

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

RELATÓRIO DO ESTÁGIO CURRICULAR
SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA
Washington State University: Endocrinologia da
Reprodução Animal

Ricardo Zanella

Passo Fundo

2006

Ricardo Zanella

**RELATÓRIO DO ESTÁGIO CURRICULAR
SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA
Washington State University: Endocrinologia da
Reprodução Animal**

Relatório do Estágio Curricular Supervisionado apresentado ao Curso de Medicina Veterinária, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, da Universidade de Passo Fundo, como requisito parcial para a obtenção do grau de Médico Veterinário, sob orientação do Dr. Jerry Reeves e co-orientador Dr. Eraldo L. Zanella.

Passo Fundo

2006

Este trabalho é dedicado a minha família, que nunca mediu esforços para a obtenção do meu grau de Médico Veterinário, sendo sempre uma fonte constante de amor, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Muitas foram as pessoas importantes para o meu crescimento pessoal e profissional no decorrer do curso, algumas não estão mais entre nós, mas ficarão marcadas para sempre em minha memória. Peço desculpas se esquecer algum nome e agradeço a todos que de uma forma ou de outra foram reponsáveis pela minha formação.

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, pela maravilhosa família que tenho, por ela ter sempre me dado força, apoio, carinho e esperança para a realização dos meus sonhos. Sinto-me muito orgulhoso e reconheço ter muita sorte de ter esta maravilhosa família.

Meus querido pais, Ipenor e Zuleika Zanella, que mesmo passando por momentos difíceis sempre deram um jeitinho e sempre tiveram palavras de apoio, dando força para seguir em frente ao meu objetivo e nunca desistir dos meus sonhos. Ao meu pai sou muito grato, por ter confiado em mim e dado a oportunidade de praticar as minhas habilidades teóricas em forma de prática, nos animais da nossa propriedade.

Aos meus irmãos, Valéria que sempre esteve pronta a me levar onde quer eu precisasse ir, Adroaldo J. Zanella que me incentivou a gostar de pesquisa, Eraldo Zanella que com puxões de orelha, conseguiu mostrar o melhor caminho a seguir, e a minha maninha Viviane Zanella que sempre soube dos meus problemas, e sempre teve palavras para me confortar. Aos meus cunhados e cunhadas, Olando Caús, Janice Zanella, Flávio Bello e Marcia Zanella, que sempre mostraram-se dispostos a ajudar no que fosse preciso. Aos meus queridos sobrinhos e sobrinhas, Laura, Paula, Pedro, Giovana, Giulia, Lorenzo, Maurício, Helena....que muitas vezes sem estar entendendo o que estava acontecendo, com um simples sorriso ou até mesmo uma piada sem graça, bastava para nos animar.

Aos meus amigos e colegas, por ter dado apoio nos momentos em que o mundo parecia desabar sobre nossas cabeças, onde nos dávamos as mãos e apoiávamos uns sobre os outros, buscando forças para seguir em frente.

Aos mestres desta instituição, que sempre tentaram dar o máximo deles para o nosso aprendizado, além é claro da amizade, em especial ao prof. Leonardo Alves, Sergio Cunha, Julio Soares e Mauro Rocha (meu padrasto).

Aos amigos e colegas veterinários Carlos Bondan, Maria Lúcia da Luz, que foram pessoas muito importantes para a minha formação acadêmica.

Ao Animal Behavior and Welfare Group, da Michigan State University que proporcionou o meu primeiro contato com a pesquisa, e de onde surgiram os meus primeiros trabalhos.

Ao Dr. Jerry Reeves e seu grupo, em especial Dr. Valéria Conforti e Kenny Wells, da Washington State University, por ter proporcionado a chance de realizar meu estágio curricular, além da hospitalidade e ajuda científica.

Não poderia deixar de agradecer, aos meus cães, Stefany, Pitucha e Tufão que mesmo sem saber da sua importância, foram eles que me ensinaram a verdadeira forma de tratar, cuidar e manipular os animais. Além disso gostaria de agradecer também à todos os animais da Agropecuária Zanella, que foram base para o meu aprendizado.

Por último, uma pessoa muito importante que sem ela, a minha vida iria ser muito difícil, longe da minha família, a minha namorada Marina Ragagnin de Lima, que sempre esteve presente nos momentos mais complicados, e nos mais alegres, nas conquistas, e fracassos sempre tentando me compreender, dando apoio, carinho, amor e atenção.

RESUMO

O presente relatório descreve as atividades desenvolvidas durante o Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária, realizado na Washington State University, Department of Animal Sciences, localizado na cidade de Pullman, no estado de Washington, EUA. As atividades acompanhadas ou realizadas abrangeram a participação em projetos de pesquisa, técnicas laboratoriais, apresentação de seminários e curso de diagnóstico de gestação em novilhas, além do acompanhamento de aulas de endocrinologia da reprodução e participação em seminários ministrados por professores e estudantes de graduação da Washington State University. O estágio foi realizado no período de janeiro a junho de 2006, com carga horária total de 1000 horas sob a orientação do Prof. Dr. Jerry Reeves. O relatório demonstra a rotina desenvolvida durante o período de estágio, bem como as etapas, processo e forma de ação da vacina contra LHRH para imunoesterilizar animais.

Palavras-chave:

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Protocolo de Sincronização utilizado nas receptoras.....	38
Figura 2 - Resultado placa PCR, identificação de genes responsáveis pelo	42
Figura 3 - Resultados experimento Ratos	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variação de lucro sobre a venda novilhas: vazias, prenhez e recém, paridas.....	35
Tabela 2 - Número de fêmeas bovinas palpadas pelo acadêmico no periodo do seu estágio curricular	36
Tabela 3 - Ingredientes e quantidade para a realização da técnica PCR.....	41
Tabela 4 - Componentes e quantidades para a realização da técnica de digestão enzimática ...	42
Tabela 5 - Coleta de sangue de ratos (Participação em projeto)	51
Tabela 6 - Coletas de sangue de novilhas efetuadas pelo acadêmico no periodo do seu estágio (Participação em projeto)	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio Adreno-Córticotrófico
ADH	Vasoprecina
ANS	Animal Science Department
C	Celsius (centígrado)
CIDR®	Dispositivo intravaginal para controle do cio em bovinos
dL	Decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dr	Doutor
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
<i>E. coli</i>	<i>Escheriquia Coli</i>
EqWIS	Equine Welfare Intervention Strategy
EV	Endovenoso
EUA	Estados Unidos da América
F	Fahrenheit
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GH	Hormônio do Crescimento ou Somatotrófico
g	Gramma
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
hrs	Hora
Ig	Imunoglobulina
IGF	Insuline grow factor
IM	Intramuscular
Kg	Quilograma

LH	Hormônio Luteinizante
LHRH (GnRH)	Hormônio liberador de Gonadotropinas
L	Litro
lb	Libra
M	Molar
mEq	Miliequivalente
mg	Miligrama
MHC	Complexo de histocompatibilidade
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mOsm	Miliosmol
MSU	Michigan State University
MW	Peso Molecular
Na	Sódio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
OXY	Ocitocina
P	Fósforo
Pb	Paras de bases
PCR	Reação de Cadeia da Polymerase
PGs	Prostaglandina
pH	Concentração do íon hidrogênio
ppm	Parte(s) por milhão
PRL	Prolactina
RNA	Ácido ribonucleico
SNC	Sistema nervosa central
s.c.	Subcutâneo
TSH	Hormônios tireotrófico
TNF	Fator de necrose tumoral
WSU	Washington State University
WA	Washington State
°	Grau
α	Alfa
β	Beta

g	Gama
mg	Micrograma
mL	Miliitro
µL	Microlitro
\$	Dollar
/	Por
%	Porcentagem
=	Igual
<	Menor
>	Maior

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
1 DESCRIÇÃO DO LOCAL	15
2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	16
2.1 ATIVIDADES GERAIS.....	16
3 ENDOCRINOLOGIA DA REPRODUÇÃO	18
3.1 HORMÔNIOS, SECREÇÃO E CLASSIFICAÇÃO	18
3.1.1 Hormônios.....	18
3.1.2 Classificação	20
4 GLÂNDULAS ENDÓCRINAS	22
4.1 HIPOTÁLAMO	22
4.2 GLÂNDULA PITUITÁRIA.....	23
4.2.1 Hormônios da adenohipófise.....	24
4.2.1.1 FSH – Hormônio Folículo Estimulante	25
4.2.1.2 LH – Hormônio Luteinizante	25
4.1.1.3 Prolactina	25
4.2.2 Hormônios da Neuro Hipofise	26
4.2.2.1 Ocitocina	26
4.2.2.2 Melatonina.....	27
4.2.2.3. Vasoprecina.....	27
5 HORMÔNIOS SECRETADOS POR ORGÃOS	28
5.1 ESTRÓGENOS: ESTRADIOL	28
5.2 PROGESTERONA	29

5.3 ANDRÓGENOS	29
Funções:.....	29
5.4 RELAXINA.....	30
5.5 INIBINA E ATIVINA.....	30
5.5.1 Inibina.....	30
5.5.2 Ativina	31
5.6 FOLISTATINA.....	31
5.7 PROSTAGLANDINAS	31
6 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	33
6.1 SEMINÁRIO APRESENTADO NA MICHIGAN STATE UNIVERSITY	33
6.2 CURSO DIAGNÓSTICO DE PREENHEZ EM VACAS COM AUXILIO DE ULTRA SOM E PALPAÇÃO TRANS RETAL EM CONFINAMENTOS	34
6.3 DIAGNÓSTICO DE PREENHEZ EM BOVINOS	36
6.4 PROCEDIMENTO EM UMA FAZENDA	36
6.5 TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES.....	37
7 TÉCNICAS DESENVOLVIDAS	39
7.1 PCR- A REAÇÃO DE CADEIA DA POLYMERASE.....	39
7.2 RESTRIÇÃO E DIGESTÃO ENZIMÁTICA	42
7.3 ISOLAMENTO MITOCONDRIAL ORGÃO FÍGADO DE CAMUNDONGOS	43
7.4 MENSURAÇÃO DE NÍVEIS DE CORTISOL EM FEZES DE ONÇAS	43
7.5 SÍNTESE DE cDNA	44
8 PARTICIPAÇÃO EM PROJETOS	45
8.1 IMUNOESTERILIZAÇÃO DE ANIMAIS COM VACINA CONTRA LhRH	45
8.1.1 GnRH no sistema.....	45
8.1.2 Mecanismo de ação	46
8.1.3 Vacinação.....	48
8.2 TESTE DA VACINA LHRH, DE IMUNO ESTERILIZAÇÃO EM RATAS	49
8.3 TESTE DA VACINA DE LHRH EM NOVILHAS.....	52
9 PRODUÇÃO DA VACINA LHRH.....	53
9.1 PURIFICAÇÃO DA VACINA.....	54
9.2 DIÁLISE.....	55
CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS.....	57
ANEXOS	61

ANEXO 1 - TRYPTON PHOSPHATE MEDIA	62
ANEXO 2 - EXTRAÇÃO DE DNA.....	63
ANEXO 3 - ANTI-LHRH ANTIBODY BINDING TEST.....	65
ANEXO 4 - CORTISOL EXTRACTION PROTOCOL	67
ANEXO 5 - SÍNTESE DE cDNA	68
ANEXO 6 - REAÇÃO DE PCR PARA cDNA	69
ANEXO 7 - UREA BUFFER.....	71
ANEXO 8 - GUANIDINE BUFFER.....	72
ANEXO 9 - REAL TIME PCR	73

INTRODUÇÃO

O estágio curricular, realizado no Department of Animal Sciences no período de 19 de janeiro a 10 de junho, totalizando 1000 horas, foi dividido em quatro áreas diferentes: Ensino, Pesquisa, Extensão e Técnicas Laboratoriais, sob a orientação do Prof. Dr. Jerry Reeves, e do técnico laboratorial David de Ávila.

Ná área do ensino a participação abrangeu, no semestre letivo, as aulas de Endocrinologia da Reprodução, onde foram abordados, a produção e mecanismo de ação dos hormônios responsáveis pela reprodução animal, além da participação semanal em seminários apresentados por colegas do departamento.

Na área de pesquisa, participação em diferentes projetos, tais como: produção de uma vacina anti GnRH, a qual tem a finalidade de imunoesterelizar animais por um período pré-determinado. Outro projeto no qual estive envolvido, é sobre o mapeamento genético de bovinos, no qual, procuramos genes específicos para o marmoreio e maciez da carne bovina.

Na área de extensão, orientação em aulas práticas/teóricas sobre diagnóstico de prenhez com auxílio de ultra som e palpação trans retal em bovinos. Além da produção de uma apostila para um mini curso teórico/prático de 16 hrs sobre diagnóstico de prenhez em novilhas e métodos abortivos (financiado pelo Department of Animal Sciences), e a apresentação de um seminário intitulado “EqWIS-Equine Welfare Intervention Strategy” na Michigan State University.

Com relação às técnicas laboratoriais, realizou-se mensuração de alguns hormônios como progesterona, cortisol, produção da vacina anti-LHRH, e outras técnicas laboratoriais.

1 DESCRIÇÃO DO LOCAL

O estágio curricular em Medicina Veterinária foi realizado na Washington State University (WSU), instituição de ensino, localizada na cidade de Pullman Washington, norte-oeste dos Estados Unidos da América.

