



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM REPRODUÇÃO ANIMAL NA  
AMAZÔNIA**

**ROBERTA DE ARAÚJO SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DO  
RECEPTOR DE FSH EM ÉGUAS DA RAÇA QUARTO DE MILHA**

**BELÉM 2022**

**ROBERTA DE ARAÚJO SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DO  
RECEPTOR DE FSH EM ÉGUAS DA RAÇA QUARTO DE MILHA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal na Amazônia da Universidade Federal Rural da Amazônia, como requisito para obtenção do título de mestre.

Área de Concentração: Genética Animal.  
Orientador: Dr. Ednaldo da Silva Filho.

**BELÉM 2022**

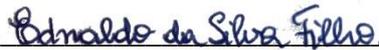
**ROBERTA DE ARAÚJO SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DO  
RECEPTOR DE FSH EM ÉGUAS DA RAÇA QUARTO DE MILHA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal na Amazônia da Universidade Federal Rural da Amazônia, como requisito para obtenção do título de mestre. Orientador: Dr. Ednaldo da Silva Filho.

**Aprovado em Janeiro de 2022.**

**BANCA EXAMINADORA:**



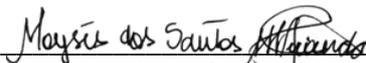
---

**Prof Dr. Ednaldo da Silva Filho**  
**Orientador**  
**Universidade Federal Rural da Amazônia**



---

**Prof Dr. Igor Hamoy Guerreiro**  
**Universidade Federal Rural da Amazônia**



---

**Prof Dr. Moyses dos Santos Miranda**  
**Universidade Federal do Pará**



---

**Prof<sup>a</sup> Dra. Elizabeth Machado Barbosa**  
**Universidade Federal do Amapá**

Dados Internacionais de Catalogação na  
Publicação (CIP) Bibliotecas da  
Universidade Federal Rural da  
Amazônia

Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S586c Silva, Roberta de Araújo  
CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DO  
RECEPTOR DE FSH  
EM ÉGUAS DA RAÇA QUARTO DE MILHA / Roberta de Araújo Silva, Ednaldo Silva  
Filho. - 2022.  
48 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) - Programa de PÓS-GRADUAÇÃO em Reprodução Animal  
na AMAZÔNIA (ReproAmazon), Campus Universitário de Belém, Universidade Federal  
Rural Da Amazônia, Belém, 2022.

Orientador: Prof. Dr. Ednaldo Silva  
Filho  
Coorientador: Prof. Dr.  
Sebastião Tavares Rolim Filho.

1. Biblioteca UFRA. 3. Universidade Federal Rural da Amazônia . I. Silva Filho,  
Ednaldo. *orient.* II. Título

---

CDD 572.85

## DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais Antonio Alves da Silva e Raimunda Eliana de Araújo Silva por todo amor e apoio. A minha filha Nathalia dos Santos Silva por todo incentivo e amor. As meus irmãos Fabricio Araújo, Pricila Araújo e Adriene Stefani da Silva pelo incentivo e apoio. A minha amiga Priscila Azevedo por todos os ensinamentos, conselhos e amizade incondicional. Ao meu Orientador Ednaldo da Silva Filho por toda dedicação e amizade nessa longa jornada, a minha amiga Luciana Maia que partiu precocemente e que sei que estaria muito feliz com essa conquista e ao meus colegas de laboratório que estiveram ao meu lado.

## **AGRADECIMENTO**

Primeiramente a Deus, por ter me dado a oportunidade de chegar até aqui e me fazer crescer tanto como profissional e pessoa.

A minha família, em especial aos meus pais Antonio Alves da Silva e Raimunda Eliana de Araújo Silva, meus irmãos Fabricio de Araújo Silva, Priscila de Araújo Silva e Adriene Stefani da Silva e minha amada filha Nathalia dos Santos Silva por todo carinho, apoio emocional, compreensão e amor que foram indispensáveis nessa árdua caminhada.

A meu orientador Professor Ednaldo da Silva Filho, amigo e parceiro, obrigada por me apresentar ao mundo da pesquisa e por me acolher com tanto carinho e respeito, se tornando peça chave para meu desenvolvimento na vida acadêmica. És um grande mestre! És um exemplo para todos. Obrigada por ser aquele orientador comprometido e que faz acontecer, e por acreditar na minha capacidade e nunca largar minha mão em todos os momentos do início ao fim.

