pré-ovulatórios. Entretanto, a aparente discordância com os dados da literatura pode ser devida à variação do diâmetro dos folículos coletados (2 a 10mm), ao alto coeficiente de variação observado entre os animais da mesma fase e ao emprego de diferentes técnicas de análise. Além disso, a existência de formas variadas de controle da expressão da IGFBP2 intrafolicular, ocasionada pela combinação da atividade de transcrição/tradução gênica no tecido folicular e mudanças na degradação proteolítica em folículos ovulatórios em crescimento (Mazerbourg et al., 2003; Guthrie, 2005), pode estar contribuindo para a divergência dos resultados obtidos.

Os valores médios de expressão por fase para o gene IGFBP3 podem ser visualizados na Tabela 6 e na Figura 8.

Tabela 6 – Média da expressão relativa ($2^{-\Delta Ct} \times 1000$), desvio-padrão da média (DP) e coeficiente de variação (CV) nas fases do ciclo estral para o gene IGFBP3

Gene	Dias do ciclo estral	Média ($2^{-\Delta Ct} \times 1000$)	DP	CV(%)
IGFBP3	0	0,56	0,15	26,79
	6	50,62	28,15	55,61
	12	92,98	32,30	34,74
	18	44,70	64,07	143,33

$2^{-\Delta Ct} \times 1000$ – Unidades arbitrárias

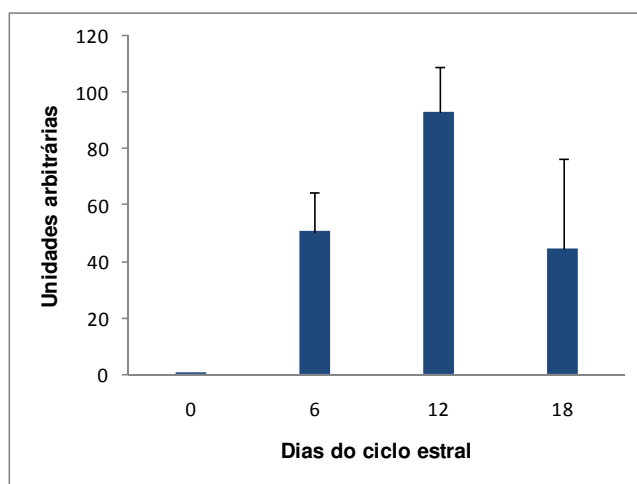


Figura 8 – Quantidade relativa de mRNA do IGFBP3 (Média±EPM) nas células foliculares e no tecido ovariano em função dos dias do ciclo estral.

O comportamento da variável dependente (y) em função da variação da variável independente (x) foi descrito pelo modelo quadrático, equação estimada $\hat{y} = -3,587 + 15,20x - 0,682x^2$; $R^2 = 0,92$ ($P < 0,01$). O comportamento da curva pode ser visto na Figura 9.

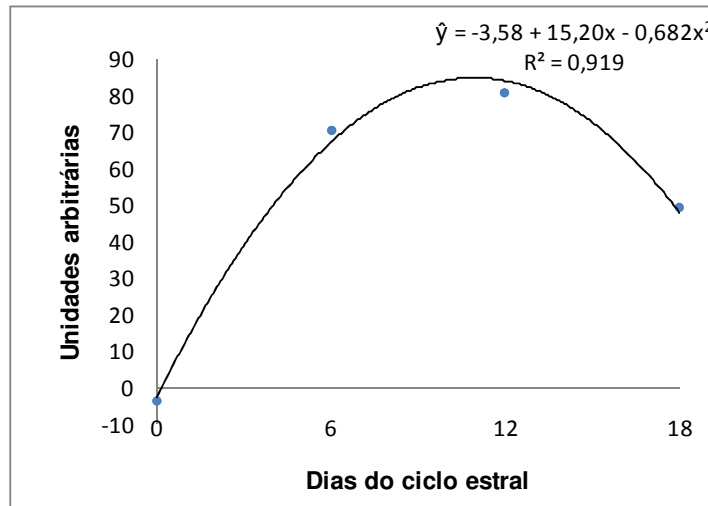


Figura 9 – Quantidade relativa de mRNA do IGBP3 nas células foliculares e no tecido ovariano de suínos em função dos dias do ciclo estral.

A expressão do IGFBP3 foi detectada nas células foliculares e no tecido ovariano suíno, nos dias 0, 6, 12 e 18 do ciclo estral, apresentando-se baixa no estro e aumentando ao longo do ciclo, apresentando expressão máxima no dia 11. Os dados presentes indicam que o perfil de expressão do IGFBP3 está de acordo com o verificado por Zhou et al. (1996), que, por meio de hibridização *in situ*, verificaram expressão alta e constante no corpo lúteo de porcas durante a fase lútea (dias 6 a 12), com ausência de transcritos em folículos em crescimento e em folículos pré-ovulatórios.

No presente estudo, é possível observar que a expressão do IGFBP3 tende a aumentar durante a fase lútea, atingindo valor máximo na fase de diestro (dia 11) e decrescendo com a regressão do corpo lúteo e com o desenvolvimento folicular. Pode-se observar que, entre as fases de diestro e proestro, a quantidade de mRNA desse gene foi reduzida à metade, sugerindo que as células endoteliais luteínicas no corpo lúteo maduro sejam as principais responsáveis por sua expressão (Wandji et al., 2000).

A diferença na expressão do IGFBP3 entre as fases estro e diestro observada nesse estudo sugere que a regulação da expressão do IGFBP3 pode ter papel autócrino ou parácrino no processo de seleção folicular, uma vez que esta diferença parece neutralizar a ação das gonadotrofinas e do IGF-I, provavelmente por meio de sua capacidade de seqüestrar IGFs. Dessa forma, o menor acúmulo de transcritos da IGFBP3 detectados no

estro seria responsável por maior biodisponibilidade de IGF-I, resultando na proliferação e na diferenciação celular característica dessa fase.

Não foi verificado efeito dos dias do ciclo estral na expressão do gene IGFBP5, e os modelos de regressão linear, quadrático e cúbico, não se ajustaram significativamente aos dados da expressão. Os valores médios da expressão por fase para esse gene podem ser visualizados na Tabela 7 e estão ilustrados na Figura 10.