A WSU é uma Universidade com mais de 113 anos, atualmente possui cerca de 23 mil alunos, divididos em 4 diferentes campi três destes localizados nos EUA e um no Canadá. O Campus da WSU, onde realizou-se este estágio, está localizado em Pullman WA, ele é o maior de todos, com mais de 18 mil alunos provenientes de 87 diferentes países, sendo que destes, 1.200 são alunos internacionais, realizando pesquisas em mais de 217 diferentes áreas.

O Departamento de Produção Animal, fica em um prédio separado do curso de Medicina Veterinária, porém muitos dos trabalhos de pesquisa com animais, são realizados em parceria entre estes dois os departamentos. O prédio do Animal Sciences, possui 2 andares, com 3 laboratórios em cada andar, sendo que todos os laboratórios são interligados, pois muitos dos trabalhos são desenvolvidos em parceria. As principais pesquisas, desenvolvidas no Animal Sciences, são sobre mapeamento genético, clonagem e produção da vacina de LHRH.

2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Durante o estágio curricular supervisionado em Medicina Veterinária, as atividades foram desenvolvidas em dois laboratórios diferentes.

No período de 19 de janeiro a 5 de maio, foram acompanhadas as aulas de endocrinologia da reprodução num total de 3 períodos por semana, além de seminários apresentados semanalmente por professores e alunos de graduação da WSU.

No primeiro mês de atividades trabalhou-se com a técnica de PCR, procurando marcadores genéticos específicos para maciões de marmoreio da carne bovina.

Na segunda parte do estágio, foi trabalhada a produção da vacina contra LHRH, além da apresentação de um curso sobre diagnóstico de gestação em fêmeas bovinas com o auxílio de ultra som e palpação trans retal e seminário apresentado na MSU.

Foram realizadas também atividades, fora do ANS, em propriedades rurais, como transferências de embriões, castração e retirada do processo cornual em bovinos, dentre outras atividades.

2.1 ATIVIDADES GERAIS

Durante o tempo de estágio curricular supervisionado foram produzidas, 1.3 gramas de vacina contra LHRH, 30 reações de PCR, apresentação de um curso de 16 horas sobre diagnóstico de gestação em fêmeas bovinas, apresentação de seminário na MSU, diagnóstico de gestação em fêmeas bovinas. Foram realizadas também práticas referentes a manejo em

fazendas, como orquiectomia, retirada dos processos cornuais e marcação a ferro quente em bovinos.

3 ENDOCRINOLOGIA DA REPRODUÇÃO

3.1 HORMÔNIOS, SECREÇÃO E CLASSIFICAÇÃO

Substâncias que intermediam a comunicação entre as células são chamadas de hormônios, muitas vezes, são liberados no sistema, mas possuem ação local. Substâncias hormonais liberadas pelos animais, podem influenciar respostas em outros animais, estas substâncias são denominadas ferormônios. Além disso, fatores de crescimento, são chamados (apropriadamente) de hormônios, desde que eles intermediem a comunicação entre células **(CONN, P. MICHAEL, 1997)**

3.1.1 Hormônios

São substâncias químicas sintetizadas e secretadas por glândulas endócrinas ou órgãos, em uma parte do organismo, que são levadas pela corrente sanguínea ou linfática para outra parte do corpo onde modificam as atividades de órgãos alvo específicos.

A principal característica dos hormônios é de transmitir informações sobre o status de um órgão para o outro, regulando assim as ações corretivas para manter a homeostasis. Por exemplo, níveis elevados de glicose no sangue, liberam sinais para o pâncreas liberar insulina. A insulina migra através da corrente sanguínea, sinalizando para as células alvos no fígado e células adiposas, para aumentar a permeabilidade para a glicose, assim, o açúcar é armazenado nas células, fazendo com que os níveis sanguíneos diminuam. Em modo para ser

efetivo, os hormônios não podem ser degradados rapidamente (antes de chegar nas células alvo), no entanto se a degradação for muito lenta poderá ocorrer uma resposta inapropriada. Por isso, diferentes tipos de hormônios possuem variáveis meia-vida na circulação, dependendo a que distância este sinal precisará se deslocar para que a informação seja conduzida de maneira mais efetiva.

A concentração hormonal é medida por receptores, geralmente proteínas que estão localizadas na superfície das células (membrana plasmática) ou no interior das células alvo. Os receptores, ligam-se aos respectivos hormônios, com alta afinidade e especificidade. No entanto, estrogênio e testosterona, são quimicamente parecidos, por exemplo, os receptores vão diferenciá-los pois eles modulam diferentes respostas celulares. Quando os receptores hormonais, estão situados, na membrana celular, e a resposta envolve mudanças intracelulares (secreção), a transdução da mensagem hormonal deverá ocorrer, as moléculas responsáveis por essas transdução, são chamadas de segundo mensageiros da ação hormonal.

A estrutura hormonal, não mudou marcadamente durante a evolução, como por exemplo, em algumas espécies animais, possuem a presença de hormônios esteroides, hormônios da tireoide e peptídeos, porém não utilizam estes com o mesmo propósito endócrino que os mamíferos.

As células utilizam de uma grande variedade de sinais, para se comunicar com outras, mas em vertebrados, esta comunicação é mediada por substâncias denominadas hormônios. Hormônios são mensageiros químicos, produzidos por glândulas endócrinas que age localmente ou a distância, regulado pelas células alvo que possuem receptores específicos para os sinais. A sua comunicação pode ser de diferentes formas:

- Endócrina: Hormônios são transportados através da circulação sanguínea, típica da maioria dos hormônios.

- Comunicação parácrina: Os produtos das células se difundem através do fluido extracelular para afetar as células vizinhas. Ex. Prostaglandinas.

- Comunicação autócrina: As células secretam mensageiros químicos que atuam em receptores na mesma célula em que foi secretado. O útero e o hipotálamo produzem hormônios que não pertencem a essa definição clássica.

- Justácrina: Comunicação entre as células, sem passar pela membrana basal.

- Exócrina: Mediado através de substâncias, produzidas fora da célula, porém agem no interior dela.

- Intócrina: Produzida pela célula e consumida por ela mesmo, semelhante a autócrina, porém não sai da célula para voltar a ela.

3.1.2 Classificação

Os hormônios podem ser classificados tanto de acordo com sua estrutura bioquímica, tanto como seu modo de ação. A classificação bioquímica é dada da seguinte forma: glicoproteicos, polipeptídeos, esteróides, ácidos graxos e aminos.

- Protéicos: Os hormônios hipofisários LH e FSH pertencem à família dos hormônios glicoprotéicos, que também inclui os hormônios tireotrófico (TSH), a gonadotrofina coriônica (hCG) e citocina. Os hormônios glicoprotéicos são compostos por duas cadeias unidas por pontes de hidrogênio. A cadeia alfa possui uma seqüência comum aos 4 hormônios, enquanto a cadeia beta é característica de cada hormônio glicoprotéico e confere a especificidade de ligação aos receptores. Os efeitos dos hormônios glicoprotéicos são mediados por receptores localizados na membrana plasmática, que ativam a enzima adenil ciclase através da ligação à proteína Gs. O LH e o hCG exercem seus efeitos biológicos através de um único receptor localizado na membrana citoplasmática (4). O receptor maduro do LH/hCG é um polipeptídeo de 674 aminoácidos, caracterizado por uma estrutura composta de três domínios: o extenso domínio extracelular aminoterminal, o domínio intermediário composto de sete segmentos helicoidais de propriedade hidrofóbica, interligados por 3 alças extracelulares e 3 alças intracelulares, e o curto domínio intracelular carboxi-terminal (4,5). Aproximadamente metade dos aminoácidos do receptor do LH está presente no domínio hidrofílico extracelular aminoterminal. Este domínio contém diversas repetições de leucina envolvidas com a interação peptídica. De fato, a expressão isolada do domínio amino-terminal do receptor do LH em células transfectadas, é suficiente para ligação com os agonistas (LH ou hCG) com a mesma afinidade quando comparada à do receptor completo (5).

- Esteróides: São moléculas lipofílicas, usadas como mensageiros químicos nos organismos (desde o mais simples até os humanos). Nos vertebrados, eles agem em um grande número de tecidos, e influencia muitos aspectos biológicos, incluindo diferenciação sexual, fisiologia da reprodução, osmoregulação e intermedia o metabolismo. Os maiores pontos, de síntese e secreção de esteroides, incluem ovários, testículos, adrenal e placenta. De acordo com a distância da ação destes esteroides, eles podem ser classificados como fator (endócrino, parácrino ou autócrino). Quando liberados no ambiente, os esteroides podem ser classificados com ferormônios levando informações para outros animais. O hormônio Esteróide, é uma molécula lipídica, derivada do colesterol. Existem quatro principais classes dos esteróides: progesterona, androgênios, estrogênios e corticoides, contendo

respectivamente, 21, 19, 18 e 21 carbonos. Os hormônios esteróides, são sintetizados pela dehidrogenase e por enzimas do citocromo P450 que catalisa a hidroxilação e dehidroxilação-oxidativa da reação. Nos vertebrados, a síntese e secreção de esteroides, são regulados por hormônios da pituitária anterior, como FSH, LH e ACTH.

- Ácido graxo: O termo ecosanoide é utilizado para descrever o grupo de componentes derivados do C20 ácido graxo. O precursor para a biossíntese dos ecosanoides, na maioria dos mamíferos é o ácido aracdonico. A atividade biológica dos ecosanoides é rapidamente destruída nos tecidos e na circulação, eles agem localmente a níveis de tecido e órgãos. No entanto, esta a sua formação ocorre em problemas inflamatórios. A existência biológica das prostaglandina (PGs) foram descobertas por volta de 1930, quando detectou-se uma leve contração muscular e atividade vasopressora em extratos do plasma seminal ovino e humano.

- Aminas: Melatonina, derivados da tirosina e triptofano.

4 GLÂNDULAS ENDÓCRINAS

4.1 HIPOTÁLAMO

Ocupa pequena porção do cérebro, na região do terceiro ventrículo, estendendo do quiasma óptico para o corpo mamilar. Existe conexão neural entre o hipotálamo e o lobo posterior da hipófise (Neurohipofise), através do trato hipotalâmico-hipofisário e conexão vascular entre o hipotálamo e o lobo anterior da hipófise.

O sangue arterial entra na hipófise pela artéria hipofisária superior e inferior. A artéria hipofisária superior forma capilares na eminência média e pars nervosa. Desses capilares o sangue flui até o sistema porta hipotalâmico-hipofisário, o qual inicia e termina nos capilares sem passar pelo coração.

Parte do retorno venoso da hipófise anterior é pelo caminho retrógrado e expõe o hipotálamo a altas concentrações dos hormônios da hipófise anterior, o que faz com que ocorra feedback negativo.

O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) é um peptídeo chave que controla a secreção de gonadotrofinas (FSH e LH), e portanto a função gonadal. Esse hormônio hipotalâmico é liberado de modo contínuo no macho e de forma pulsátil e, na fêmea, a sua frequência e amplitude variam durante os estágios reprodutivos nas diferentes espécies.

Sabe-se que durante o período pré-ovulatório, em espécies com ovulação espontânea ou, no coito em animais com ovulação induzida, o GnRH é liberado como uma onda devido ao aumento nos níveis de esteróides circulantes (estrógeno e progesterona) (PAU e SPIES,1997).

O GnRH é rapidamente metabolizado por uma peptidase da hipófise anterior uma vez que apresenta uma meia-vida de 7 a 12 minutos.

Diversos análogos de GnRH têm sido sintetizados quimicamente, podendo causar aumento (antagonista) ou diminuição (agonista) de sua atividade.

Nos bovinos as principais utilizações destes hormônios sintéticos estão relacionadas com a sincronização do estro e transferência de embriões para luteinização de folículos; por outro lado, nos eqüinos são usados durante o estro para produzir ovulação e diminuição do período estral, podendo serem administrados no quinto dia após a aplicação de prostaglandina ou entre o terceiro e quarto dia do estro.

4.2 GLÂNDULA PITUITÁRIA

A hipófise está localizada na sela túrgica, uma depressão óssea na base do cérebro. A Glândula é dividida em 3 partes ; Lobo anterior , Lobo intermediário, Lobo posterior.

A pituitária anterior tem diferentes tipos celulares, secretando diversos hormônios como:

- 1 – Hormônio do Crescimento ou Somatotrófico (GH)
- 2 – Hormônio Adenocorticotrófico (ACTH)
- 3 – Prolactina (PRL)
- 4 – Hormônio Estimulador da Tireóide (TSH)
- 5 – Hormônio Folículo Estimulante (FSH)
- 6 – Hormônio Luteinizante (LH)

Já a pituitária posterior, secreta:

- 1 – Ocitocina (OXY)
- 2 – Vasoprecina (ADH)
- 3 – Melatonina

4.2.1 Hormônios da adenohipófise

Cada hormônio é constituído por duas subunidades, cadeia α e cadeia β . A cadeia alfa é comum aos FSH e LH de todas as espécies, no entanto a cadeia beta confere especificidade a cada gonadotrofina.

Nenhuma das subunidades isoladas tem atividade biológica isoladas.