A meus amigos e colegas de profissão, a Priscila Azevedo pela amizade, ensinamentos, companheirismo e dedicação nesse projeto, um verdadeiro anjo na minha vida. A Moises Lima (zinho) pela amizade e companheirismo nos momentos difíceis quando eu queria fraquejar. Obrigada meus dois amigos queridos que o mestrado me presentiu.

As minhas amigas e companheiras de laboratório, Ellem e Luana pela ajuda durante o percurso e desenvolvimento do projeto em laboratórios.

Ao meu coorientador Professor Sebastião Tavares Rolim Filho, pelo apoio dado no decorrer do projeto.

Ao Médico Veterinário Dr. Lawrence Oliveira Barros por ter me recebido muito bem em Natal-RN, nos 45 minutos do segundo tempo para coletas complementares de amostras do meu experimento. Obrigada pelo apoio e ensinamentos na minha breve passagem pelo Rio Grande do Norte.

Ao Professor Gustavo Ferrer pelas coletas e envio das amostras de Pernambuco.

Ao Médicos Veterinários Alexandre e Daniela por ceder animais sob sua responsabilidade para contribuir em meu experimento.

A todos os proprietários de animais que cederam seus animais incentivando essa pesquisa.

Por fim a todos os meus amigos que conviveram pacientemente, com carinho, uma conversa amiga, um abraço nessa fase e assim contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse grande sonho.

## RESUMO

O cavalo Quarto de Milha é uma raça que se destaca pela força, explosão e versatilidade, sendo usado em diversas modalidades esportivas equestres, onde se destacam a prova de tambor e vaquejada. A busca por animais geneticamente superiores e a possibilidade do uso de indivíduos com subfertilidade adquirida impulsionou o desenvolvimento de algumas técnicas reprodutivas em equinos. A partir da TE várias biotécnicas surgiram, rompendo a barreira da subfertilidade e infertilidade adquiridas. O hormônio folículo estimulante (FSH), uma glicoproteína secretada pela pituitária anterior, pode regular a função ovariana através do receptor FSH (FSHR), que regula o funcionamento do FSH, no qual desempenha um papel central na reprodução. Foram estabelecidas técnicas de biologia molecular como extração de DNA, PCR e sequenciamento de DNA, como também análises de bioinformática para identificar novos polimorfismos e futuras análises estatísticas associando os polimorfismos com as características reprodutivas em éguas com o objetivo de identificar polimorfismos genéticos na região promotora do gene do FSHR e associar tais polimorfismos com traços reprodutivos em éguas doadoras de embrião. Portanto, o objetivo com este trabalho foi caracterizar parte da região promotora e a região 5' não traduzida (5'UTR) do gene do FSHR em equinos da raça quarto de milhas. Foi coletado sangue periférico de 81 éguas de três fazendas para extração de DNA, seguido da amplificação de 707 pb da região promotora do gene FSHR. Em seguida os produtos de PCR foram purificados e sequenciados pelo método de Sanger. As sequências foram alinhadas e comparadas entre as éguas. Analiticamente foram identificados três polimorfismos (SNPs), sendo dois na região promotora (-217G>T e -195G>A). No SNP-217, o alelo e o genótipo mais frequentes são G=0,939 e GG=0,902. No SNP -195, o alelo e o genótipo mais frequentes são G=0,896 e GG=0,841. Um SNP foi identificado na 5'UTR na posição 127A>G, sendo o alelo e o genótipo mais frequente G=0,729 e GG=0,602. O desequilíbrio de ligação foi significativo entre os SNPs -217 e -195. Foram identificados 74 segmentos com potenciais sítios de ligações na sequência selvagem, sendo na posição -217 o Sp1 e TFAP-2alpha e na posição 195 o sítio para GR, enquanto que na sequência mutante foram identificados 71 segmentos, como os referidos sítios de ligações perdidos. A região reguladora do gene FSHR apresenta consideráveis variações polimórficas para análises populacionais que podem estar envolvidos nos processos de seleção assistida por marcadores moleculares para características envolvidas em fatores reprodutivos.