Tabela 7 – Média da expressão relativa ($2^{-\Delta Ct} \times 1000$), desvio-padrão da média (DP) e coeficiente de variação (CV) nas fases do ciclo estral para o gene IGFBP5

Gene	Dias do ciclo estral	Média ($2^{-\Delta Ct} \times 1000$)	DP	CV(%)
IGFBP5	0	187,25	181,12	96,73
	6	82,53	59,65	72,28
	12	97,73	121,41	124,23
	18	132,47	104,86	79,16

$2^{-\Delta Ct} \times 1000$ – Unidades arbitrárias

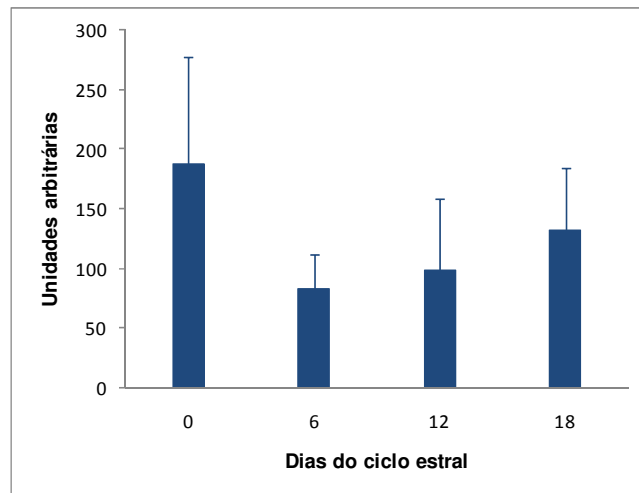


Figura 10 – Quantidade relativa de mRNA do IGFBP5 (Média±EPM) nas células foliculares e no tecido ovariano nos dias do ciclo estral.

A análise da expressão por meio do qPCR permitiu identificar abundância de transcritos relativamente alta para o gene IGFBP5 nas células foliculares e no tecido ovariano, não apresentando diferença significativa nos estádios do ciclo estral.

Os dados sobre a expressão do IGFBP5 no ovário de porcas obtidos nesse trabalho diferem daqueles descritos anteriormente nessa espécie.

Zhou et al. (1996), por meio da técnica de hibridização *in situ*, detectaram os transcritos do IGFBP5 nas células endoteliais do corpo lúteo com ausência de expressão nos folículos em crescimento e nos folículos pré-ovulatórios durante as fases folicular e lútea do ciclo estral. Essa discordância pode ser devida à diferença de precisão das técnicas anteriormente empregadas em comparação com a quantificação por qPCR que tem permitido detectar a expressão local de mRNA de transcritos de baixa abundância em vários tecidos (Ferré, 1992).

A ausência de variação da expressão do IGFBP5 durante as fases do ciclo estral verificada nesse trabalho sugere que esse fator pode não ser um bom indicador da seleção ou da função folicular em suínos, o que provavelmente pode ser atribuído a outros fatores ainda não investigados.

Os dados de expressão para o gene IGFBP1 não apresentaram distribuição normal, então foi realizada análise de variância não-paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis. Não foi observada diferença de expressão entre as fases ($P < 0,01$). Os valores médios de expressão por fase para esse gene podem ser visualizados na Tabela 8 e estão ilustrados na Figura 11.

Tabela 8 – Média da expressão relativa ($2^{-\Delta Ct} \times 1000$), desvio-padrão da média (DP) e coeficiente de variação (CV) nas fases do ciclo estral para o gene IGFBP1

Gene	Dias do ciclo estral	Média ($2^{-\Delta Ct} \times 1000$)	DP	CV(%)
IGFBP1	0	0,04	0,03	78,44
	6	0,13	0,24	179,60
	12	0,04	0,02	50,54
	18	0,08	0,08	97,69

$2^{-\Delta Ct} \times 1000$ – Unidades arbitrárias

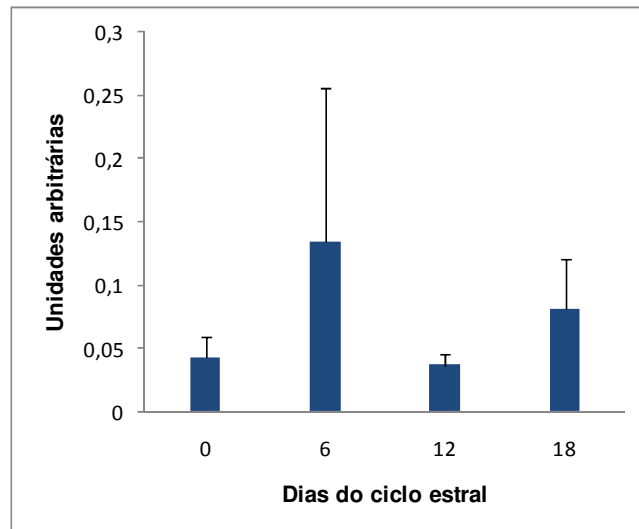


Figura 11 – Quantidade relativa de mRNA do IGFBP1 (Média±EPM) nas células foliculares e no tecido ovariano nos dias do ciclo estral.

A expressão do mRNA do gene IGFBP1 foi detectada nas células foliculares e no tecido ovariano em quantidade similar nas quatro fases do ciclo. Os dados sobre a expressão da IGFBP1 em ovários de porcas obtidos no presente trabalho diferem daqueles obtidos anteriormente no ovário de suínos (Grimes et al., 1994; Zhou et al., 1996), de ratos (Nakatani et al., 1991) e de bovinos (Llewellyn et al., 2007). Esses autores investigaram por hibridização *in situ* a expressão do IGFBP1 no ovário dessas espécies, mas não a detectaram.

Não foi verificado efeito dos dias do ciclo estral na expressão do EGF, e os modelos de regressão testados não se ajustaram significativamente aos dados de expressão mostrando comportamento contínuo. Os valores médios de expressão por fase para esse gene podem ser visualizados na Tabela 9 e estão ilustrados na Figura 12.

Tabela 9 – Média da expressão relativa ($2^{-\Delta Ct} \times 1000$), desvio-padrão da média (DP) e coeficiente de variação (CV) nas fases do ciclo estral para o gene EGF

Gene	Dias do ciclo estral	Média ($2^{-\Delta Ct} \times 1000$)	DP	CV (%)
EGF	0	0,55	0,25	45,40
	6	0,73	0,96	131,41
	12	0,62	0,38	60,63
	18	0,47	0,21	44,06

$2^{-\Delta Ct} \times 1000$ – Unidades arbitrárias

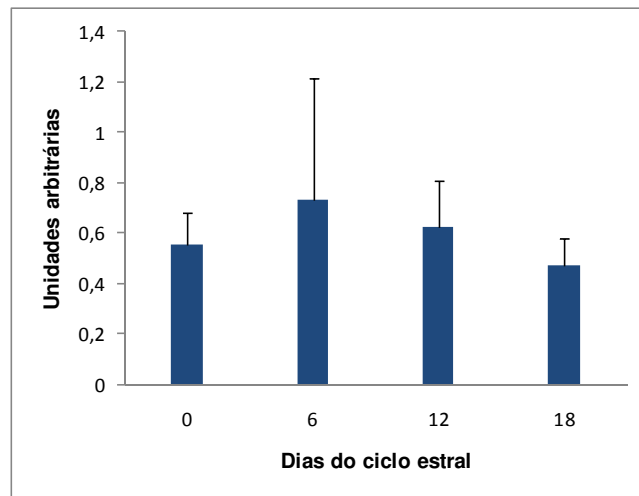


Figura 12 – Quantidade relativa de mRNA do EGF (Média±EPM) nas células foliculares e no tecido ovariano nas fases do ciclo estral.