Animais de ambos os sexos secretam dois hormônios estimulantes das gônadas (gonadotrofinas) a partir da hipófise anterior: o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH). Nos machos, estes hormônios são secretados em nível constante. Nas fêmeas, há picos que estão subjacentes às atividades cíclicas do ovário (FREEMAN, 1994). A secreção cíclica de gonadotrofinas pela hipófise não depende diretamente do sexo genético, mas principalmente da ausência de androgênio durante o período perinatal (GORSKI, 2000).

Os hormônios hipofisiários gonadotróficos importantes para a reprodução na fêmea são o hormônio folículo estimulante (FSH), o hormônio luteinizante (LH) e a prolactina (PRL), os quais são glicoproteínas, ou seja, são compostos de cadeias de aminoácidos ligadas por peptídeos e de cadeias de carboidratos ligados aos fosfolipídeos.

Os hormônios glicoprotéicos têm duas cadeias polipeptídicas, alfa e beta, ligadas de maneira não covalente. As subunidades alfa de todos os hormônios glicoprotéicos são idênticas dentro de uma espécie; as subunidades beta são diferentes, tanto em conteúdo de aminoácidos como de carboidratos, o que confere especificidade de ação ao hormônio. A secreção de LH e FSH é controlada pelo GnRH, sendo que ambos são liberadores de uma forma tônica ou basal, tanto no macho como na fêmea. Os níveis tônicos de LH e FSH são controlados através de um mecanismo de *feedback* negativo das gônadas.

Existe uma outra forma de liberação denominada de onda pré-ovulatória de LH e de FSH, que é evidente na fêmea antes da ovulação. Esta onda pré-ovulatória é responsável pela ovulação e persiste de 6 a 12 horas na maioria das espécies. A onda pré-ovulatória de LH é iniciada por um aumento na concentração de estrógeno circulante, três dias antes da ovulação, esta apresenta um efeito feedback positivo sobre o eixo hipotálamo-hipofisiário na indução da liberação de LH e FSH (HAFEZ, 1996).

O LH é responsável pela ovulação e transformação do folículo ovariano em corpo lúteo, enquanto que a principal função do FSH é promover o desenvolvimento do folículo de Graaf no ovário. O FSH atua precocemente no desenvolvimento folicular e certamente para a

formação do antro do folículo. Talvez, o mais importante seja que a ação sinérgica do FSH com os estrógenos, proporcione a formação de receptores para o FSH e o LH, nas células granulosas do folículo.

4.2.1.1 FSH – Hormônio Folículo Estimulante

Estimula o crescimento e a maturação dos folículos ovarianos, FSH não causa secreção de estrógeno do ovário por ele mesmo, ele precisa da presença do LH para estimular a produção de estrógeno.

Nos machos, FSH atua nas células germinativas nos túbulos seminíferos do testículo e é responsável pela espermatogênese até o estágio de espermátócito secundário, mais tarde andrógenos do testículo mantêm os estágios finais da espermatogênese.

4.2.1.2 LH – Hormônio Luteinizante

LH é uma glicoproteína composta de subunidade alfa e beta.

O nível tônico ou basal de LH atua em conjunto com FSH para induzir secreção de estrógeno do folículo ovariano dominante.

O pico pré-ovulatório de LH é responsável pela ruptura do folículo e ovulação.

O LH estimula as células intersticiais do ovário e do testículo.

No macho, as células intersticiais (Leydig) produzem andrógeno após a estimulação de LH.

4.1.1.3 Prolactina

É um hormônio polipeptídico secretado pela adenohipófise o PIF, Fator inibidor da Prolactina, é a dopamina, é transportado pelo sistema porta hipofisário da adenohipófise.

A função da prolactina nos mamíferos é promover o crescimento dos tecidos responsáveis pela galactopoiese, desenvolvimento dos alveolos mas não dos ductos. A sua ação para a sua estimulação à produção de leite, é controlada pelos níveis de progesterona. Além disso ele está envolvido na produção de caseína, ácidos graxos e lactose. Ele é denominado hormônio gonadotrófico por causa de sua atividade luteotrófica em roedores. Entretanto em mamíferos LH é o hormônio luteotrófico, sendo a prolactina pouco importante.

4.2.2 Hormônios da Neuro Hipofise

Os hormônios da neurohipófise (hipófise posterior) diferem dos outros hormônios da hipófise porque não são produzidos na hipófise, e sim apenas estocados nela.

A ocitocina e a vasopressina (ADH ou hormônio antidiurético) são produzidos no hipotálamo. Esses hormônios são transferidos do hipotálamo para hipófise posterior não através do sistema vascular e sim através dos axônios do sistema nervoso.

4.2.2.1 Ocitocina

Sintetizada no hipotálamo e transportada em vesículas pelos axônios hipotálamo-hipofisários e estocados na neurohipófise, a ocitocina é também produzida em pequena quantidade pelo corpo lúteo, possuindo assim dois sítios de produção, o hipotálamo e o ovário.

Durante a fase folicular do ciclo estral e durante os últimos estágios da gestação, a ocitocina estimula contração uterina, e na fecundação, facilita o transporte de espermatozoides pelo oviduto no estro.

A compressão do feto na cérvix no parto causada pela passagem do feto, estimula um reflexo de liberação de ocitocina (Reflexo de Ferguson). Entretanto o efeito mais conhecido da ocitocina é o reflexo da descida do leite. O estímulo tátil ou visual associado com a sucção induz a liberação de ocitocina na circulação. A ocitocina causa contração das células mioepiteliais que se situam ao redor do alvéolo na glândula mamária resultando na ejeção do leite.

A ocitocina ovariana está envolvida na função luteal, atua no endométrio para induzir liberação de $\text{PGF}_2\alpha$ que tem ação luteolítica.

4.2.2.2 Melatonina

É sintetizado na glândula pineal; a glândula pineal ou epífise cerebri é um órgão neuroendócrino que exerce importantes funções regulatórias nos vertebrados pela secreção do hormônio melatonina, em variáveis quantidades dependendo da idade do animal e hora do dia e em algumas espécies a estação do ano. A periodicidade do dia, regula a concentração da melatonina no plasma sanguíneo, que é baixa durante o dia e aumenta durante a noite. A queda dos níveis de melatonina nos adolescentes, pode estar relacionado com a puberdade, uma queda nos níveis também é observado em idade avançada, podendo relacionar a idade com insônia. Em alguns mamíferos, a estação do ano, e as mudanças de luz durante o dia é responsável pelas variações nos níveis plasmáticos, o que pode ser um dos causadores do aumento e atrofia das gônadas. As células do parênquima da pineal a partir do triptofano convertem-no em serotonina, que sob controle neural fazem a conversão para melatonina. A síntese e secreção de melatonina é elevada no período escuro. Longos períodos de elevada secreção de melatonina são responsáveis provavelmente pela indução do ciclo ovariano das ovelhas e inibição do ciclo ovariano das éguas.

4.2.2.3. Vasopressina

A vasopressina (ADH) aumenta a reabsorção de água tendo um importante papel no controle da pressão sanguínea a longo prazo, ela atua, na secreção e expressão celular.

5 HORMÔNIOS SECRETADOS POR ORGÃOS

5.1 ESTRÓGENOS: ESTRADIOL

É o principal estrógeno. É o estrógeno biologicamente ativo produzido pelo ovário, com pequenas quantidades de estrona. Exceto pela possível secreção de estriol na fase luteal do ciclo, que é eliminado na urina. Todos estrógenos ovarianos são produzidos a partir de andrógenos.

Proteínas carreadoras na circulação carregam os estrógenos.

Atividades:

- Atua no SNC para induzir comportamento de estro em fêmeas, entretanto pequenas quantidades de Progesterona com estrógeno são necessários para induzir estro em vacas e ovelhas.

- Atua no útero para aumentar a amplitude e frequência das contrações potencializando efeito da ocitocina e da $\text{PGF}_2\alpha$.

- Desenvolvimento físico das características sexuais secundárias das fêmeas.

- Estimula o crescimento de dutos e causam o desenvolvimento da glândula mamária.

- Exerce Feedback negativo (centro tônico) e positivo (centro pré-ovulatório) no controle da liberação de LH e FSH através do hipotálamo.

- Em ruminantes, estrógenos têm efeitos anabólicos, aumenta o ganho de peso e o crescimento.

5.2 PROGESTERONA

A progesterona é um hormônio imprescindível para a regulação do funcionamento do sistema reprodutor feminino e, é produzida principalmente pelo corpo lúteo, sendo este proveniente da reorganização das células foliculares após o processo ovulatório. Dentre as ações fisiológicas da progesterona encontram-se o crescimento das glândulas uterinas e mamárias, a estimulação das glândulas endometriais para secreção do fluido endometrial, o qual é necessário à nutrição do blastócito antes da implantação, é também necessária para a manutenção da gestação na maioria dos mamíferos, pelo menos durante o terço inicial da gestação. Atua sinergicamente com os estrógenos em diversas funções fisiológicas.

Elevados níveis de progesterona inibem o estro e a onda ovulatória de LH, estabelecendo assim a importância desta na regulação do ciclo estral (HAFEZ, 1996).

5.3 ANDRÓGENOS

Os andrógenos são esteróides com 19C com uma hidroxila ou oxigênio na posição 3 e 17 e uma dupla ligação na posição 4.

A testosterona é um andrógeno produzido pelas células intersticiais do testículo (Células de Leydig), com uma produção limitada no córtex da adrenal. É transportada no sangue pela α globulina designada globulina de ligação esteroide. 98% da testosterona circulante é ligada, o restante é livre para entrar no alvo qdo uma enzima no citoplasma converte a testosterona em dihidrotestosterona, quem atua no receptor nuclear.

Funções:

- Estimular os últimos estágios da espermatogênese e prolongar a meia vida do espermatozóide no epidídimo.
- Promover o crescimento, desenvolvimento e atividade secretória dos órgãos sexuais acessórios do macho.
- Manter características sexuais secundárias e características sexuais ou libido no macho.

5.4 RELAXINA

É um hormônio polipeptídico formado por duas subunidades α e β unidas por duas pontes dissulfeto.

A relaxina é secretada principalmente pelo corpo lúteo durante a gestação. Em algumas espécies a placenta e o útero produzem relaxina.

O principal efeito biológico da relaxina é promover a dilatação da cérvix e da vagina antes do parto.

- Inibe contração uterina.
- Em conjunto com estradiol promove o crescimento da glândula mamária.

5.5 INIBINA E ATIVINA

Inibina e ativina são isoladas do fluído gonadal, tem efeito na produção de FSH.

Possuem regulação parácrina, entretanto, moduladas pelo sinal endócrino de LH.

5.5.1 Inibina

Produzida pelas células de sertoli no macho e da granulosa em fêmeas. Não é um esteróide mas sim proteína composta de duas subunidades. No macho é secretada pela via linfática e não venosa como na fêmea.

A inibina possui um importante papel na regulação hormonal da foliculogênese durante o ciclo estral. Atua como sinal químico para a hipófise do número de folículos em crescimento no ovário. Reduz a secreção de FSH para níveis basais. Inibe a liberação de FSH sem alterar a secreção de LH, deve ser a responsável pela liberação diferenciada de FSH e LH pela hipófise. Regula também a função da célula de Leydig no macho em relação a produção de testosterona.

5.5.2 Ativina

Ativina estimula a secreção de FSH, também possuem duas subunidades, estão presentes no fluido folicular e fluído da rete testis. Ativina é membro funcional dos fatores de crescimento folicular.

5.6 FOLISTATINA

Outra proteína isolada do fluído folicular. A folistatina não somente inibe a secreção de FSH mas também liga as ativinas e neutraliza sua atividade biológica. É um importante modulador da secreção de FSH hipofisário.

5.7 PROSTAGLANDINAS

As prostaglandinas são sintetizadas no próprio organismo animal a partir de fosfolipídios de membrana celular que, ao sofrerem a ação da fosfolipase A2 produzem ácido araquidônico, o qual é o precursor das prostaglandinas mais intimamente associadas com os processos reprodutivos, principalmente a $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$) e a E2 ($PGE2$). Todas as prostaglandinas são ácidos graxos hidroxilados não saturados com 20 carbonos, com um anel ciclopentano em C18-C12.

Os níveis sanguíneos das prostaglandinas são muito baixos, embora possam aparecer elevados sob certas condições, como no parto. As prostaglandinas são rapidamente metabolizadas e degradadas, o que provavelmente seja responsável pela sua transitória atividade farmacológica e baixos níveis sanguíneos. Estão envolvidas na liberação de gonadotrofinas ($PGE2$ de LH “in vitro” e “in vivo” e a $PGF2\alpha$ “in vivo” em diversos animais de laboratório e espécies domésticas).

A $PGF2\alpha$ é considerada a substância que inicia a regressão do corpo lúteo, através da supressão do aporte sanguíneo pela degeneração dos vasos sanguíneos em bovinos (Lauderdale et al, 1974), além disso, pode ser utilizada para o controle do ciclo estral em

vacas (ODDE, 1990). A sua administração após cinco dias do ciclo estral, causa uma rápida redução na concentração plasmática de progesterona à níveis basais em um período de 24 horas. A frequência dos pulsos de LH causam um aumento nos níveis de estradiol, induzindo assim o estro e conseqüentemente a ovulação (SAVIO et al, 1990).