**Palavras-chaves:** Polimorfismos, equino, SNP, FSHR, Marcadores Moleculares.

## **ABSTRACT**

The Quarter Horse is a breed that stands out for strength, explosion and versatility, being used in various equestrian sports, where drum and vaquejada competitions stand out. The search for genetically superior animals and the possibility of using individuals with acquired subfertility boosted the development of some reproductive techniques in horses. From ET, several biotechnologies emerged, breaking the barrier of subfertility and acquired infertility. Follicle stimulating hormone (FSH), a glycoprotein secreted by the anterior pituitary, can regulate ovarian function through the FSH receptor (FSHR), which regulates the functioning of FSH, in which it plays a central role in reproduction. Molecular biology techniques such as DNA extraction, PCR and DNA sequencing were established, as well as bioinformatics analyzes to identify new polymorphisms and future statistical analyzes associating polymorphisms with reproductive traits in mares with the aim of identifying genetic polymorphisms in the promoter region of the FSHR gene and to associate such polymorphisms with reproductive traits in embryo donor mares. Therefore, the aim of this work was to characterize part of the promoter region and the 5'untranslated region (5'UTR) of the FSHR gene in quarter horses. Peripheral blood was collected from 81 mares from three farms for DNA extraction, followed by amplification of 707 bp of the promoter region of the FSHR gene. Then the PCR products were purified and sequenced by the Sanger method. The sequences were line up and compared between mares. Allelic, genotypic frequencies and inbreeding coefficients were determined by the Analytically, three polymorphisms (SNPs) were identified, two in the promoter region (-217G>T and -195G>A). In SNP-217, the most frequent allele and genotype are G=0.939 and GG=0.902. In SNP -195, the most frequent allele and genotype are G=0.896 and GG=0.841. One SNP was identified in 5-UTR at position 127A>G, with the most frequent allele and genotype being G=0.729 and GG=0.602. Binding disequilibrium was significant between SNPs -217 and -195. 74 segments with potential binding sites were identified in the wild-type sequence, being at position -217 the Sp1 and TFAP-2 alpha and at position 195 the site for GR, which, while in the sequence, 71 segments were identified, as the missing binding sites. The regulatory region of the FSHR gene presents variations considered polymorphic for population selections that may be involved in the assistance processes for molecular markers for relevant traits in reproductive factors.

**Keywords:** Polymorphisms, equine, SNP, FSHR, Molecular Markers.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Posição dos SNPs e respectivas descrições estatísticas na região promotora do gene FSHR em éguas quarto de milha doadoras de embrião .....	41
<b>Tabela 2:</b> Análise de desequilíbrio de ligação entre os SNPs .....	41
<b>Tabela 3:</b> Identificação de haplótipos a partir de 3 SNPs do gene FSHR .....	42

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Sequência caracterizada da região do gene FSHR de equino.....	40
--	----

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 HIPÓTESE .....</b>	<b>14</b>
<b>3 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1 Objetivo específicos.....</b>	<b>15</b>
<b>4 CAPÍTULO I (POLIMORFISMOS NO GENE RECEPTOR DO FSH OCASIONA IMPACTOS REPRODUTIVOS POSITIVOS EM ÉGUAS?).....</b>	<b>16</b>
<b>4.1 Introdução.....</b>	<b>18</b>
4.1.1 Raça quarto de milha no Brasil .....	18
4.1.2 Reprodução equina.....	18
4.1.2.1 Fisiologia reprodutiva da égua .....	19
4.1.2.2 Fisiologia da ovulação e ação do hormônio folículo estimulante (FSH).....	20
4.1.3 Hormônio folículo estimulante (FSH) .....	20
4.1.3.1 Receptor do hormônio folículo estimulante (FSHr) .....	21
4.1.4 Polimorfismos .....	22
4.1.4.1 Polimorfismo no gene do receptor de FSH (FSHR) .....	22
4.1.4.2 Polimorfismo na região promotora do gene do receptor de FSH (FSHR) .....	23
4.1.4.3 Mutações ativadoras x inativadoras relacionadas aos polimorfismos no gene FSHR.....	24
4.1.4.4 Possíveis alterações reprodutivas associadas ao polimorfismo no receptor de FSH (FSHR) .....	24
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>26</b>
<b>6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>26</b>
<b>7 CAPÍTULO II (CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DO RECEPTOR DE FSH EM ÉGUAS DA RAÇA QUARTO DE MILHA).....</b>	<b>34</b>
<b>7.1 Introdução .....</b>	<b>36</b>
<b>7.2 Material e métodos .....</b>	<b>37</b>
7.2.1 Aspectos éticos da pesquisa .....	37
7.2.2 Animais utilizados .....	38
7.2.2.1 Obtenção das amostras .....	38
7.2.3 Extração de DNA .....	38
7.2.4 Reações em cadeia da polimerase (PCR) .....	38
7.2.4.1 Purificação e sequenciamento do produto da PCR .....	39