A expressão do gene EGF foi detectada no tecido ovariano e nas células da granulosa não diferindo ao longo do ciclo estral. Os valores de expressão obtidos no presente estudo para o EGF, apesar de relativamente baixos, discordam daqueles obtidos por Vaughan et al. (1991), que verificaram ausência de transcritos no tecido ovariano de porcas por meio de hibridização *in situ* e pelo ensaio de proteção de ribonuclease. Essa discordância pode ser devida à diferença de sensibilidade da técnica utilizada, já que outros estudos, por meio de RT-PCR semi-quantitativo, detectaram o mRNA do EGF em oócitos e células do *cumulus* de suínos durante a maturação folicular (Yoshida et al., 1998; Vaughan et al., 1992; Singh et al., 1995).

O perfil de expressão gênica para o EGF verificado no presente

estudo sugere que o fator de crescimento epidérmico atua em todos os estádios de desenvolvimento folicular. Entretanto, dada a função desse peptídeo na modulação da proliferação e esteroidogênese das células da granulosa e da teca, era esperado que a expressão do EGF aumentasse entre os dias 12 e 18 do ciclo estral, pois essa fase é marcada por grande atividade mitogênica. Embora a expressão de transcritos de EGF seja constante, não implica que este não participe de maneira diferencial durante o desenvolvimento folicular. Dessa forma, estudos sobre a expressão da proteína nas fases do ciclo no tecido ovariano devem ser realizados, uma vez que a abundância de transcrito nem sempre é bem correlacionada com a abundância da proteína (Binneck, 2004).

Não foi verificado efeito dos dias do ciclo estral na expressão da caspase 3, e os modelos de regressão testados não se ajustaram significativamente aos dados de expressão, mostrando comportamento contínuo. Os valores médios de expressão por fase para esse gene podem ser visualizados na Tabela 10 e estão ilustrados na Figura 13.

Tabela 10 – Média da expressão relativa ($2^{-\Delta Ct} \times 1000$), desvio-padrão da média (DP) e coeficiente de variação (CV) nas fases do ciclo estral para o gene caspase 3

Gene	Dias do ciclo estral	Média ($2^{-\Delta Ct} \times 1000$)	DP	CV (%)
Caspase 3	0	84,34	64,61	76,61
	6	51,03	18,58	36,41
	12	68,79	13,37	19,44
	18	59,92	15,86	26,47

$2^{-\Delta Ct} \times 1000$ – Unidades arbitrárias

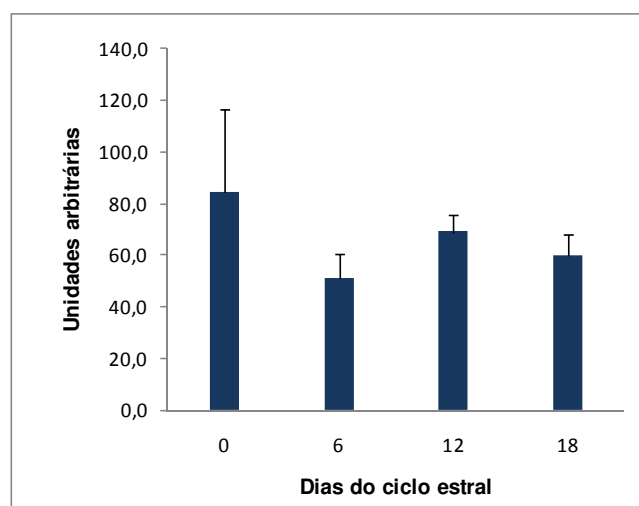


Figura 13 – Quantidade relativa de mRNA da caspase 3 (Média±EPM) nas células foliculares e no tecido ovariano nos dias do ciclo estral.

A expressão da caspase 3 foi detectada no tecido ovariano e nas células da granulosa, não diferindo durante o ciclo estral. Estudos têm verificado, por técnicas imunocitoquímicas, maior expressão da proteína caspase 3 nas células da granulosa em suínos, durante a atresia folicular (Berardinelli et al., 2004). Como a apoptose está envolvida no recrutamento folicular e no remodelamento do tecido ovariano durante a regressão do corpo lúteo, esperava-se que a expressão da caspase 3, mediadora central da apoptose celular, tivesse aumentado nas fases luteínica e folicular, o que não foi verificado nesse estudo. Os resultados presentes sugerem que o acúmulo de transcrito não é um bom indicador da atresia folicular em suínos, indicando que a regulação primária da caspase 3, provavelmente, ocorre a nível pós-traducional.

Não foi verificado efeito dos dias do ciclo estral na expressão do p53, e os modelos de regressão testados não se ajustaram significativamente aos dados de expressão, mostrando comportamento contínuo. Os valores médios de expressão por fase para esse gene podem ser visualizados na Tabela 11 e estão ilustrados na Figura 14.

Tabela 11 – Média da expressão relativa ($2^{-\Delta Ct} \times 1000$), desvio-padrão da média (DP) e coeficiente de variação (CV) nas fases do ciclo estral para o gene p53

Gene	Dias do ciclo estral	Média ($2^{-\Delta Ct} \times 1000$)	DP	CV (%)
p53	0	18,30	7,56	41,30
	6	23,99	19,81	82,60
	12	19,52	5,31	27,24
	18	23,61	11,29	47,85

$2^{-\Delta Ct} \times 1000$ – Unidades arbitrárias

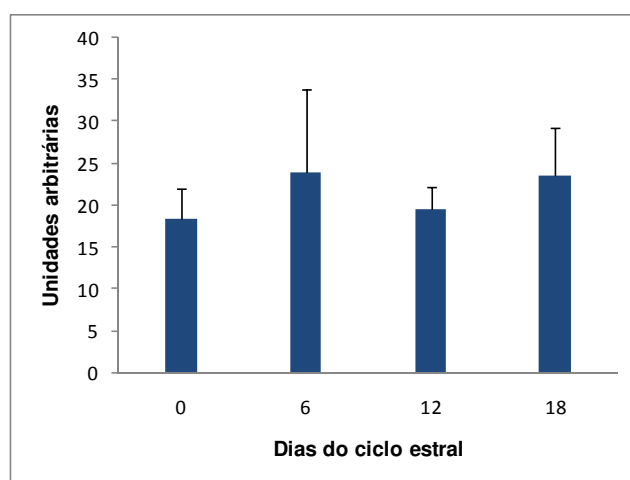


Figura 14 – Quantidade relativa de mRNA do p53 (Média±EPM) nas células foliculares e no tecido ovariano nos dias do ciclo estral.