6 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

6.1 SEMINÁRIO APRESENTADO NA MICHIGAN STATE UNIVERSITY

O seminário apresentado no dia 11 de abril de 2006, Department of Animal Sciences da Michigan State University, intitulado “Equine Welfare Intervention Strategy-results”.

O uso de cavalos nos países em desenvolvimento oferece uma oportunidade de utilização de recursos renováveis e mantém a conexão entre os egressos do meio rural e agricultura.

A cidade de Porto Alegre abriga cerca de 6.650 cavalos de carroça que são utilizados como meio de transporte e trabalho pela população de baixo poder aquisitivo. Cachoeirinha, pertence a região da grande Porto Alegre, onde existem aproximadamente 400 eqüinos de carroça (Censo, 2000). O propósito desse estudo foi verificar as limitações e obstáculos que comprometem a habilidade dos carroceiros em melhorar o bem-estar de seus cavalos. A partir disso, pretende-se encontrar alternativas para melhorar a qualidade de vida dos cavalos e, conseqüentemente, da população que divide o nicho ecológico com estes animais. A hipótese é de que o enriquecimento do conhecimento da população alvo, sobre as necessidades básicas dos eqüinos propiciará um incremento dos indicadores de bem-estar.

O projeto, teve início em Janeiro de 2003, onde primeiramente efetuou-se um levantamento do número de animais (cavalos de carroça), presentes na região da grande Porto Alegre. Além disso, os proprietários foram entrevistados, e os equinos eram submetidos a exame clínico geral, onde eram avaliados o escore de condição corporal, hidratação, manqueira, ferrageamento, qualidade do pelo e número de lesões. Após isso, efetuou-se a coleta de sangue e fezes destes animais para posterior análise. O seminário apresentado na

Michigan State University, teve como objetivo, relatar e descrever a melhora dos parâmetros analisados, nos 3 anos de projeto (Anexo a apresentação).

6.2 CURSO DIAGNÓSTICO DE PREENHEZ EM VACAS COM AUXILIO DE ULTRASOM E PALPAÇÃO TRANS RETAL EM CONFINAMENTOS

O curso de diagnóstico de prenhez em novilhas de corte, teve como principal objetivo, o diagnóstico precoce de prenhez em novilhas de confinamentos, para poder ser efetuado o abortamento das mesmas, e conseqüentemente obter uma maior conversão alimentar e um maior ganho de peso.

A prevalência de novilhas prenhez que chegam nos confinamentos dos EUA varia de 3 a 20% (EDWARDS e LAUDERT, 1984). Novilhas prenhez, produzem cerca de \$ 66.35 menos que novilhas vazias e \$ 26.41 menos que novilhas abortadas (JIM et al, 1991). Novilhas prenhez em confinamentos poderá ter um custo sanitário elevado como no caso de (distocias, cesareanas, perdas por morte, palpação, abortos, abortos-relacionados a morbidade) e também pelos inferiores preços pagos pelos abatedouros por novilhas recém paridas ou prenhez. Novilhas sadias prenhez, possuem uma percentagem de carne por carcaça menor (CLAYTON e LOYD, 1984). Além disso problemas associados com novilhas prenhez pode ser um efeito negativo na moral dos funcionários do confinamento. Nos Estados Unidos da América, cerca de 7,5 % de todas as novilhas abatidas estão prenhez. Causando perdas principalmente para os produtores e para o confinamento, pois a novilha não estará convertendo a maioria do alimento ingerido por ela em peso vivo, pois a maioria dos nutrientes esta sendo destinado para a alimentação e nutrição do feto. Além disso, como os animais que estão no confinamento, são bovinos considerados gordos (com score corporal acima de 8) REF e animais com maior deposição de gordura, estarão mais predispostos a terem problemas na hora do parto e depois dele, como é o caso dos parto distócitos, retenção de placenta, e além disso o principal prejuizo causado para o confinamento é de dispor de um local para abrigar o terneiro e a vaca no pós parto, tendo assim gastos com a alimentação.

Novilhas vazias e prenhez, são avaliadas pela industria, por terem o mesmo peso final de aproximadamente 544 Kg, porém possuem uma diferença no percentual de carne na carcaça, e almém disso possuem um decréscimo de são \$ 10,00 dólares sobre o valor total do

animal (JIM et al., 1991), por isso da importância de vender um animal que não esteja prenhe, para garantir um melhor preço, e assim favorecendo uma maior viabilidade ao setor primário.

O curso foi dividido em três partes: Parte teórica, Prática com palpação e prática com ultrassom.

Na primeira parte do curso foi abordado os problemas que podem acarretar ter uma vaca prenhe em um confinamento, abordando o lado econômico. Depois disso, passou-se para a parte anatomica, onde foi explanado sobre a localização e as diferenças do trato reprodutivo de fêmeas bovinas vazias e prenhez. Posteriormente expliquei sobre alguma das funções dos principais hormônios responsáveis pela reprodução, e o mecanismo de ação das drogas abortivas mais utilizadas para bovinos (Dexametazona e Prostaglandina). Na primeira parte do curso prático, foi demonstrado a diferença dos tratos reprodutivos de fêmeas bovinas vazias e prenhes em peças de abatedouro, estimulando os alunos a palparem, e sentirem a diferença na contratilidade, tamanho e consistência. Após passamos o ultrassom, nestas peças para mostrar o que eles esperariam ver de diferenças entre animais de diferentes estágios de gestação. No primeiro dia de curso, fizemos o diagnóstico de prenhez em 45 novilhas, primeiramente com a palpação transretal e posteriormente com a utilização do ultrassom. No segundo dia de curso, foi apresentado um poster com fotos dos diferentes estágios gestacionais (27 dias á 9 meses). Após isso separou-se 15 animais para cada aluno, eles palpavam primeiro e após eu confirmava com palpação trans retal e mostrava com o ultrassom as estruturas que estavam sendo palpadas. Foi realizado o diagnóstico de aproximadamente 100 novilhas neste segundo dia, elas foram separadas em dois grupos, curta gestação (até 90 dias) e longa gestação (+ de 90 dias). Para as novilhas prenhez de curta gestação, era aplicado uma dose de 20 mg de PGF₂α via intra muscular (IM), já os animais de longa gestação, além de 20 mg de PGF₂α IM, era fornecido por via endovenosa (EV) 25 mg de dexametazona.

Tabela 1 - Variação de lucro sobre a venda novilhas: vazias, prenhez e recém, paridas.

Novilhas vazias	
Peso vivo (Kg/Novilha)	544
% de carne na carcaça	63.5
Novilhas prenhez	
Peso vivo (Kg/Novilha)	544
% de carne na carcassa	59.8
Novilhas recém paridas	
Peso vivo (Kg/Novilha)	454
% de carne na carcaça	63.5

Fonte: Marilyn J. Buhman (2003)

6.3 DIAGNÓSTICO DE PREENHEZ EM BOVINOS

Os diagnósticos de gestação, foram realizados em vacas e novilhas de corte, primeiramente com o uso da palpação trans retal, e posteriormente com o uso de ultra som, para animais que apresentavam, período de gestação menor de 90 dias.

Tabela 2 - Número de fêmeas bovinas palpadas pelo acadêmico no periodo do seu estágio curricular

Prenhez	< 90 dias	> 90 dias	Vazias
Novilhas	45	55	126
Vacas	10	52	24
Total	55	107	150

6.4 PROCEDIMENTO EM UMA FAZENDA

Foi realizado o descorne em 20 terneiros da raça Wagyu com idade de 4 a 7 meses, bem como a castração dos mesmos. A técnica utilizada para o descorne foi a de cortar, os chifres dos animais, o mais perto da base da cabeça dos mesmos, e retirar eles do local, o procedimento foi realizado sem a utilização de qualquer tipo de sedação e ou medicamento para o animal. O método de castração utilizado, foi de tirar um tampão do saco escrotal dos animais e ao invés de amarrar e cortar o cordão espermático, o mesmo foi tracionado até o ponto de arrebentar este procedimento também não foi utilizado nenhum tipo de sedação. Todos os terneiros foram brincados, e vacinados com a vacina CattleMaster® 4 Vacina contra Rinotraqueíte Infecciosa Bovina – IBR, Diarréia V i r a l Bovina – BVD, Parainfluenza t i p o 3 – PI3 e Vírus S i n c i a l Bovino – BRSV, na dose de 2 ml por animal por via IM e com a vacina Fortress* 8 (Bacterina Toxóide contra Carbúnculo Sintomático, Gangrena Gasosa, Enterotoxemia e Hemoglobinúria Bacilar dos Bovinos) na dosagem de 5 ml por via s.c.. Além disso, vacinou-se 35 terneiras com idade superior a 5 meses com estas duas vacinas. Todos estes 55 animais, foram marcadora a ferro quente, em na região da picanha do lado direito. Primeiramente efetuou-se a tricotomia do local, e em seguida, com um ferro quente aquecido por corrente elétrica foi utilizado para marcar os animais.

6.5 TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

Acompanhei a transferência de trinta e quatro (34) embriões coletados de cinco (5) diferentes vacas de alta genética da raça Wagyu. O tratamento superovulatório foi iniciado no 4º dia de sincronização do cio das doadoras, com a aplicação decrescente de dose de FSH à cada 12 horas, iniciando com 2.4, 2.2, 2.0 até o 7º dia, coincidindo com a retirada do CIDR e administração de um análogo da prostaglandina F2 α para lise do corpo lúteo, induzindo o cio em 24 a 48 horas. As inseminações foram realizadas 12 e 24 horas após a detecção do cio, respectivamente com semên de três (3) dos melhores touros do ranking da raça Wagyu, selecionados através da quantificação de genes responsáveis pelo marmoreio e maciez da carne. No sétimo dia após o cio foi realizada a coleta dos embriões por lavagem intra-uterina realizada com o meio (PBSM) através de sonda do tipo Foley nº18, acoplada a um equipo de duas vias, filtro e seringa de 60ml. Após a lavagem intrauterina (200ml de solução em cada corno uterino) os embriões retidos no filtro foram localizados com o auxílio de lupa, e expostos por 5 min ao Etileno Glicol a 1,5m com 1% de sucrose. Após isso, foram acondicionados em palhetas com Etileno Glicol e colocados a uma temperatura de -6°C por 10min, utilizou-se uma curva de resfriamento de -0.5° C por minuto até chegar a -32°C, onde foram imediatamente acondicionados a um botijão de nitrogênio líquido a -196°C. O descongelamento, foi realizado através da retirada dos embriões imersos no nitrogênio, deixando-os por 5 segundos a temperatura ambiente (37° C), e logo após a palheta, com um embrião localizado no centro, era imersa em água a temperatura de 80° F por vinte e cinco (25) segundos. Após isso, secou-se bem a palheta, principalmente na parte onde se localiza a bucha com as informações sobre os embriões. Um embrião foi perdido, pois a palheta em que o mesmo estava acondicionado estourou na hora do descongelamento. Para inovulação foram utilizados apenas mórulas compactas e blastocistos iniciais, de tamanho de 4 à 6 respectivamente, classificados como excelentes (grau I) ou bons (grau II), de acordo com os critérios da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) (Stringfellow & Seidel, 1999). As receptoras foram selecionadas previamente, e foram submetidas a um protocolo de sincronização de cio com a utilização de CIDR® juntamente com a aplicação de GnRH por via IM, foi mantido o CIDR® por um um período de 7 dias, após isso, retirou-se o implante intra-vaginal e aplicou-se prostaglandina (Figura 3). Elas foram programadas, para demonstrarem cio sete (7) dias antes da inovulação dos embriões. No dia das transferências, as vacas foram submetidas a exame ginecológico completo e selecionadas pela qualidade do

corpo lúteo e integridade sistema genital. Elas foram submetidas a uma leve sedação, com uma dose de 2 ml de acepromazina a 10% por via intra muscular e anestesia epidural baixa com lidocaina a 2%, sem vasoconstritor no volume de 5 ml. O diagnóstico de prenhez e a sexagem do feto, será realizada 58 dias após a inovulação dos embriões.

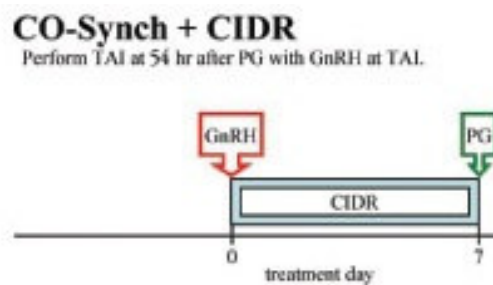


Figura 1 - Protocolo de Sincronização utilizado nas receptoras

7 TÉCNICAS DESENVOLVIDAS

7.1 PCR- A REAÇÃO DE CADEIA DA POLYMERASE

Coleta de pêlos da cauda de touros e sangue, para extração de DNA (anexo 2) para posterior análise de genes responsáveis pelo marmoreio e macies da carne bovina, com auxílio da Técnica de PCR..

A Reação de Cadeia da Polymerase (PCR) foi desenvolvida por Kary Mullis e o grupo de cientistas da Cetus Corporation. A primeira publicação foi realizada em 1985 à qual foi intitulada de (Enzymatic amplification of B-globulin genomic sequences and restriction site analyses of sickle cell anemia, Science 230:1350-1354), e tem sido considerada uma das mais poderosas técnicas a utilizada pela biologia molecular. Por esta revolucionária descoberta, o Dr. Mullis recebeu em 1993 o Nobel Prize in Chemistry.