7.2.5 Alinhamento das sequencias e identificação dos polimorfismos.....	39
7.2.6 Análises estatísticas .....	39
<b>7.3 Resultados .....</b>	<b>40</b>
<b>7.4 Discussão .....</b>	<b>42</b>
<b>7.5 Conclusão .....</b>	<b>44</b>
<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>44</b>
<b>9 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A raça quarto de milha é caracterizada por sua versatilidade possuindo aptidão para diversas modalidades esportivas e segundo a Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Quarto de Milha (ABQM) são cerca de vinte e duas modalidades, entre elas temos as principais como rédeas, apartação, conformação, corrida e vaquejada (ALVES, 2021).

Por ser uma raça adaptável a qualquer situação, transformou-se em instrumento de força, transporte e difícil de ser derrotado em provas equestres, além de melhorador genético de plantel, contudo os equinos de um modo geral, se comparados com outras espécies, ainda estão aquém quando se trata de avanço relacionados a reprodução (ALVES, 2021).

A busca por animais geneticamente superiores e a possibilidade do uso de indivíduos com subfertilidade adquirida impulsionou o desenvolvimento de algumas técnicas reprodutivas em equinos, como a inseminação artificial, transferência de embriões, transferência de oócitos e injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (BERTOZZO, et al., 2014; HINRICH, 2018).

No entanto, pouco se sabe sobre os fatores genéticos que atuam na fertilidade, devido a isso é que estudos relacionados à genômica aplicada à reprodução equina têm focado na fertilidade de garanhões (GIESECKE, et al., 2010; HINRICH, 2013). Em estudos com animais, sabe-se que a resposta ovariana à estimulação da gonadotrofina é influenciada por fatores genéticos (SPEAROW, et al., 1999).

Entre os principais genes envolvidos na fertilidade, temos o hormônio foliculo estimulante (FSH) que desempenha um papel importante durante a foliculogênese, e sua ação biológica é mediada pelo receptor específico de FSH (FSHR), expresso exclusivamente nas células ovarianas da granulosa (FAUSER; VAN HEUSDEN, 1997).

As metodologias de genotipagem de SNP em larga escala possibilitam a realização de inúmeros estudos, como a identificação de regiões genômicas modificadas pela seleção e a identificação de regiões cromossômicas, genes e polimorfismos de nucleotídeo único (Single Nucleotide Polymorphisms – SNP) que contribuem para a variação de características de interesse nas principais raças de equinos criadas no mundo (VIEIRA, 2020).

Portanto, partindo desse pressuposto o objetivo com esta pesquisa é analisar o polimorfismo no gene FSHR em éguas quarto de milha através de uma breve revisão de literatura, assim como análise de material molecular e desta forma desenvolver possíveis marcadores moleculares envolvidos na reprodução de equinos.

## **2 HIPÓTESE**

Possíveis polimorfismos na região promotora e 5' -UTR do gene receptor do FSH (FSHR) funcionam como marcadores de alterações reprodutivas em éguas.

### **3 OBJETIVO GERAL**

Analisar possíveis mutações na região promotora e 5' -UTR do gene do receptor de FSH como possível marcador de alterações na função reprodutiva de éguas quarto de milha.

#### **3.1 Objetivos específicos**

- a) Elaborar uma revisão de literatura sobre a raça quarto de milha no Brasil e sua utilização pelos produtores, bem como aprofundar a fisiologia reprodutiva, o polimorfismo e receptores de FSH.
- b) Detectar, identificar e caracterizar geneticamente a região promotora e 5'-UTR do gene do receptor de FSH em éguas.

**4 CAPÍTULO I**

**POLIMORFISMOS NO GENE RECEPTOR DO FSH OCASIONA IMPACTOS  
REPRODUTIVOS POSITIVOS EM ÉGUAS?**

**POLIMORFISMOS NO GENE RECEPTOR DO FSH OCASIONA IMPACTOS  
REPRODUTIVOS POSITIVOS EM ÉGUAS?**

O artigo será submetido à revista Research Society and Development

Roberta de Araújo Silva <sup>\*</sup>, Gabriela Patricia Costa Rodrigues<sup>b</sup>, Priscilla do Carmo  
de Azevedo Ramos<sup>a</sup>, Ednaldo da Silva Filho <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia,  
PA, Brasil.