Os dados de expressão obtidos no presente estudo demonstram que o gene p53 é expresso em quantidades similares no ovário suíno durante o ciclo estral. Os resultados obtidos diferem daqueles verificados em estudos em camundongos. Choi et al. (2004) verificaram que a expressão do mRNA da p53 tende a aumentar durante o desenvolvimento folicular em camundongos tratados hormonalmente. Embora estudos conduzidos por Tilly et al. (1995) tenham demonstrado que a indução da apoptose da célula da granulosa envolvam mecanismos mediados pela p53, a regulação de sua expressão ainda não foi completamente elucidada em mamíferos, constituindo uma via de sinalização muito complexa. O padrão de expressão do p53 verificado nesse estudo sugere que a regulação da atividade da p53 pode ocorrer em nível pós-traducional, sob influência do microambiente

celular, extensão dos danos do DNA e interações com outras proteínas da via de sinalização celular (Vermeulen et al., 2003).

A utilização da transcrição reversa associada à reação de cadeia de polimerase em tempo real tem possibilitado a detecção de transcritos de baixa abundância em diversos tecidos (Pfaffl et al., 2002), como demonstrado no presente trabalho, no qual detectou-se pela primeira vez a expressão do IGFBP1 nas células foliculares e tecido ovariano em suínos. Os resultados obtidos nesse experimento demonstram a importância dessa técnica no entendimento da fisiologia ovariana e na dinâmica do desenvolvimento folicular. Outros estudos, para determinar o padrão da expressão temporal e espacial deste e dos outros genes analisados, devem ser feitos para melhor entendimento de suas funções na dinâmica ovariana.

5. CONCLUSÕES

A expressão dos genes *IGF-I*, *IGFBP (1, 2, 3 e 5)*, *EGF*, *caspase 3* e *p53* foi verificada em células foliculares e tecido ovariano de fêmeas suínas durante o ciclo estral.

Foi possível descrever o perfil da expressão linear para o gene *IGFBP2*, aumentando ao longo do ciclo estral, e quadrático para o *IGFBP3*, tendo os demais genes estudados apresentado comportamento contínuo em função dos dias do ciclo estral.

Não é possível afirmar se os genes estudados estão expressando a proteína correspondente, tornando-se necessária a realização de estudos proteômicos para investigar a possível correlação entre os níveis de mRNA e de proteína.

Estudos devem ser ampliados para outros genes relacionados e genes de outras vias metabólicas para melhor entendimento dos estádios fisiológicos envolvidos na foliculogênese em suínos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Associação Brasileira de Indústrias Processadoras e Exportadoras de Carne Suína (ABIEPCS). Relatório Anual 2007. Disponível em <http://www.abiepcs.org.br>. Acesso em 29/04/08.

ADASHI, E.Y., RESNICK, C.E., ROSENFELD, R.G. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II hormonal action in cultured rat granulosa cells: mediation via type I but not type II IGF receptors. *Endocrinology*. v. 126, p. 216–222, 1990.

ADASHI, E.Y. The IGF family and folliculogenesis. *J Reprod Immunol*. v. 39, p. 13-19, 1998.

AGARWAL, M.L., TAYLOR W.R., CHERNOV, M.V., CHERNOVA, O.B., STARK, G.R. The p53 network. *J Biol Chem*. v. 273, p. 1-4, 1998.

ANDERSON, L. L., HAFEZ, E. S. E (2004). Suínos. In: HAFEZ, E. S. E. *Reprodução Animal*. São Paulo: Manole, 7 ed. P. 183-192.

ARMSTRONG, D. G., BAXTER, G., GUTIERREZ, C. G., HOGG, C. O., GLAZYRIN, A. L., CAMPBELL, B. K., BRAMLEY, T. A., WEBB, R. Insulin-like growth factor binding protein-2 and -4 messenger ribonucleic acid expression in bovine ovarian follicles: effect of gonadotropins and developmental status. *Endocrinology*. v. 139, p. 2146–2154, 1998.

BEN-AMI, I., FREIMANN, S., ARMON, L., DANTES, A., RON-EL, R., AMSTERDAM, A. Novel function of ovarian growth factors: combined studies by DNA microarray, biochemical and physiological approaches. *Molecular Human Reproduction*. v. 12, p. 413–419, 2006.

BERARDINELLI, P., RUSSO, V., MARTELLI, A., NARDINOCCHI, D., DI GIACINTO, O., BARBONI, B., MATTIOLI, M. Colocalization of DNA Fragmentation and Caspase 3 Activation During Atresia in Pig Antral Follicles. *Anat. Histol. Embryol*. v. 33, p. 23–27, 2004.

BESNARD, N., PISSELET, C., MONNIAUX, D., LOCATELLI, A., BENNE, F., GASSER, F., HATEY, F e MONGET, P. Expression of messenger ribonucleic acids of insulin-like growth factor binding protein-2, -4, and -5 in the ovine ovary: localization and changes during growth and atresia of antral follicles. *Biology of Reproduction*. v. 55, p. 1356–1367, 1996.

BESNARD, N., C. Pisselet., MONNIAUX, D., MONGET, P. Proteolytic activity degrading insulin-like growth factor-binding protein-2, -3, -4, and -5 in healthy

growing and atretic follicles in the pig ovary. *Biol Reprod.* v. 56, p. 1050-1058, 1997.

BINNECK E. As ômicas: integrando a bioinformação. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento.* v. 32, p. 28-37, 2004.

BOATRIGHT, K.M e SALVESEN, G.S. Mechanisms of caspase activation. *Current Opinion in Cell Biology.* v. 15, p. 725–731, 2003.

BOONE, D.L e TSANG, B.K. Caspase 3 in the rat ovary: localization and possible role in follicular atresia and luteal regression. *Biol Reprod.* v. 58, p. 1533-1539, 1998.

BOONSTRA, J., RIJKEN, P., HUMBEL, B., CREMERS, F., VERKLEIJ, A., HENEGOUWEN, P. B. The epidermal growth factor. *Cell Biology International.* v. 19, p. 413-430, 1995.

BUDIHardjo, I., OLIVER, H., LUTTER, M., LUO, X., WANG, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Bio.* v. 15, p. 269–290, 1999.

BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology.* v. 25, p. 169-193, 2000.

BUSTIN, S.A. e NOLAN, T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Journal of Biomolecular Techniques.* v.15, p.155-166, 2004.

BUSTIN, S.A., BENES, V., NOLAN, T., PFAFFL, M.W. Quantitative real-time RT-PCR – A perspective. *Journal of Molecular Endocrinology.* v. 34, p. 597-601, 2005.

CAMPBELL, B.K., SCARAMUZZI, R.J., WEBB, R. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *J. Reprod. Fertil. Supp.* v. 49, p. 335–350, 1995.