Dentre as importantes aplicações da técnica de PCR, estão a arqueologia, Forence, teste de paternidade, genética, pesquisa biológica e diagnóstico clínico.

O PCR é muito similar, ao princípio de multiplicação natural do DNA, ele é considerado um processo de 3 passos, que é considerado um ciclo, os quais são repetidos várias vezes o quanto for necessário.

A primeira fase é conhecida com desnaturação, na qual consiste em separar as duas helices de DNA em 2 fitas simples. O método utilizado, é a elevação da temperatura do DNA acima de 90°C. Com este processo, as pontes de hidrogênio, que ligam as bases nucleicas, são rompidas.

A segunda fase, chamada de anelação, consite em diminuir a temperatura em torno de 40 à 65°C, dependendo do tipo de primer que esta sendo utilizado, esta temperatura, favorece

a ligação dos primers a sequência de DNA que esta sendo estudada. Uma vez que os primers, se anexam com a sequência complementar de DNA, eleva-se a temperatura a 72 °C. Nesta temperatura, a enzima Taq DNA Polimerase é ativada, iniciando a terceira fase conhecida como extensão.

O Taq DNA Polimerase é um DNA recombinante termoestável, de organismo *Thermus aquaticus*.

O DNA Polimerase inicia o processo de síntese da região marcada pelos primers (inicial e final). Este processo de Desnaturação, Anelamento e Extensão, corresponde a um ciclo. Ao final do primeiro ciclo, existe duas novas fitas de DNA ambas idênticas a original. Cada ciclo, demora cerca de dois a três minutos, e estes podem ser repetidos várias vezes o crescimento a cada ciclo é exponencial ou seja, 2, 4, 8, 12, 32...ao final de vinte ciclos temos milhões de sequências idênticas a inicial. Para ter-mos uma melhor amplificação de uma região determinada do DNA é necessário 30 a 40 ciclos.

A técnica de PCR processada no dia 24 de Janeiro de 2005, teve como objetivo verificar a existência de marcadores genéticos responsáveis pelo marmoreio na carne bovina.

Para tanto utilizou-se como tratamentos animais F1 cruzas (Wagyu X Limosin), sendo utilizado, dois tratamentos e dois grupo controle. O tratamento 1 T1 animais que possuem alto grau de marmoreio na carne, T2 animais que possuem baixo grau de marmoreio na carne, controle positivo animal puro da raça Wagyu com alto grau de marmoreio na carne, e controle negativo água. Para o T1 e T2 utilizou-se um pull de 10 amostras de sangue total dos animais com graus de marmoreio idênticos a cada um dos grupos.

A extração do DNA do sangue total dos animais, foi realizada através da separação das células brancas do sangue e extração do mesmo com a utilização de kits específicos (anexo 2), em um anexo do laboratório para evitar a contaminação.

Em outro anexo do laboratório considerado livre de DNA, preparou-se a seguinte solução:

Tabela 3 - Ingredientes e quantidade para a realização da técnica PCR

Substância	Quantidade
Template 24mg/μl	1 μl
10 x Buffer	1 μl
Dntp 25 mm	0.6 μl
Mgcl 50mm	0.3 μl
Forward primer 50 mm/ml	0.25 μl
Reverse primer 50 mm/ml	0.25 μl
H2O	6.55 μl
Tag (polymerase DNA)	0.05 μl
Total	10 μl

Primers utilizados foram **TNF_FA** CAGTCTCCTACCAGACCAAGGTCAA e **TNF_RA** GGAAGTTCAGTTCAGTCCTTGAT, específicos para fator de necrose tumoral, um possível marcador para marmoreio e gordura subcutânea.

Cabe-se ressaltar da grande importância de calcular empiricamente a quantidade de Mg livre presente na solução, pois não poderá existir excesso e nem falta, pois irá comprometer a análise final dos resultados. Além disso, o MgCl deve ser bem homogenizado antes de ser adicionado na solução.

Retirou-se desta solução de 10 μl preparada, uma alíquota de 9 μl, a qual se adicionou 1μl da amostra de DNA dos animais em estudo.

Após esta preparação as amostras foram gentilmente centrifugadas a 1000RPM por 30 segundos, e foram colocadas no termo ciclador, onde irão ficar até completar 37 ciclos (desnaturação, Anelamento e Extensão). Após isso as amostra poderão ser congeladas a -20 °C para posterior análise ou imediatamente analisadas.

Produção de Gel de agarose 1,6 %, para correr as amostras contendo 0,8 g de agarose e 50 ml de TBE (Tris, ácido bórico e EDTA), coloca-se no microondas, para dissolver a solução por cerca de 30 segundos, após isso, retira-se e deixa repousar por um a dois minutos, acidifica-se então, 1,6 μl de Ethidium Bromate na concentração de 10mg/ml. coloca-se na placa com os pentes, até ficar com uma coloração opaca.

Coloca-se o gel para correr, adiciona-se a cada espaço, uma quantidade de 8 μl da nossa solução preparada, e 1,5 μl de glicerol, para alterar a densidade da amostra, liga-se a máquina a uma voltagem de 140 Watts por 30 min.

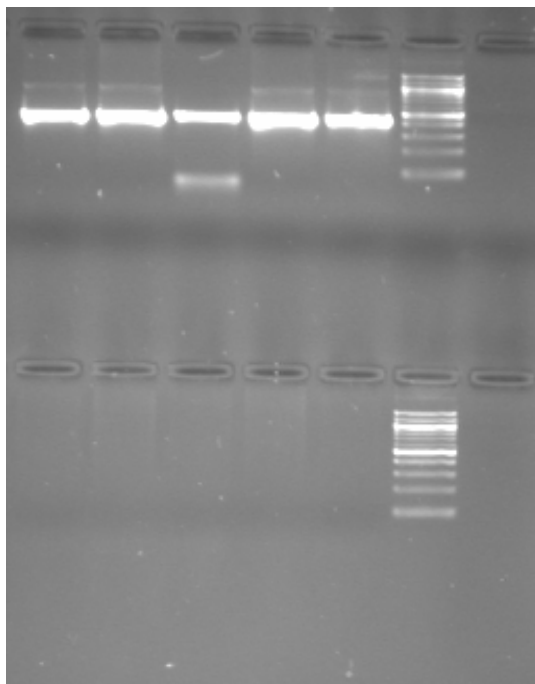


Figura 2 - Resultado placa PCR, identificação de genes responsáveis pelo marmoreio da carne bovina localizados a 100ppb

7.2 RESTRIÇÃO E DIGESTÃO ENZIMÁTICA

Tabela 4 - Componentes e quantidades para a realização da técnica de digestão enzimática

PCR product	3 μ l
10X Buffer	1 μ l
100X BSA	0,1 μ l
Mnl I, 5 u/ μ l	0,2 μ l
H2O	5,7 μ l

Cuidados com a reação:

- Sempre devemos verificar qual é o Buffer, que a enzima terá uma maior atividade. Qual a quantidade mínima de unidades, para digerir o substrato (DNA). Verificar a Temperatura a ser encubada a reação.

- Após seguir todos estes passos, devemos incubar a reação por 2 horas a 37 ° C, enquanto isso, preparamos o gel para a análise em PCR.

- Após este período, colocamos para correr o gel por 50 min a 140 Watts, passado os 50 min, colocamos o gel para revelar

7.3 ISOLAMENTO MITOCONDRIAL ORGÃO FÍGADO DE CAMUNDONGOS

Após a realização da biópsia, neste caso, foi realizado eutanásia em camundongos, e utilizou-se todo os fígados dos animais. Após a coleta, colocou-se órgão, em um recipiente mantido no gelo, juntamente com o Buffer.

Lavou-se o órgão, com este buffer, para retirar o sangue e outras substâncias indesejáveis. Após o enchague, colocou-se novamente os fígados dos ratos, em um buffer, e com o auxílio de uma tesoura, picou-se em pequenos pedaços de aproximadamente 1mm³, na sequência, homogeneizou-se gentilmente as amostras, centrifugou-se as amostras a 1000x g por 10 minutos, a uma temperatura de 5°C. O sobrenadante foi descartado, e limpou-se a gordura que ficou no interior do tudo. Novamente ressuspendemos as amostras, gentilmente homogeneizamos, com o auxílio do Buffer sem BSA. Após isso, lavou-se e centrifugou-se por duas vezes, a 10,000 x g a 5°C por dez minutos, ao final da centrifugação, ressuspendeu-se a solução e manteve ela no gelo para diminuir o metabolismo celular.

Em sequência, foi determinado a concentração de proteína usando o método de Bradford.

No qual consiste em por a nossa amostra em uma placa de teste com 96 buracos, juntamente com os controles padrão e branco.

A necessidade da verificação da quantidade de proteína presente na nossa amostra, é para posteriormente verificar a atividade respiratória mitocondrial.

7.4 MENSURAÇÃO DE NÍVEIS DE CORTISOL EM FEZES DE ONÇAS

Foi efetuado a mensuração dos níveis de cortisol encontrado nas fezes de onças, através do protocolo no anexo 4.

7.5 SÍNTESE DE cDNA

Preparação de cDNA, através de RNA, amostras extraídas da pituitária de ratos, submetidos a imuno castração, orquiectomia e grupo controle (animais intactos) protocolo anexo.

8 PARTICIPAÇÃO EM PROJETOS

8.1 IMUNOESTERILIZAÇÃO DE ANIMAIS COM VACINA CONTRA LhRH

8.1.1 GnRH no sistema

A presença do GNRH no hipotálamo, foi demonstrado em 1960, através de sistemáticas injeções de extrato hipotalâmico em ratos, estimulando a secreção de LH pela hipófise anterior. Porém a sua estrutura somente foi elucidada em 1971, como um decapeptídeo composto por: pyroGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-amide, denominado luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) (MATSUO et al., 1971).

Após certo tempo, começou-se a chamar ele de GnRH, pois verificou-se que este peptídeo, não estimulava somente a liberação de LH, mas também FSH (Hormônio folículo estimulante). O gene responsável pelo GnRH, está localizado nos humanos, no cromossomo número 8. A ação do GnRH, está relacionada diretamente com o seu receptor específico da membrana (GnRH-R). As altas concentrações deste receptor na pituitária, é resultada pelo estágio fisiológico do organismo. Durante o ciclo estral, de ovelhas e vacas, o máximo número destes receptores, podem ser encontrados, logo antes da onda pré-ovulatória, coincidindo assim com o estro e com o pico de LH.

O GnRH, é liberado pelo hipotálamo, e tem ação direta na hipófise anterior dos mamíferos ele estimula a produção de FSH e LH. O GnRH é liberado de modo contínuo no macho e de forma pulsátil, na fêmea, a sua frequência e amplitude variam durante os estágios reprodutivos nas diferentes espécies.

A reprodução dos mamíferos, é controlada por uma cascata de eventos, que começa com a secreção de GnRH pelas células neuronais no hipotálamo que está localizado, na base do cérebro. O hipotálamo, é composto por clusters de células neurosecretórias chamadas de *hypothalamic nuclei* que secretam seus produtos no sistema sanguíneo porta que é conectado ao hipotálamo e a hipófise anterior, ou diretamente na circulação geral depois para pituitária posterior. (McCANN e OJEDA, 1996). Hormônios hipotalâmicos, são considerados liberadores ou inibidores, devido a sua natureza de ação.

Em fêmeas, o FSH, esta relacionado com o crescimento follicular, e o LH com a ovulação. A secreção de FSH em fêmeas, é de modo constante, o mesmo não ocorre com os níveis de secreção de LH, que é liberado em forma pulsátil. Quando o pulso de LH ocorre, coincide com a ovulação nas fêmeas.

Em machos, o FSH, age nas células de sertoli, estimulando a produção de espermatozoides, já o LH estimula as células de leydig a aumentar ou manter os níveis de testosterona dos machos.

A produtividade dos animais, está relacionada à diversos fatores, principalmente os relacionados com a função reprodutiva dos animais como idade de puberdade, maturidade sexual, produção de gametas masculinos e femininos. Em vacas, observa-se geralmente uma única ovulação, em contrapartida, em ovelhas, cabras, dependendo da raça, pode observar uma maior liberação de óvulos, já as fêmeas suínas, são consideradas poliovulatórias.

O processo de recrutamento e desenvolvimento do número de óvulos a serem liberados, são comandados pela secreção de FSH e LH conseqüentemente. Porém recentes estudos, tem demonstrado deficiências nutricionais, possui uma ação direta em nível do ovário, envolvendo, insulina, IGF I e II. Estes efeitos, podem interferir tanto na qualidade do oócito, como a sobrevivência do embrião (DRIANCOURT et al., 1986 e MILLER et al., 1998).

8.1.2 Mecanismo de ação

O sistema imune tem a habilidade de lembrar as infecções passadas, e responder a elas com agressividade e eficiência, quando o organismo entrar em contato novamente com patógeno. Esta memória imunológica, pode ser adquirida por meio de vacinações (KIM e FLAVEL, 2004). A principal função do sistema imune, está em diferenciar o próprio do não

próprio, e responder especificamente contra estas moléculas estranhas ao organismo (SIMPSON, 1984). Própria, descreve substâncias pertencentes e geneticamente normais a estrutura e função do organismo (HUNTER, 1989). As substâncias, identificadas pelo sistema imunológico, como intrusas ou não próprias, são denominadas de antígenos para o sistema immune. Em resposta aos antígenos o organismo, produz anticorpos que irão reagir especificamente com o antígeno (HUNTER, 1989).