<sup>b</sup>Universidade da Amazônia, PA, Brasil.

\*Correspondência: Universidade Federal Rural da Amazônia; Instituto de saúde e  
Produção Animal, Laboratório de Biologia Molecular, Pa, Brasil. CEP. 66.077-  
830. Fone +55 91 981307350

Endereço de e-mail: [robertaaraujovet@gmail.com](mailto:robertaaraujovet@gmail.com)

## 4.1 Introdução

### 4.1.1 Raça quarto de milha no brasil

A raça quarto de milha é caracterizada por sua versatilidade possuindo aptidão para diversas modalidades esportivas e segundo a Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Quarto de Milha (ABQM) são cerca de vinte e duas modalidades, entre elas temos as principais como rédeas, apartação, conformação, corrida e vaquejada, embora seja um número elevado de atividades, a seleção de características como a robustez e velocidade dos animais predominou (ALVES, 2021).

Por ser uma raça adaptável a qualquer situação, transformou-se em instrumento de força, transporte e difícil de ser derrotado em provas equestres, além de melhorador genético de plantel e apesar de ser melhorador genético de plantel, os equinos de um modo geral, se comparados com outras espécies, ainda estão aquém quando se trata de avanço relacionados a reprodução (ALVES, 2021).

### 4.1.2 Reprodução equina

A primeira espécie a ser submetida com sucesso à inseminação artificial foi a equina, entretanto se comparada as outras espécies domésticas o desenvolvimento da reprodução equina foi mais lento, devido a esse quadro dentro da reprodução, foi que no ano de 2002 a Associação Americana do Cavalos Quarto de Milha permitiu o registro ilimitado de potros produzidos por égua em cada ano através da transferência de embrião (TE), contribuindo consideravelmente com a popularização desta técnica (SQUIRES, et al., 2003; ALLEN, 2005). A busca por animais geneticamente superiores e a possibilidade do uso de indivíduos com subfertilidade adquirida impulsionou o desenvolvimento de algumas técnicas reprodutivas em equinos (BERTOZZO, et al., 2014).

Dentre as técnicas reprodutivas realizada em eguas temos a inseminação artificial (IA), técnica utilizada para obter produtos de pais com alta qualidade genética através da deposição do semêno no aparelho reprodutor da fêmea, com a vantagem de não necessitar da presença física do garanhão selecionado; a transferência de embriões (T.E.) que consiste na obtenção do embrião de fêmeas doadoras, éguas com valor genético elevado, o qual será transferido e implantado no útero de éguas receptoras (animais com menor valor genético); transferência de oócito (T.O) que consiste na retirada do oócito de uma

égua de alto valor zootécnico, impossibilitada de produzir embriões, o qual será transferido para o oviduto de outra égua (BLANCHARD et al., 2003; ALVARENGA E CARMO, 2007)

Existe também a fertilização *in vitro* (F.I.V.) que permite a produção *in vitro* de embriões de fêmeas que por motivos diversos estão impossibilitadas de naturalmente produzirem embriões e por fim tem a inseminação intracitoplasmática (I.C.I.S.), fertilização de um oócito *maturado in vitro* sendo posteriormente introduzido um único espermatozóide intracitoplasmático (BLANCHARD et al., 2003; ALVARENGA; CARMO, 2007).

#### 4.1.2.1 Fisiologia reprodutiva da égua

A égua alcança a puberdade aos 14 a 18 meses de idade, quando manifesta seu primeiro estro clínico acompanhado de ovulação (LEY, 2006; AURICH, 2011). Seu ciclo reprodutivo dura em média 22 dias, com estro ocorrendo por cerca de cinco a sete dias, momento esse em que as éguas ficam sexualmente receptivas aos garanhões (AURICH, 2011).

Por ser considerado um animal poliéstrico sazonal, tendo sua atividade reprodutiva influenciada pelo fotoperíodo, com a luz sendo o fator ambiental de maior influência, seu cio ocorre apenas nas épocas do ano de maior luminosidade (LEY, 2006; AURICH, 2011). Este sistema, chamado fotoneuroendócrino, funciona a partir da captação de luz pela retina, que conduz a informação luminosa, pelo nervo óptico, ao núcleo hipotalâmico supraquiasmático, o qual é responsável por controlar a secreção noturna de melatonina, controlando assim, através de efeitos na função neuroendócrina, as respostas periódicas sazonais (DAVID, 2010).