CARAMBULA, S.F., MATIKAINEN, T., LYNCH, M.P., FLAVELL, R.A., GONÇALVES, P.B., TILLY, J.L., RUEDA, B.R. Caspase 3 is a pivotal mediator of apoptosis during regression of ovarian corpus luteum. *Endocrinology.* v. 143, p. 1495–501, 2002.

CARPENTER, G e COHEN, S. Epidermal Growth Factor. *The Journal of Biological Chemistry.* v. 265, p. 7709-7712, 1990.

CHENG, Y., INOUE, N., MATSUDA-MINEHATA, F., GOTO, Y., MAEDA, A., MANABE, N. Changes in expression and localization of connexin 43 mRNA and protein in porcine ovary granulosa cells during follicular atresia. *J. Reprod. Dev.* v. 51, p. 627-637, 2005.

CHOI, D., HWANG, S., LEE, E., YOON, S., YOON, B., BAE, D. Expression of mitochondria-dependent apoptosis genes (p53, Bax, and Bcl-2) in rat granulosa cells during follicular development. *Journal of The Society for Gynecologic Investigation.* v. 11, p. 311-317, 2004.

COHEN, G.M. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* v. 326, p. 1, 1997.

COFFEY, R.D. Manipulation of the estrous cycle in swine. *Journal Animal Science*, 1997. Periódico on line disponível em URL: www.uky.edu/Agriculture/AnimalSciences/extension/pubpdfs/asc152.pdf.997. Acesso em 20/05/08.

CONTI, M., HSIEH, M., PARK, J.Y., SU, Y.Q. Role of the Epidermal Growth Factor Network in Ovarian Follicles. *Molecular Endocrinology.* v. 20, p. 715–723, 2006.

COSKUN, S., LIN Y.C. Mechanism of action of epidermal growth factor induced porcine oocyte maturation. *Mol Reprod Dev.* v. 42, p. 311–317, 1995.

COX, N.M. Control of follicular development and ovulation rate in pigs. *J Reprod Fertil Suppl.* v. 52, p. 31-46, 1997.

DEKEL, N e SHERIZLY, I. Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle-enclosed oocytes. *Endocrinology.* v. 116, p. 406–409, 1985.

DEKKERS, J. C. Commercial application of marker- and gene assisted selection in livestock: Strategies and lessons. *J. Anim. Sci.* v. 82, p. 313-328, 2004.

DENAULT, J.B e SALVESEN, G.S. Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem Rev.* v.102, p. 4489-4500, 2002.

DOWNS, S.M. Specificity of epidermal growth factor action on maturation of the murine oocyte and cumulus oophorus in vitro. *Biol Reprod.* v. 41, p. 371–379, 1989.

DREUX, A.C., LAMB, D.J., Modjtahedi, H., Ferns, G. The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: their putative role in atherogenesis. *Atherosclerosis*. v. 186, p. 38-53, 2006.

DRIANCOURT, M.A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*. v. 55, p. 1211-1239, 2001.

DROP, S.L., VALIQUETTE, G., GUYDA, H.J., CORVOL, M.T., POSNER, B.I. Partial purification and characterization of a binding protein for insulin-like activity in human amniotic fluid: a possible inhibitor of insulin-like activity. *Acta Endocrinol.* v. 90, p. 505–518, 1979.

DUKES, H. H. *Fisiologia dos animais domésticos*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1993.

ESTILL, C.T. Current concepts in estrus synchronization in swine. *Proceedings of the American Society of Animal Science*, 1999.

EVANS, A. Characteristics of Ovarian Follicle Development in Domestic Animals. *Reprod Dom Anim*. v. 38, p. 240–246, 2003.

FAN, X., NAGLE, G.T., COLLINS, T.J., CHILDS, G.V. Differential Regulation of Epidermal Growth Factor and Transforming Growth factor- α Messenger Ribonucleic Acid in the Rat Anterior Pituitary and Hypothalamus Induced by Stresses. *Endocrinology*. v. 136, p. 873-880, 1995.

FERRÉ, F. Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth. *PCR Methods Applications*. v. 2, p. 1–9, 1992.

FOXCROFT, G. R, VAN DE WIEL, D. F. M. Endocrine control of oestrous cycle (1982). In: Cole, D. J., Foxcroft, G. R. *Control of pig reproduction I*. London. Butterworth Scientific, p. 161-177.

FRANDSON, R. D (1979). *Anatomia e fisiologia de animais domésticos*. 2 ed, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, p. 186.

FUJINAGA, H., YAMOTO, M., NAKANO, R.Y., SHIMA, K. Epidermal growth factor binding sites in porcine granulosa cells and their regulation by Follicle-stimulating hormone. *Biology of reproduction*. v. 46, p. 705-709, 1992.

GANDOLFI, F., BREVINI, T.A.L., CILLO, F., ANTONINI, S. Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for farm

animal reproductive efficiency. *Rev Sci Tech Off int Epiz.* v. 24, p. 413-423, 2005.

GINZINGER, D.G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology.* v. 30, p. 503–512, 2002.

GIUDICE, L.C. Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. *Endocr Rev.* v. 13, p. 641–669, 1992.

GIULIETTI, A., OVERBERGH, L., VALCKX, D., DECALLONNE, B., BOUILLON, R., MATHIE, C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Method,* v. 25, p. 386–401, 2001.

GOSDEN, R.G. (1995). Ovulation 1: Oocyte development throughout life Oocyte development throughout life. In: *Grudzinskas JG e J.L Yovich. Gametes - The Oocyte.* Cambridge, Cambridge Reviews In: *Human Reproduction,* p. 119-149.

GOSDEN, R.G., BOWNES M. (1995). Cellular and molecular aspects of oocyte development. In: *J.G. Grudzinskas e J.L. Yovich. Gametes - The oocyte.* Cambridge reviews In: *Human Reproduction,* Cambridge, p. 23-53.

GOODSELL, D.F. The molecular perspective: Epidermal growth factor. *The Oncologist.* v. 8, p. 496-497, 2003.

GOSPODAROWICZ, D., BIALECKI, H. Fibroblast and epidermal growth factors are mitogenic agents for cultured granulosa cells of rodent, porcine, and human origin. *Endocrinology.* v. 104, p. 757–764, 1979.

GOTO, Y., MATSUDA-MINEHATA, F., INOUE, N., MATSUI, T., MAEDA, A., MANABE, N. Porcine (*Sus scrofa*) cellular FLICE-like inhibitory protein (cFLIP): molecular cloning and comparison with the human and murine cFLIP. *J Reprod Dev.* v. 50, p. 549-555, 2004.

GREEN, D.P.L. Three-dimensional structure of the zona pellucida. *Reviews of Reproduction.* v. 2, p. 147–156, 1997.