A rejeição pelo organismo intruso, é mediado pelo complexo de histocompatibilidade (MHC) (Roitt et al., 1998).

Todos os mamíferos possuem MHC que são expressos na superfície celular (SIMPSON, 1984). Proteínas do complexo de histocompatibilidade, são marcadores específicos do próprio indivíduo (HUNTER, 1989).

Durante o desenvolvimento, células imaturas T são selecionadas, pelas habilidade de interagir com o próprio MHC no processo chamado de seleção positiva (VON BOEHMER, 1994).

Depois de células de antígenos específicos T receptores serem adquiridas, todas as células T que reagirem com os próprios antígenos do organismo, serão eliminadas por apoptose, regulando assim a tolerância própria (NOSSAL, 1994). A imunidade é dependente tanto da imunidade passiva como a imunidade adquirida. A imunidade passiva, compreende barreiras defensivas incluindo anatômicas, fisiológicas, fagocitárias e inflamatórias e é a primeira linha de defesa contra patógenos. A imunidade adquirida, por outro lado possui um alto grau de especificidade bem como de memória. As respostas imunes, são divididas em respostas humoral no qual as células intermediam a resposta (SIMPSON, 1984).

A imunidade humoral refere-se a respostas a anticorpos ou secreção de imunoglobulinas pelos linfócitos B que são carregados pelo corpo através da corrente sanguínea e fluidos corporais (SIMPSON, 1984). Imunidade conferida pelas células, envolve um grupo de respostas mediadas ou iniciadas por sub-populações de células T (HUNTER, 1989). Os linfócitos T são responsáveis por coordenar, a alta especificidade e a última resposta imunológica contra patógenos (FABBRI et al., 2003).

A proteção immune por um período mais prolongado, é mediada pelas células B e T de memória e também os anticorpos produzidos no plasma celular (efeito das células B) (KIM e FLAVELL, 2004). As células T, estimulam as células B a produzirem anticorpos contra o antígeno intruso, outras se transformam em células de memória (MACKAY e VON ANDRIAN, 2001).

As Células T são derivadas da medula óssea e são diferenciadas no timo, onde adquirem a capacidade de distinguir do próprio do não próprio (FABBRI et al., 2003). Os receptores das células T, funcionam pelo reconhecimento dos antígenos apresentados e peptídeos processados, que estão localizados no MHC, que é expresso nos antígenos presentes no plasma da membrana celular (VIRET e JANEWAY, 1999). As células T com marcadores de membrana CD4, possuem a função de gerar e manter a regulação da defesa humoral e celular (FLAVELL, 1999). Um dos ajudantes da defesa imune celular, são definidos como T helper (Th), eles são divididos, em dois grupos associados com o padrão das citocinas, e associados a sua função (Th1 e Th2) (Sallusto et al., 1998). Os Th1 secretam interleucina 2 (IL-2) e interferon-(IFN) e estão relacionados a reações inflamatórias mediadas por células, enquanto que os Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 e são mais efetivas estimulando B células (COX e COULTER, 1997; SINGH e O'HAGAN, 1999). Adjuvantes também são capazes de aumentar a resposta dos Th.

Adjuvante é qualquer substância que age para acelerar, prolongar ou aumentar a qualidade da resposta imune a vacinações (VOGEL, 2000).

O uso de adjuvantes para aumentar a eficiência das vacinas, foi descrito primeiramente por Ramon em (1925). Em 1937, Freund desenvolveu, o mais efetivo adjuvante conhecido até hoje, Freund's adjuvant. Adjuvante completo de Freund's, e composto por água em óleo mineral adjuvante, que combina imunostimulatória propriedades com *Mycobacterium tuberculosis* (COX e COULTER, 1997; VOGEL, 2000). Este adjuvante, gera boas respostas de Th1 e Th2 (COX e COULTER, 1997).

8.1.3 Vacinação

Vacinação contra LHRH, tem sido estudada bastante nos últimos anos, pelo grande potencial de suprir com o ciclo reprodutivo dos animais por completo (Melo, 1995). O problema com o uso de antígenos endógenos próprios, como LHRH, é por ele ser pouco imunogênico, (Reeves et al., 1989).

Adams e Adams (1986) notaram que a imunização ativa contra LHRH, serviu como um método de introduzir uma barreira imunológica entre o Hipotálamo e a pituitária anterior, que mais especificamente, neutraliza LhRH na vasculature porta hipotálamo-hipofiseal. Em 1973, Arimura descreveu a utilização de LHRH conjugado com BSA (Bovine Serum

Albumin) inativou a função gonadal de coelhos, causando atrofia das mesmas. Após este trabalho, muitos outros demonstraram além disso, a inibição da gametogênese e bloqueio do comportamento reprodutivo de muitas espécies mamíferas (Schanbacher et al., 1983; Adams and Adams, 1986; Falvo et al., 1986).

Vacinas quimicamente conjugadas não possuem moléculas previsíveis e similares estruturas entre a produção, uma alternativa para contornar este problema, foi o desenvolvimento do uso de fusão de proteínas na vacina. A fusão de proteínas é processada primeiramente selecionando o gene específico que carrega a proteína em questão que possa gerar uma forte resposta a produção de anticorpos (Margalit et al., 1987).

Em 1995, Van der Zee e colegas, construíram um sistema que consiste em um Plasmídeo fimbriae da E.coli, composta por repetitivas sequências de LHRH. O LHRH foi inserido, em uma região denominada P-fimbriae da E.Coli com técnicas de DNA recombinante. Sem afetar a formação das fimbrias, podendo apresentar vantagens para a imunogenicidade (Broeckhuysen et al., 1987). Esta vacina mostrou-se ser efetiva, induzindo a produção de alta titulação contra LHRH e suprimindo o crescimento testicular em terneiros (van der Zee et al., 1995). Camundongas, tratadas com vacina de LHRH recombinante demonstraram ter alta titulação de anticorpos contra LHRH, além da supressão do ciclo estral (van der Zee et al., 1995). Zhang et al. (1999) usou 50 µg de ovalbumina proteína com sete sequências de LHRH (ovalbumin LHRH-7) observando bons resultados, em diminuição do peso do aparelho reprodutivo de ratas, como resposta biológica, e produção de altos níveis de anticorpos contra LHRH.

8.2 TESTE DA VACINA LHRH, DE IMUNO ESTERILIZAÇÃO EM RATAS

Coleta de sangue de ratos através da venopunção da veia safena dos ratos, aproximadamente (0,5ml/sng/animal) em intervalos de 21 dias. Centrifugação e separação do soro do sangue dos animais, para posterior análise de produção de anticorpos anti LHRH através do gama counter (protocolo em anexo).

Gupos dos animais

Projeto ratos I

CpG é uma sequência de aminoácidos, que está presente em mamíferos e bactérias, só que nos mamíferos, tem a presença do grupo methyl e em bactérias não, ou seja quando um mamífero for exposto ao CpG bacteriano, começará a produzir anticorpos contra eles. Dependendo do animal, este CpG possui uma sequência específica.

DNA genômico bacteriano, e outros DNA de procariontes e protozoários, estimulam, o sistema imune dos vertebrados (KRIEG et al., 1995; BRONW et al., 1998).

Este estímulo no sistema imune não é causado pela expressão dos produtos das proteínas bacterianas, endotoxinas, exotoxinas, as é dependente da sequência de DNA e de sequências contendo CpG. Esta sequência de CpG, é caracterizada por uma sequência hexanucleoide. Esta sequência é representada no genoma dos vertebrados, e quando presente ela é normalmente vem com o grupo methyl (5'-methylcytosine) o que distingue do GpG bacteriano que não apresenta este grupo methyl. O sistema imune dos vertebrados, reconhecem, como o CpG bacteriano como sendo estranho para o organismo, o que causa a resposta imune (PISETSKY, 1999; WAGNER, 1999).

A tecnologia do CpG ODN é muito promissora, pelo seu potencial de tratamento profilático como antibacteriano, antiviral, antifúngico e antiparasitário. Além disso, o CpG ODNs poderá ser utilizado, para a estimulação do sistema imune não específico, como adjuvante para vacinas com proteínas, ou ácido nucléico, na imunoterapia de câncer, redirecionado respostas alérgicas ao Th-2 para respostas imunes de Th-1, e pelo aumento da imunidade das mucosas (KRIEG; KRIEG e KRIEG; WAGNER, 1999).

Hipóteses

1. Diálise e ou liofilização da solução com a proteína não altera a imunogenicidade da mesma.
2. CpG é imunogenico quanto mFreund's (modificado).
3. Adição do solvente (methylene chloride – solvente 1 ou ethyl acetate – solvente 2) não afeta a imunogenicidade da proteína

Desenho experimental

Grupos de Tratamentos: (n = 6 ratos por grupo)

1. Proteína e ureia + mFreund's
2. Proteína dializada e liofilizada + mFreund's

3. Proteína dializada e liofilizada + solvente 1 + mFreund's
4. Proteína dializada e liofilizada + solvente 2 + mFreund's
5. Proteína e ureia + CpG
6. Proteína dializada e liofilizada + CpG
7. Proteína dializada e liofilizada + solvente 1 + CpG
8. Proteína dializada e liofilizada + solvente 2 + CpG
9. Grupo controle sem tratamento

Coleta de sangue de ratos (Safena)

Coletou-se sangue dos ratos, em intervalos de 21 dias, para verificar a produção de anticorpos contra LhRH

Tabela 5 - Coleta de sangue de ratos (Participação em projeto)

	0 dias	21 dias	42 dias	63 dias	84 dias	105 dias
Ratos	63	63	63	63	63	63

Resultados - Protocolo da mensuração dos níveis de anticorpos, Anexo 3

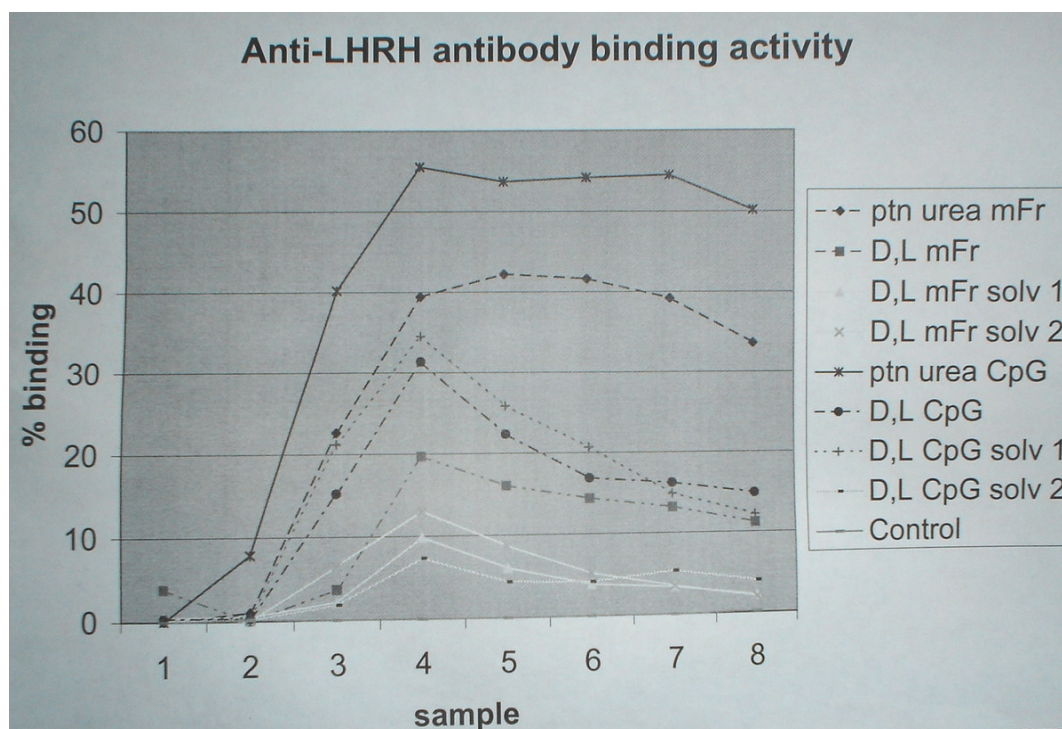


Figura 3 - Resultados experimento Ratos

Sacrifício dos animais, para coleta e pesagem do aparelho reprodutivo, para verificar se ocorreu alteração como atrofia nos animais submetidos aos diferentes tratamentos.

8.3 TESTE DA VACINA DE LHRH EM NOVILHAS

Coleta de sangue de bovinos (coccigeas):

A coleta de sangue dos bovinos, eram realizados em intervalos semanais, para verificar os níveis hormonais de progesterona, e quantidade de anticorpos formados contra LhRH.

Tabela 6 - Coletas de sangue de novilhas efetuadas pelo acadêmico no período do seu estágio (Participação em projeto)

	1º semana	2º semana	3º semana	4º semana	5º semana	6º semana
Número de novilhas	60	60	60	60	60	60

As novilhas, que apresentaram prenhez, foi administrado uma dose de 25mg de PGF $_{2\alpha}$ a por via IM, para elas abortarem, pois as mesmas estão no projeto de dose resposta a administração da vacina contra LHRH.