Dessa forma, considera-se que o ciclo estral da égua tem início quando a luminosidade é captada por receptores na retina estimulando o eixo pineal-hipotalâmico-hipofisário-gonadal. (HAFEZ, 2004). Esta captação promove a inibição da produção de melatonina, com conseqüente aumento da produção de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) no hipotálamo Aurich (2011), o qual induz a secreção de hormônio folículo-estimulante (FSH) e luteinizante (LH) pela hipófise anterior, sendo estes os responsáveis pelo desenvolvimento folicular e ovulação respectivamente (HAFEZ, 2004; LEY, 2006).

#### 4.1.2.2 Fisiologia da ovulação e ação do hormônio folículo estimulante (FSH)

O desenvolvimento folicular caracteriza as fases estrogênicas do ciclo estral das éguas, dentre eles tem - se o proestro e o estro, que se confundem clinicamente pelo fato de não ser possível diferencia - los através do estágio de desenvolvimento folicular em que se encontram e por apresentarem dominância de um ou mais folículos pré-ovulatórios (FARIAS, et al., 2016), enquanto que o período após a ovulação determina o domínio progesterônico observado nas fases de metaestro e diestro e que são intercaladas pelo anestro, considerado um período de inatividade reprodutiva confuso (DAVID, 2010).

É durante o desenvolvimento folicular que ocorre a receptividade reprodutiva (contração da vulva, exposição do clitóris e receptividade ao garanhão das fêmeas), devido a produção do estrógeno folicular (AURICH, 2001). Neste mesmo período, a progesterona se encontra em baixa concentração e aproximadamente, um a quatro dias após a ovulação ocorre redução na concentração de estrógeno e posteriormente aumento na progesterona (LEY, 2006).

No ciclo estral de éguas, o desenvolvimento folicular ocorre como uma onda folicular maior em um intervalo interovulatório em média de 22 dias, sendo influenciado pelo aumento da concentração plasmática de FSH, que leva a um pico folicular cerca de três dias depois, declinando nos próximos dias até atingir níveis basais (GINTHER, 1992). Após este estímulo, o folículo com maior crescimento, medindo aproximadamente 21 mm, torna-se dominante dando continuidade ao processo reprodutivo da égua, enquanto os demais têm seu crescimento reduzido levando ao chamado “desvio folicular”, que se trata de um termo utilizado para bovinos, para descrever o início de uma diferença pronunciada nas taxas de crescimento entre os dois maiores folículos (GUINTER, et al, 1996; GASTAL, et al., 1997).

Essa dominância promove uma redução nos níveis de FSH, que apesar de baixos, ainda conseguem influenciar o crescimento do folículo dominante, sendo este o principal responsável pela redução nas concentrações de FSH, pois produz grandes quantidades de estradiol e inibina (GINTHER et al., 2000).

#### 4.1.3 Hormônio folículo estimulante (FSH)

As gonadotrofinas são hormônios peptídicos que regulam a função ovariana e testicular e são essenciais para o crescimento normal, desenvolvimento sexual e

reprodução, e compreendem os hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), ambos produzidos na hipófise, e a gonadotrofina coriônica (hCG), que é produzida pela placenta, contudo as gonadotrofinas hipofisárias estão sob o controle do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), um decapeptídeo produzido no hipotálamo e liberado em resposta aos níveis circulantes de estrogênios e progesterona (LEVI; HAMMES, 2018)

O hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH) desempenham papéis complementares no desenvolvimento folicular e na ovulação por meio de uma interação complexa no hipotálamo, glândula pituitária anterior, órgãos reprodutivos e oócitos (BOSCH, et al, 2021).

Produzido pela hipófise anterior, o FSH é um hormônio glicoproteico secretado de forma cíclica, e regulado por vários mecanismos de retroalimentação, participando na transição lúteo-folicular de modo que a elevação nos seus níveis é responsável pelo processo de recrutamento folicular, ou seja, a transformação dos folículos primordiais em folículos antrais (AIRES, 1999).