GRIMES, R. W., BARBER, J.A., SHIMASAKI, S., LING, N., HAMMOND, J. Porcine ovarian granulosa cells secrete insulin-like growth factor- binding proteins-4 and -5 and express their messenger ribonucleic acids: regulation by follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-1. *Biol Reprod.* v. 50, p. 695-701, 1994.

GRUTTER, M.G. Caspases: key players in programmed cell death. *Current Opinion in Structural Biology*. v. 10, p. 649-655, 2000.

GUTHRIE, H.D. The follicular phase in pigs: follicle populations, circulating hormones, follicle factors and oocytes. *J Anim Sci*. v. 83, p. 79-89, 2005.

GUTHRIE, H.D., GRIMES, R.W., COOPER, B.S., HAMMOND, J.M. Follicular atresia in pigs: Measurement and physiology. *J Anim Sci*. v. 73, p. 2834-2844, 1995.

HAAPAJARVI, T., PITKANEN, K., LAIHO, M. Human melanoma cell line UV responses show independency of p53 function. *Cell Growth Differ*. v. 10, p. 163-171, 1999.

HAFEZ, B., HAFEZ, E. S. E (2004). Anatomia da reprodução feminina. In: *In: HAFEZ, E. S. E. Reprodução Animal*. São Paulo: Manole, 7 ed, p. 261- 278.

HAFEZ, E. S. E., JAINUDEEN, M.R., ROSNINA, Y. (2004). Distúrbios reprodutivos nas fêmeas. In: *In: HAFEZ, E. S. E. Reprodução Animal*. São Paulo: Manole, 7 ed, p. 261- 278.

HAKEM, R., HAKEM, A., DUNCAN, G.S., HENDERSON, J.T., WOO, M., SOENGAS, M.S., ELIA, A., DE LA POMPA, J.L., KAGI, D., KHOO, W., POTTER, J., YOSHIDA, R., KAUFMAN, S.A., LOWE, S.W., PENNINGER, J.M., MAK, T.W. Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell*. v. 94, p. 338–352, 1998.

HAKUNO, N., KOJI, T., YANO, T., KOBAYASHI, N., TSUTSUMI, O., TAKETANI, Y., AKANE, P.K. Fas/APO-1/CD95 system as a mediator of granulosa cell apoptosis in ovarian follicle atresia. *Endocrinology*. v. 137, p.1938-48, 1996.

HARRIS, R.C., CHUNG, E., COFFEY, R.J. EGF receptor ligands. *Exp Cell Res*. v. 284, p. 2-13, 2003.

HASTIE, P.M., HARESIGN, W. Expression of mRNAs encoding insulin-like growth factor (IGF) ligands, IGF receptors and IGF binding proteins during follicular growth and atresia in the ovine ovary throughout the oestrous cycle. *Anim Reprod Sci*. v. 92, p. 284-299, 2006.

HAMMOND, J.M., YOSHIDA, K., VELDHUIS, J.D., RECHLER, M.M., KNIGHT, A.B. (1983). Intrafollicular role of somatomedins: Comparison with effects of insulin. In: *Greenwald G.S, Terranova, P. eds. Factors regulating ovarian Function*. Raven press, New York, p. 197-201.

HAMMOND, J.M., SAMARAS, S.E., GRIMES, R., LEIGHTON, J., BARBER, J., CANNING, S.F., GUTHRIE, H.D. The role of insulin-like growth factors and epidermal growth factor-related peptides in intraovarian regulation in the pig ovary. *J Reprod Fertil.* v. 48, p. 117-125, 1993.

HEID, C.A., STEVENS, J., LIVAK, K.J., WILLIAMS, P.M. Real Time Quantitative PCR. *Genome Methods.* v. 6, p. 986-994, 1996.

HENDRIKS-BALK, M.C., MICHEL, M.C., ALEWIJNSE, A.E. Pitfalls in the normalization of real-time polymerase chain reaction data. *Basic Res Cardiol.* v. 102, p.195-197, 2007.

HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G., WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology.* v. 11, p. 1026-1030, 1993.

HIRSHFIELD, A.N. Rescue of atretic follicles in vitro and in vivo. *Biol Reprod.* v. 40, p. 181-190, 1989.

HOWARD, H.J e Ford, J.J. Relationships among concentrations of steroids, inhibin, insulin-like growth factor-1 (IGF-1), and IGF-binding proteins during follicular development in weaned sows. *Biol Reprod.* v. 47, p. 193-201, 1992.

HUSSEIN, M.R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Human Reproduction and Embriology,* v. 11, p. 162-178, 2005.

JIANG, Z e ROTHSCHILD, M.F. Swine Genome Science Comes of Age. *Int J Biol Sci.* v. 3, p. 129-131, 2007.

JONES, J.I e CLEMMONS, D.R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev.* v. 16, p. 3–34, 1995.

KEEL, B.A e DAVIS, J.S. Epidermal growth factor activates extracellular signal-regulated protein kinases (ERK) in freshly isolated porcine granulosa cells. *Steroids.* v. 64, p. 654-658, 1999.

KIM, J-M., YOON, Y-D., TSANG, B.K. Involvement of the Fas/Fas Ligand System in p53-Mediated Granulosa Cell Apoptosis during Follicular Development and Atresia. *Endocrinology.* v. 140, p. 2307–2317, 1999.

KNOX, R.V. Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in the pig. *Domestic Animal Endocrinology.* V. 29, p. 385–397, 2005.

KOSTECKA, Z., BLAHOVEC, J. Animal insulin-like growth factor binding proteins and their biological functions. *Vet Med.* v. 47, p. 75–84, 2002.

KUIDA, K., ZHENG, T. S., NA, S., KUAN, C.-Y., YANG, D., KARASUYAMA, H., RAKIC, P., FLAVELL, R. A. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Letters to Nature.* v. 384, p. 368-372, 1996.

KUIDA, K., HAYDAR, T.F., KUAN, C.Y, GU, Y., KARASUYAMA, H., SU, M.S., RAKIC, P., FLAVELL, R.A. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell.* v. 94, p. 325-337, 1998.

LEMOINE, N.R. The c-ras oncogenes and GAP. *In: Carney D, Sikora K, eds. Genes and Cancer.* Chichester: John Willey & Sons, 1990, p. 19-29.

LeROITH, D., WERNER, H., BEITNER-JOHNSON, D., ROBERTS JR, C.T. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev.* v. 16, p. 143–163, 1995.

LEVINE, A.J. p53, the Cellular Gatekeeper Review for Growth and Division. *Cell.* v. 88, p. 323–331, 1997.

LI, P., NIJHAWAN, D., BUDIHardJO, I., SRINIVASULA, S.M., AHMAD, M., ALNEMRI, E.S., WANG, X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* v. 14, p. 479-489, 1997.