Após a quinta coleta, foi realizado a mensuração dos níveis de progesterona em todas as coletas de sangue das novilhas, para verificar se elas estavam ciclando ou não, para podermos separar igualmente nos grupos de tratamento. Os níveis de progesterona, foram mensurados em todas as amostras de sangue dos animais, em duplicatas, gerando no final um total de de 600 amostras analisadas. O método utilizado para a mensuração dos níveis plasmáticos de progesterona, foi através da técnica de radio imunensaio. Das 60 novilhas, 15 delas, apresentaram-se ciclando, e as outras 45 fêmeas, demonstraram estar aciclicas com níveis de P4 inferiores a 1 ng/mL

9 PRODUÇÃO DA VACINA LHRH

Primeiramente, efetuou-se a cultura de *E. coli* inoculada com o plasmideo (pyz24-6) em placas com gel de LB agar. Manteve-se a cultura por 24 horas em uma estufa de CO₂ a uma temperatura de 37° C. Inocula-se uma cultura individual, da placa em 50 ml do meio Trypton Phosphate com glucose e Kanamicin (antibiótico).

Após 24 horas, adiciona-se a cultura starter em 1000 ml do meio de Trypton Phosphate 1 mais o antibiótico (Kanamicin) e glucose. Verifica-se as amostras através da espectofotometria, quando o valor estiver entre 0,4 a 0,6nm de absorbância, induz a produção da proteína com IPTG.

Após 5 horas da indução, centrifuga as amostras a 5000g (4200RPM) por 10min retira-se o meio, deixando somente a cultura de bactérias no fundo do vidro, ressuspende-se com 10 a 20 ml de Buffer A(100mM NaH₂PO₄[13.8g NaH₂PO₄], 10mM Tris-Cl[1,2 g Tris base] Sempre mantendo as amostra no gelo, levou-se elas para o sornicador, aproximadamente 6 min/amostra(aparelho, que produz ondas sonoras, com a finalidade de romper as células e liberar a proteína). Adiciona-se lisoenzima para facilitar a ruptura das células, deixar a 30 ° C por 30 minutos. Sornicar as amostras por 6 min cada uma, após isso, balancear as amostras, para centrifugar. Despresar o sobrenadante, e ressuspender as amostras com Buffer A. Deve-se repetir este procedimento por várias vezes. Após isso, centrifugasse as amostras, e despreza-se o sobrenadante e adiciona-se Guanidine Buffer, neste momento deve-se levar em conta o Ph da solução, que deverá ser 8,0, este poderá ser ajustado, usando NaOH. Homogeniza-se as amostras e centrifuga elas, o sobrenadante retirado após a centrifugação, é filtrado com um filtro de 0,45µm.

9.1 PURIFICAÇÃO DA VACINA

Coloca-se em uma coluna, aproximadamente até a metade dela, Ni-NTA agarose (composto com níquel). O níquel, tem a propriedade de se ligar a nossa proteína, devido ela ter Tag-histidina.

Primeiramente deve passar o Guanidine Buffer na coluna com um Ph de 8,0, para ajustar ao Ph da coluna. Passa-se a proteína pela coluna, depois deve-se novamente passar Guanidine Buffer Ph 8,0 para fazer a lavagem das substâncias indesejadas. Deve-se reduzir gradualmente o Ph do Buffer, começando com 6,3, 5,9, até chegar no 4,1.

Quando diminuirmos o Ph a 4,1 devemos estar preparados para coletar nossa proteína, pois o baixo Ph do buffer, faz com que as pontes de ligação entre a nossa proteína e o níquel sejam quebradas, liberando somente ela. O momento em que a nossa proteína começa a sair, é conhecido devido a uma solução pré preparada de 4x água bi destilada e 1x de Bio-Rad Protein assay. Desse preparo, coloca-se 500µL e 10 µL da nossa vacina purificada, quando a cor passar a ser azul, significa que é a nossa proteína que esta sendo liberada.

Para medir a concentração do LhRH presente em nossa vacina já purificada, primeiramente, deve-se marcar todos em que está a nossa vacina(50 ml) (1,2,3,4....), após isso, marca-se em tubos de ensaio (5ml), os mesmos números que foram colocados no recipiente onde estava a nossa vacina. Nestes tubos, adiciona-se, 200µl de Buffer, e 200µl da nossa vacina diluição 1:1 deve ser marcada também nos tubos de ensaio. Após isso, marca-se em outros tubos, e adiciona 200 µl da nossa vacina em diluição 1:1 e 200 µl de Buffer.

Em uma placa de elisa, coloca-se em cada buraco dela, 200 µl de reagente de ensaio para proteína 1:50 (reagente B: reagente A). Nós fizemos, 14 ml de reagente A e 0,280 de reagente B.

Reagent A = BCA Protein Assay Reagent A (Pierce, prod # 23224)

Reagent B = BCA Protein Assay Reagent B (Pierce, prod # 23228)

Standard preparation:

Standard solution = 2 mg/ml

Add:		standard solution (µl)	buffer (µl)
Standard	A	150	50
	B	100	100

C	50	150
D	25	175

Tampar a placa, e colocar-la no vortex por 30 segundos, após isso, incubar a 37° C por 30 minutos e esta pronto para a leitura em elisa.

9.2 DIÁLISE

Sobstituição do meio de Guanidine da proteina por Ureia.

Colocar a nossa proteina diluida em meio de guanidine, dentro de um K7 volume máximo dwe 12 mL. Após isso, imergir estes K7 com a nossa proteina em meio de Ureia 6M trocar o meio 5 vezes em intervalos de 5 horas.

CONCLUSÃO

O estágio curricular supervisionado em Medicina Veterinária, com ênfase em endocrinologia da reprodução animal, proporcionou a oportunidade de adquirir uma nova experiência e visão, além de aprimorar e completar os conhecimentos que foram adquiridos durante o curso de Medicina Veterinária.

Durante o período do estágio, acompanhei a rotina laboratorial, bem como a inserção na área de pesquisa. A cada dia que passava mais mais ficava fascinado com a pesquisa e impolgado para a visualização dos resultados.

Conclui-se que o estágio curricular supervisionado em Medicina Veterinária na área de endocrinologia da reprodução animal, chega ao final superando os objetivos propostos, principalmente por ter aberto novas oportunidades para seguir a minha futura carreira profissional e continuação dos meus estudos acadêmicos com o desenvolvimento de um futuro mestrado.

O estágio curricular, foi também o primeiro passo de separação dos acadêmicos do ambiente escolar, a que estávamos acostumado para a “vida real”, o futuro mercado de trabalho. O contato inicial com a carreira de pesquisador, fez com que aprende, que muitas vezes, os resultados desejados, não são aqueles que acabamos tendo, porém nunca deve-se desistir, sempre devemos continuar tentando, nunca abandonando as nossas metas. Para a pesquisa, paciência é a ciência, a base adquirida no Curso de Medicina Veterinária, na Universidade de Passo Fundo, está sendo muito importante para o meu futuro profissional.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, T.E.; ADAMS, B.E. 1986. Gonadotrope function in ovariectomized ewes actively immunized against gonadotropin-releasing hormone (GnRH). *Biol. Reprod.* 35: 360-367.
- ARIMURA, A. et al. 1973. Production of antiserum to LH-releasing hormone (LHRH) associated with gonadal atrophy in rabbits: Development of radioimmunoassays for LHRH. *Endocrinology* 93:1092-1103.
- BROECKHUYSEN, M.P. et al. 1987. Fusion proteins with multiple copies of the major antigenic determinant of Foot-and-Mouth disease virus protect both the natural host and laboratory animals. *J. Gen. Virol.* 68:31-37.
- BROWN, W.C. et al. 1998. DNA and a CpG oligonucleotide derived from *Babesia bovis* are mitogenic for bovine B-cells. *Infect. Immunol.* 66, pp. 5423–5432
- CLAYTON, P.; LOYD, B., 1984. Cost to the packer. In: *Proceedings of the Academy of Veterinary Consultants*, pp. 28–43.
- COX, J.C.; COULTER, A.R. 1997. Adjuvants - a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 15:248-256.
- DISKIN, M.G, et al. Controlled breeding systems for dairy cows. In: Diskin MG, editor. *BSAS Occasional Publication* No. 26, Vol. 1. BSAS, Edinburgh 2001. p. 175–93.
- DRIANCOURT, M.A. et al. Variations in patterns of follicle development in prolific breeds of sheep. *J. Reprod. Fertil.* 78, 1986, pp. 565–575. Abstract-EMBASE | Abstract-MEDLINE
- EDWARDS, A.J.; LAUDERT, S. B. Economic evaluation of the use of feedlot abortifacients. *Bovine Pract.* 19 (1984), pp. 148–150
- FALVO, R.E. et al. 1986. Effect of active immunization against LHRH or LH in boars: Reproductive consequences and performance traits. *J. Anim. Sci.* 63:986-994.
- FABBRI, M. et al. 2003. T lymphocytes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 35:1004-1008.

- FLAVELL, R.A. 1999. The molecular basis of T cell differentiation. *Immunologic Research* 19:159-168.
- FREEMAN, M. E. The ovarian cycle of the rat. In: *The Physiology of Reproduction*. Ed. E. Knobil and J. Neil *et al.* Raven Presss, NY.,45: 613-657, 1994.
- FREUND, J. J. et al. 1937. Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and paraffin oil. *Proc Soc. Exp. Biol. Med.* 37:509-513.
- GORSKI, R.A. Sexual Differentiation of the nervous system. In: KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. *Principles of Neural Science*. New York, MacGraw-Hill, 2000, p. 1131-1146.
- HAFEZ, E.S.E. *Reprodução dos animais domésticos*. 6 ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 726p. 1996.
- HUNTER, A.G. 1989. Immunology and fertility in the bovine. *J. Dairy Sci.* 72:3353-3362.
- JIM, G.K. et al, The relative economics of feeding open, aborted, and pregnant feedlot heifers. *Can. Vet. J.* 32 (1991), pp. 613–617.
- JIM, G.K., et al. The relative economics of feeding open, aborted, and pregnant feedlot heifers. *Can. Vet. J.* 1991, 32, 613–617.
- KIM, S.V.; FLAVELL, R.A. 2004. CD8 $\alpha\beta$ and T cell memory. *Science*. 304:529-530.
- KRIEG, A.M. et al. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374, pp. 546–549
- KRIEG, A.M., 1996. An innate immune defense mechanism based on the recognition of CpG motifs in microbial DNA. *J. Lab. Clin. Med.* 128, pp. 128–133.
- KRIEG, A.M. et al. 1996. Oligodeoxynucleotide modifications determine the magnitude of B-cell stimulation by CpG motifs. *Antisense Nucl. Acid Drug Dev.* 6, pp. 133–139.
- KRIEG, A.M. et al 1999. Mechanisms and therapeutic applications of immune stimulatory CpG DNA. *Pharmacol. Ther.* 84, pp. 113–120.
- LATRONICO, A.C; SEGALOFF, D. Naturally occurring mutations of the luteinizing-hormone receptor: Lessons learned about reproductive physiology and G protein-coupled receptors. *Am J Hum Genet.* 1999; 65:949-58.
- LAUDERDALE, J.W. et al. Fertility of cattle following PGF_{2 α} injection. *J. Anim. Sci.* 38 (1974), pp. 964–967. Abstract-MEDLINE
- MARILYN, J. et al. An economic risk assessment of the management of pregnant feedlot heifers in the USA. *Preventive Veterinary Medicine* 59 (2003) 207–222
- MATSUO, A. et al. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Commun.* 1971, 43:1334-1339.

McCANN, S.M.; OJEDA, S.R. The anterior pituitary and hypothalamus. In: *Textbook of endocrinology*. 1996, p. 101-133. Oxford University Press, New York, New York.

MACKAY, C.R.; VON ANDRIAN, U.H. Memory T cells – Local heroes in the struggle for immunity. *Science* 1 March 2001 (10.1126/science.1058867).

MACMILLAN, K.L.; DAY A. M. Prostaglandin F_{2α}-fertility drug in dairy cattle. *Theriogenology* 18 (1982), pp. 245–253. Abstract

MARGALIT, J.L. et al, 1987. Prediction of immunodeterminant helper T cell antigenic sites from the primary source. *J. Immunol.* 138:2213-2229.

MELOEN, R.H. 1995. Basic aspects of immunomodulation through active immunization. *Livest. Prod. Sci.* 42:135-145.

MILLER, A.T. et al. Follicle dynamics and aromatase activity in high-ovulating Meishan sows and in Large-White hybrid contemporaries. *Biol. Reprod.* 58, 1998, pp. 1372–1378. Abstract-MEDLINE | Abstract-Elsevier BIOBASE | Abstract-EMBASE | Full Text via CrossRef

MINEGISHI, T. et al. Cloning and sequencing of human LH/hCG receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Comm*, 1990;172:1049-54.

NOSSAL, G.J. 1994. Negative selection of lymphocytes. *Cell* 76:229-239.

ODDE, K.J. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. *J. Anim. Sci.* 68 (1990), pp. 817–830. Abstract-MEDLINE

PISETSKY, D.S., 1999. The influence of base sequence on the immunostimulatory properties of DNA. *Immunol. Res.* 19, pp. 35–46.

RAMON, G. 1925. Sur l'augmentation anormale de l'antitoxine chez les chevaux producteurs de serum antidiphtérique. *Bull Soc Centr Med Vet.* 101:227-234.

REEVES, J.J. et al. 1989. Vaccines against endogenous hormones: A possible future tool in animal production. *J. Dairy Sci.* 72:3363-3371.

SALLUSTO, F., A. et al. 1998. Chemokines and chemokine receptors in T cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunology Today* 9:568-574.

SAVIO, J.D. et al. Will the first dominant follicle of the estrous cycle of heifers ovulate following luteolysis on day 7? *Theriogenology* 1990;33:677–87.

SCHANBACHER, B.D. et al. 1983. Animal model of isolated gonadotropin deficiency. I. Hormone responses to LHRH immunoneutralization. *J. Androl.* 4:233.

SIMPSON, E. 1984. The cellular basis of the immune response. In: *Immunological aspects of reproduction in mammals*. p. 1 D.B. Crighton, Butterworths, London, England.

SINGH, M.; O'HAGAN, D. 1999. Advances in vaccine adjuvants. *Nature Biotechnology* 17:1075-1081.

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões*. 3.ed., 1999. 180p.

VAN DER ZEE, A. et al. 1995. P-fimbriae of *Escherichia coli* as carriers for gonadotropin releasing hormone: development of a recombinant contraceptive vaccine. *Vaccine* 13:753-758.

VIRET, C.; JANWAY JR., C.A. MHC and T cell development. *Review of Immunogenetics*, 1999, 1:91-104.

VOGEL, F.R. 2000. Improving vaccine performance with adjuvants. *Clinical Infectious Diseases* 30 (Suppl. 3) S266-S270.

VON BOEHMER, H. 1997. Positive selection of lymphocytes. *Cell* 76:219-228.

WAGNER, H., 1999. Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger. *Adv. Immunol.* 73, pp. 329-368.

ZHANG, Y. et al. 1999. Development of recombinant ovalbumin-luteinizing hormone releasing hormone as a potential sterilization vaccine. *Vaccine* 17:2185-2191.

ANEXOS

ANEXO 1 - TRYPTON PHOSPHATE MEDIA

Para 50 ml de trypton Phosphate media

	Para 50 ml	Para 1000 ml
1) Tryptone	1g	20 g
2) Bacteria yeast extract	0,75g	15 g
3) Nacl	0,4 g	8 g
4) H2O	37,5 ml	750 ml

Autoclave and cool to 50 ° C

5) Adicionar Fosfato de sal

	Para 50 ml	Para 1000ml
KH ₂ PO ₄	0,05 g	1 g
g Na ₂ HPO ₄	0,1 g	2 g
H ₂ O	10 ml	200 ml

Autoclavar a uma temperature de 121 ° C por 15 min e resfriar a 50 ° C

Após resfriadom adicionar 1-4 + 5 juntos.

Adidicionar o 6 – 7 antes da cultura de bactérias

6) Glucose

	Para 50 ml	Para 1000 ml
Glucose	0,1 g	2 g
H ₂ O	2ml	40 ml

Filtrar com filtro de 22µm

7) Antibiótico

	Para 50 ml	Para 1000ml
Kanamicine Sulfate	0,05 ml a [] de 50 mg/L	1 ml a [] de 50mg/L

ANEXO 2 - EXTRAÇÃO DE DNA

GENELUTE MAMMALIAN GENOMIC DNA KIT

Cultured Cells or Tissue



1 Release DNA from cultured cells, tissues (including rodent tails), fresh whole blood or white blood cells

A. Cultured cells

- Pellet up to 5×10^6 cells. Discard medium.
- Resuspend cells in 200 μ l resuspension solution.
- Optional: Add 20 μ l RNase. Mix & incubate at RT 2 min.
- Add 20 μ l Proteinase K & 200 μ l lysis solution to cell suspension. Vortex or pipet to mix.
- Incubate at 70 °C, 10 min. Proceed to section 2.

B. Mammalian Tissues

- Mince up to 25 mg tissue on ice. Transfer to 1.5-2 ml microcentrifuge tube.
- Add 180 μ l lysis solution for tissue & 20 μ l Proteinase K. Vortex or invert to mix.
- Incubate at 55 °C until fully digested (2-4 h)
- Optional: Add 20 μ l RNase. Mix & incubate at RT 2 min.
- Add 200 μ l lysis solution. Vortex or pipet to mix. Incubate at 70 °C, 10 min. Proceed to section 2.

C. Rodent tails

- Cut two (mouse) or one (rat) 0.5-0.6 cm pieces from tip of tail on ice. Transfer to 1.5-2 ml microcentrifuge tube.
- Add 180 μ l Lysis Solution for Tissue & 20 μ l Proteinase K. Mix by vortexing. Ensure that tail is fully submerged.
- Incubate at 55°C until fully digested (3-6 h). Vortex briefly.
- Optional: Add 20 μ l RNase. Mix & incubate at RT 2 min.
- Add 200 μ l Lysis Solution; do not mix. Immediately proceed to section 2.

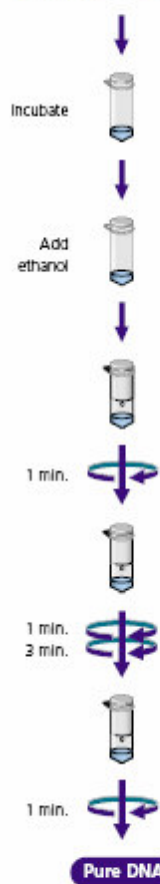
D. Fresh whole blood

- Collect whole blood in an anticoagulant tube & equilibrate to RT.
- Place 20 μ l of Proteinase K in a 1.5 ml microcentrifuge tube. Add up to 200 μ l of whole blood (or blood + Resuspension Solution to 200 μ l).
- Optional: Add 20 μ l RNase. Mix & incubate at RT 2 min.
- Add 200 μ l of Lysis Solution. Vortex or pipet to mix.
- Incubate at 55°C, 10 min. Proceed to section 2.



GENELUTE MAMMALIAN GENOMIC DNA KIT

Cultured Cells or Tissue



1 Release DNA from cultured cells, tissues (including rodent tails), fresh whole blood or white blood cells (continued)

E. White blood cells (WBC)

- Prepare WBCs from 500 μ l of whole blood/prep. See Appendix in Technical Bulletin for an ammonium chloride lysis procedure.
- Resuspend pellet thoroughly in 200 μ l of Resuspension Solution. Add 20 μ l of Proteinase K & vortex briefly.
- Optional: Add 20 μ l RNase. Mix & incubate at RT 2 min.
- Add 200 μ l of Lysis Solution. Vortex or pipet to mix.
- Incubate at 55°C, 10 min. Proceed to section 2.

2 Bind DNA to column

- Add 200 μ l ethanol. Vortex or invert to mix.
- Transfer to binding column. Spin at $\geq 6,500 \times g$ 1 min.

3 Wash to remove contaminants

- Transfer column to new collection tube. Add 500 μ l Wash Solution to column. Spin at $\geq 6,500 \times g$ 1 min. **Note: Ethanol must be added to Wash Solution concentrate before first use.**
- Transfer column to new collection tube. Add second 500 μ l Wash Solution to column.
- Spin at $\geq 12,000 \times g$ for 3 min. to dry column.

4 Elute purified DNA

- Transfer column to new collection tube.
- Add 200 μ l Elution Solution. Spin at $\geq 6,500 \times g$ 1 min.
- Optional: Repeat elution in same or new tube.



ANEXO 3 - ANTI-LHRH ANTIBODY BINDING TEST

Dilute Samples

1:100 dil.: 990 μ L with PBS-EDTA, 10 μ L serum (vortex before transferring)

1:1000 dil.: 900 μ L with PBS-EDTA, 100 μ L of 1:100 diluted serum (vortex before transferring)

Prepare Assay Tubes (in duplicates)

Plus: Total Count (TC), Non-Specific Binding (NSB), Control Samples.

Transfer 500 μ L PBS-Gel to each tube except TC's.

Transfer 200 μ L diluted serum to proper tubes.

Adding the label:

Get 2 paper cups

Mix 1 part PBS Gel with 9 parts (plain) PBS

Thaw Normal Mouse Serum (NMS) in warm water

Mix 1 part NMS with 200 parts of diluted PBS Gel

250 μ L of NMS + 50 mL diluted PBS Gel

Add X μ L of label to cup (depends on the counts, so that it gives 12,000 cpm per 100 μ L)

Mix well (from cup to cup)

Transfer 100 μ L of the mix to a glass tube and count to check if the label was diluted correctly.

Add 100 μ L of the mix per tube using repeater pipette to all tubes including TC's

Shake rack by hand

Incubate in the cold room for 3 days

Adding the second antibody:

Use a 10-ml tip for the repeater pipette

Dilute second antibody 1:20 in plain PBS (5 ml second antibody [sheep anti-mouse antibody] plus 95 ml plain PBS)

Deliver 200 μ l of secondary antibody to all tubes except TC's

Incubate for 30 min

Adding PEG:

Add PEG 15% (150 g PEG/1 L plain PBS, well dissolved)

Add 1 mL of PEG solution to all tubes except TC's.

Vortex well for 3 min

Incubate for 20 min (room temperature)

Centrifuge at 3,000 rpm for 20 min

Decant

Count (gamma counter).

ANEXO 4 - CORTISOL EXTRACTION PROTOCOL

Transfer ~ 0.2 g of fine powered, freeze-dried, homogenized fecal sample to glass tubes

Add 3.0 ml ethanol (90% v/v)

Vortex individual tubes for 10 s

Shake (200 rpm) in rack shaker for 6 h

Vortex multiple tubes for 30 min

Centrifuge tubes at 500 x g for 20 min

Collect supernatant into long glass tubes

Re-suspend pellet in 2.0 mL of 90% ethanol

Vortex (individually) for 15 sec

Re-centrifuge

Combine both supernatants

Transferred desired amount of extract to assay tubes in duplicate

Perform RIA's according to manufacturer's instructions (count in gamma counter)

Calculate ng of hormone/g dry feces

If performing Recovery Test (Extraction Efficiency):

Spike samples with known amount of ³H-hormone (tritiated hormone).

ANEXO 5 - SÍNTESE DE cDNA

Amostras de RNA, extraídas da pituitária de ratos, submetidos a 2 tratamentos e um grupo controle (iminucastração, orquiectomia e intactos)

Uma alíquota de 5 µg de RNA, adicionar, água livre de RNA, até atingir o volume de 4µL.

Aquecer as amostras na máquina de PCR por 5 min. a uma temperatura de 90°C, depois disso manter as amostras no gelo.

Adicionar a cada solução uma alíquota de 1 µl de oligo(dT) 12-18, e a quantidade necessária de água livre de RNA até completar 12 µL.

Miturar e centrifugar rapidamente.

Aquecer a 70 ° C por 10 min e manter no gelo após.

Adicionar para cada amostra

4µL de 5X reaction Buffer

2µL de M DTT

1µL de Mixed dNTP

1µL de M-MLV RT (enzima)

Colocar na máquina de PCR e deixar incubando por 37°C por uma hora, aquecer por 5 min a 95°C para desativar a enzima.

ANEXO 6 - REAÇÃO DE PCR PARA cDNA

Preparar o Gel de PCR a 1% de agarose

1g de agarose e 100mL de TAE Buffer

Aquecer no microondas por 1:30 min

Adicionar 5 µL de gel star (é mais sencível e menos tóxico que o ethidium bromeid)

Mix para reação de PCR

5,0 µL de 10X buffer

4,5 µL MgCl₂

1,0 µL F primer

1,0 µL R primer

0,3 µL Tag

37,2 µL água

1 µL do cDNA

Colocar uma gota de oleo

Primers utilizados

Nome: rCyclinD2-731F

Sequência: CCTGCCAGGAGCAAATCG

Nome: rCyclinD2-790R

Sequência: GCTCTTGACGGAACTGCTGAA

Nome: rAnnexin5-526F

Sequência: TCCTCCTTCAGGCCAATAGAGA

Nome: rAnnexin5-588R

Sequência: CATCCAGTTCAACTTGAGCATCA

Nome: rFSHb-197F

Sequência: CCCAGAAAGTATGCACCTTCAAG

Nome: rFSHb-258R

Sequência: GGCACAGCCAGGCAATCTTA

Colocar na máquina de PCR por 25 ciclos

Colocar no gel 10 μ L da nossa solução mais 2 μ L de Loading Buffer e correr por 35 min. a 150 wattz.

ANEXO 7 - UREA BUFFER

Para 1 litro

100mM NaH₂PO₄ 13.8 G (MW 137,99 g/mol)

10mM Tris-Cl base 1.5616 (MW 157.60 g/mol)

6M Urea 360.36g (MW 60.06 g/mol)

ANEXO 8 - GUANIDINE BUFFER

Para 1 Litro

100mM NaH₂PO₄ 13.8 G (MW 137,99 g/mol)

10mM Tris-Cl base 1.5616 (MW 157.60 g/mol)

6.5M GuHCl 620.75g Guanidine hydrochloride

ANEXO 9 - REAL TIME PCR

12.5 μ L Super Mix com SYBR Green

1 μ L cDNA na diluição de 1:5

1,0 μ L F primer

1,0 μ L R primer

9.5 μ L água

Usar placa específica para Real Time PCR, colocar correr no aparelho por 2 horas.