LIU J, KOENIGSFELD, A.T., CANTLEY, T.C., BOYD, C.K., KOBAYASHI, Y., LUCY, M.C. Growth and the initiation of steroidogenesis in porcine follicles are associated with unique patterns of gene expression for individual components of the ovarian insulin-like growth factor system. *Biol Reprod.* V. 63, p. 942-952, 2000.

LLEWELLYN, S., FITZPATRICK, R., KENNY, D.A., MURPHY, J.J., SCARAMUZZI, R.J., WATHES, D.C. Effect of negative energy balance on the insulin-like growth factor system in pre-recruitment ovarian follicles of post partum dairy cows. *J Reprod Fertil.* v. 133, p. 627-639, 2007.

LIVAK, K.J., SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* v. 25, p. 402-408, 2001.

LONERGAN, P., CAROLAN, C., VAN LANGENDONCKT, A., DONNAY, I., KHATIR, H., MERMILLOD, P. Role of epidermal growth factor in bovine

oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. *Biol Reprod.* v. 54, p. 1420–1429, 1996.

LORENZO, P.L., REBOLLAR, P.G., ILLERA, M.J., ILLERA, J.C., ILLERA, M., ALVARINO, J.M. Stimulatory effect of insulin-like growth factor I and epidermal growth factor on the maturation of rabbit oocytes in vitro. *J Reprod Fertil.* v. 107, p. 109–117, 1996.

MAEDA, A., INOUE, N., MATSUDA-MINEHATA, F., GOTO, Y., CHENG, Y., MANABE, N. The role of interleukin-6 in the regulation of granulosa cell apoptosis during follicular atresia in pig ovaries. *J. Reprod. Dev.* v. 53, p. 481-490, 2007.

MANABE, N., GOTO, Y., MATSUDA-MINEHATA, F., INOUE, N., MAEDA, A., SAKAMAKI, K., MIYANO, T. Regulation mechanism of selective atresia in porcine follicles: regulation of granulosa cell apoptosis during atresia. *J Reprod Dev.* v. 50, p. 493-514, 2004.

MANABE, N., IMAI, Y., OHNO, H., TAKAHAGI, Y., SUGIMOTO, M., MIYAMOTO, H. Apoptosis occurs in granulosa cells but not cumulus cells in the atretic antral follicles in the pig ovaries. *Experientia.* v. 52, p. 647-651, 1996.

MAO, J., SMITH, M.F., RUCKER, E.B., WU, G.M., MCCAULEY, T.C., CANTLEY, T.C., PRATHER, R.S., DIDION, B.A., DAY, B.N. Effect of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on porcine preantral follicular growth, antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression of apoptosis in vitro. *J Anim Sci.* v. 82, p. 1967–1975, 2004.

MATSUI, M., MANABE, N., GOTO, Y., INOUE, N., NISHIHARA, S., MIYAMOTO. Expression and activity of Apaf1 and caspase-9 in granulosa cells during follicular atresia in pig ovaries. *Reproduction.* v. 126, p. 113-120, 2003.

MATSUDA-MINEHATA, F., INOUE N., GOTO, Y., MANABE, N. The regulation of ovarian granulosa cell death by pro- and anti-apoptotic molecules. *J Reprod Dev.* v. 52, 695-905, 2006.

MAY, J.V., SCHOMBERG, D.W. The potential relevance of epidermal growth factor and transforming growth factor- α to ovarian physiology. *Sem Reprod Endocrinol.* v. 71, p. 11, 1989.

MAZERBOURG, S., BONDY, C.A., ZHOU, J., MONGET, P. The Insulin-like Growth Factor System: a Key Determinant Role in the Growth and Selection

of Ovarian Follicles? A Comparative Species Study. *Reprod Dom Anim.* v. 38, p. 247–258, 2003.

MONDSCHHEIN, J.S., SCHOMBERG, D.W. Growth factors modulate gonadotropin receptor induction in granulosa cell cultures. *Science.* v. 211, p. 1179–1180, 1981.

MONGET, P., FABRE, S., MULSANT, P., LECERF, F., ELSEN, J.M., MAZERBOURG, S., PISSELET, C., MONNIAUX, D. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domestic Animal Endocrinology.* v. 23, p. 139–154, 2002.

MONGET, P e BONDY, C. Importance of the IGF system in early folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* v. 162, p. 89-93, 2000.

NAKAE, J., KIDO, Y., ACCILI, D. Distinct and Overlapping Functions of Insulin and IGF-I Receptors. *Endocr Rev.* v. 22, p. 818-835, 2001.

NAGATA, S. Apoptosis by death factor. *Cell.* v. 88, p. 355-365, 1997.

NAKAE, J., KIDO, Y., ACCILI, D. Distinct and Overlapping Functions of Insulin and IGF-I Receptors. *Endocrine Reviews.* v. 22, p. 818–835, 2001.

NAKATANI, A., SHIMASAKI, S., ERICKSON, G.F, Ling, N. Tissue-specific expression of four insulin-like growth factor-binding proteins (1,2,3, and 4) in the rat ovary. *Endocrinology.* v. 129, p.1521-1529, 1991.

NICHOLSON, D.W e THORNBERRY, N.A. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci.* v. 22, p. 299-306, 1997.

NYGARD, A-B., JORGENSEN, C.B., CIRERA, S., FREDHOLM, M. Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. *BMC Molecular Biology.* v. 8, p. 67, 2007.

NUSSEY, S.S e WHITEHEAD, S.A. (2001). *Endocrinology an integrated approach.* Taylor e Francis Group, 385 p.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research.* v. 29, p. 45, 2001.

PFAFFL, M. W., GEORGIEVA, T.M., GEORGIEV, I.P., ONTSOUKA, E., HAGELEIT, M., BLUM, J.W. Real-time RT-PCR quantification of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF-1 receptor, IGF-2, IGF-2 receptor, insulin receptor,

growth hormone receptor, IGF-binding proteins 1, 2 and 3 in the bovine species. *Domestic Animal Endocrinology*. v 22, p. 91. 2002.

PICTON, H.M. Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology*. v. 55, p. 1193-210, 2001.

PICTON, H., BRIGGS, D., GOSDEN, R. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*. v. 145, p. 27–37, 1998.

PINEDA, M.H. Female reproductive system (1989). In: *MCDONALD, L.E. Veterinary Endocrinology and Reproduction*. Lea e Febiger, Philadelphia, p. 303-354.

POMP, D., CAETANO, A.R., BERTANI, G.R., GLADNEY, C.D., JOHNSON, R.K. Applying functional genomics research to the study of pig reproduction. *Reproduction*. v. 58, p. 277-292. 2001

PINEDA, W.H., DOOLEY, M.P. (2003). *Female Reproductive System*. In: *PINEDA, M.H. McDonald's Veterinary Endocrinology and Reproduction*. 283-340, 5 ed.

RADONIC, A., THULKE, S., MACKAY, I.M., LANDT, O., SIEGERT, W., NITSCHKE, A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 313, p. 856-862, 2004.

RAJARAM, S., BAYLINK, D.J., MOHAN, S. Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr Rev*. v. 18, p. 801–831, 1997.

REECE, W.O. (2005). Functional anatomy and physiology of domestic animals. In: *LINPPICOTT, W e WILKINS. Female Reproduction*, 513 p. 3 ed.

RICHARDS, J.S. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrine Reviews*. v. 15, p. 725-751, 1994.

ROTHSCHILD, M.F. Advances in pig genomics and functional gene discovery. *Comp Funct Genom*, v. 4, p. 266–270, 2003.

SAMARAS, S.E., GUTHRIE, H.D., BARBER, J.A., HAMMOND, J.M. Expression of the mRNAs for the insulin-like growth factors and their binding proteins during development of porcine ovarian follicles. *Endocrinology*. v. 133, p. 2395–2398, 1993.

SAMARAS, S.E., HAGEN, D.R., SHIMASAKI, S., LING, N., HAMMOND, J.M. Expression of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-2 and 3 mRNA in the porcine ovary: localization and physiological changes. *Endocrinology*. v. 130, p. 2739-2744, 1992.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. *Molecular cloning: a Laboratory manual*. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 564p, 1989.

SAKUMOTO, R., KOMATSU, T., KASUYA, E., SAITO, T., OKUDAC, K. Expression of mRNAs for interleukin-4, interleukin-6 and their receptors in porcine corpus luteum during the estrous cycle. *Domestic Animal Endocrinology*. v. 31, p. 246–257, 2006.

SCHOMBERG, D.W., MAY, J.V., MONDSCHHEIN, J.S. Interactions between hormones and growth factors in the regulation of granulosa cell differentiation in vitro. *J Steroid Biochem*. v. 19, p. 291–295, 1983.

SEPPALA, M., KOISTINEN, R., RUTANEN, E.-M. Uterine endocrinology and paracrinology: insulin-like growth factor binding protein-1 and placental protein 14 revisited. *Hum Reprod*. v. 9, p. 917–925, 1994.

SCHEFE, J.H., LEHMANN, K.E., BUSCHMANN, I.R., UNGER, T., FUNKE-KAISER, H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel “gene expression’s CT difference” formula. *J Mol Med*. v. 84, p. 901-910, 2006.

SINGH, B., KENNEDY, T.G., TEKPETEY, F.R., ARMMSTRONG, D.T. Gene expression and peptide localization for epidermal growth factor receptor and its ligands in porcine luteal cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*. v. 113, p. 137-143, 1995.

SLEE, E. A.; ADRAIN, C.; MARTIN, S. J. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ*. v. 6, p. 1067-1074, 1999.

SPICER, L.J., ALPIZAR, E., ECHTERNKAMP, S.E. Effects of insulin, insulin-like growth factor-I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and (or) insulin-like growth factor-I production in vitro. *J Anim Sci*. v. 71, p. 1232–1241, 1993.

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

SPICER, L.J., CHAMBERLAIN, C.S., FRANCISCO, C.C. Ovarian action of leptin on IGF-I stimulated function of granulosa and theca cells. *Endocrine*, v. 12, p. 53-55, 2000.

SUGIMOTO M, MANABE N, KIMURA Y, MYOMOTO A, IMAI Y, OHNO H, MIYAMOTO H. Ultrastructural changes in granulosa cells in porcine antral follicles undergoing atresia indicate apoptotic cell death. *J Reprod Dev* v. 44, p.7-14, 1998.

TILLY, J.L. Apoptosis and ovarian function. *Rev Reprod*. v. 1, p. 162-172, 1996.

TILLY, J.L., TILLY, K.I., KENTON, M.L., JOHNSON, A.L. Expression of Members of the Bcl-2 Gene Family in the Immature Rat Ovary: equine Chorionic Gonadotropin-Mediated Inhibition of Granulosa Cell Apoptosis Is Associated with Decreased Bax and Constitutive Bcl-2 and Bcl1-x long messenger Ribonucleic Acid Levels. *Endocrinology*. v. 136, p. 232-241, 1995.

THORNBERRY, N. A., LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. *Science*. v. 281, p. 1312-1316, 1998.

VAUGHAN, T.J., PASCALL, J.C., JAMES, P.S., BROWN, K.D. Expression of epidermal growth factor and its mRNA in pig kidney, pancreas and other tissues. *Biochem. J*. v. 279, p. 315-318, 1991.

VAUGHAN, T.J., JAMES, P.S, PASCALL, J.C., BROWN, K.D. Expression of the genes for TGF α , EGF and the EGF receptor during early pig development. *Development*. V. 116, p. 663-669, 1992.

VAUX, D.L. Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc Natl Acad Sci*. v. 90, p. 786-789, 1993.

VERMEULEN, K., BERNEMAN, Z. N., VAN BOCKSTAELE, D. R. Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif*. v. 36, p. 165-175, 2003.

WANDJI, S.A., GADSBY, J.E., SIMMEN, F.A., BARBER, J.A., HAMMOND, J.M. Porcine ovarian cells express messenger ribonucleic acids for the acid-labile subunit and insulin-like growth factor binding protein-3 during follicular and luteal phases of the estrous cycle. *Endocrinology*. v. 141, p. 2638-2647, 2000.

WEN, L., CRAIG, J., DYCE, P.W., Li, J. Cloning of porcine signal transducer and activator of transcription 3 cDNA and its expression in reproductive tissues. *Reproduction*. v. 132, p. 511-518, 2006.

WONG, M.L. e MEDRANO, J.F. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*. v. 39, p. 75-85, 2005.

YOSHIDA, Y., YOSHIDA, M., BAMBA, K. Detection of growth factors mRNAs in porcine cumulus-oocyte complexes during maturation *in vivo* and *in vitro*. *J. Reprod. Dev.* v. 44, p.121-128, 1998.

YUAN, W., M. C. Lucy, SMITH, M.F. Messenger ribonucleic acid for insulin-like growth factors-I and -II, insulin-like growth factor-binding protein-2, gonadotropin receptors, and steroidogenic enzymes in porcine follicles. *Biol. Reprod.* V.55, p. 1045-1054, 1996.

ZHOU, J., ADESANYA, O.O., VATZIAS, G., HAMMOND, J.M., BONDY, C.A. Selective Expression of Insulin-Like Growth Factor System Components during Porcine Ovary Follicular Selection. *Endocrinology.* v. 137, p. 4893-4901, 1996.

ZHOU, J., KUMAR, T.R., MATZUK, M.M., BONDY, C. Insulin-like growth factor I regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary. *Mol. Endocrinol.* v. 11, p. 1924-1933, 1997.