O FSH induz o crescimento e a diferenciação das células da granulosa, estimula a atividade da aromatase, a síntese de estradiol e a formação de receptores de LH. Sua secreção é inibida pelo estradiol e pela inibina produzidos pelo folículo dominante (AIRES, 1999). Sabe-se que o crescimento folicular, ocorre não somente pelo estímulo de FSH exógeno, mas também pela produção de FSH pelo *complexo cumulus oophorus* (CCOs) (WÓJTOWICZ; SZOLTYS, 1998).

Por ser um hormônio polipeptídico da glicoproteína, o FSH não pode passar através da membrana celular, portanto sua influência nas células alvo deve ser mediada pelo receptor de FSH (FSHR). Consequentemente, qualquer tipo de mutação no FSHR pode afetar a reprodução (SHARIFIYAZDI, et al., 2018).

#### 4.1.3.1 Receptor do hormônio folículo estimulante (FSHR)

O FSHR é um membro da família de receptores acoplados à proteína G, expresso exclusivamente nas células de Sertoli, nos machos, e nas células da granulosa ovariana das fêmeas (CAMP, et al, 1991; DANKBAR, et al., 1995). Este receptor foi descrito expresso no gene situado no cromossomo 2p21 e compreende 10 éxons e 9 íntrons (MINEGISHI, et al., 1991; WU, et al., 2017).

A interação entre o FSH e o receptor FSHR é essencial para oogênese e

espermatogênese normal, estando o seu nível de expressão, intimamente relacionado à diferenciação e maturação de células germinativas, sendo, portanto, indispensável para a fertilidade (HECKERT;GRISWOLD, 1993; GROMOLL, et al.,1996).

#### 4.1.4 Polimorfismos

Os polimorfismos genéticos são pequenas variações que acontecem no genoma e que garantem as diferenças individuais, quando sua frequência alélica acomete pelo menos 1% da população (NUSSBAUM, et al., 2008). O exemplo mais encontrado desta variação gênica ocorre através da substituição de um único nucleotídeo por outro (single nucleotide polymorphism – SNP), que ocorrem com uma frequência aproximada de 1 a cada 1000 pares de base (SHASTRY, 2002). Essa substituição pode promover ganho ou perda de função quando se trata do FSHR (THEMMEN; HUHTANIEMI, 2000).

##### 4.1.4.1 Polimorfismo no gene do receptor de FSH (FSHR)

Mutações dos genes das gonodotrofinas são raras, em contrapartida, as do seus receptores são frequentemente mais encontradas, e são descritas em ambos os sexos causando alteração da função reprodutiva e muitas vezes mais grave para a fertilidade feminina que para masculina (THEMMEN; HUHTANIEMI, 2000; BHARTIYA; PATEL, 2021) ação hormonal e os sistema de *feedback* endócrino podem ser modificados por conta dos polimorfismos genéticos, causando alterações inter-individuais (NUSSBAUM, 2008). Então polimorfismos no gene do receptor do FSH possuem capacidade de alterar a sua ação através da modificação de propriedades bioquímicas do produto do gene ou mudando a atividade do promotor, a nível transcricional (GROMOLL; SIMONI, 2005).

Portanto alterações estruturais moleculares no gene do receptor FSHR podem causar dessensibilização dos receptores na membrana celular, diminuindo a sua eficiência na transmissão dos sinais hormonais afetando assim diretamente a foliculogênese e, conseqüentemente, o desempenho reprodutivo (SIEGEL, et al., 2013; YAN, et al., 2013).

Estudos anteriores em humanos revelaram que existem vários polimorfismos de nucleotídeos únicos no gene FSHR, e muitas dessas mutações foram relacionadas com doenças reprodutivas, como a síndrome do ovário policístico, onde uma resposta alterada à estimulação ovariana é uma característica da doença, então estudos indentificaram SNP

no exon 10 do gene do receptor de FSH (FSHR), FSHR p.N680S, que foi consistentemente identificado como tendo uma associação significativa com a resposta ovariana ao FSH (SIMONI, et al., 2008); na amenorreia primária e secundária, onde estudos demonstraram pela primeira vez que um fator genético associado ao gene do receptor de FSH, através do polimorfismo Asn680Ser, foi determinante das diferenças de duração e dinâmica do ciclo menstrual humano (GREB, et al., 2005; ACHREKAR, et al., 2010) e por fim a infertilidade masculina, onde estudos concluíram que, embora nenhum haplótipo de FSHR tenha sido associado a diferentes níveis séricos de FSH, os alelos A-Ala-Ser e G-Thr-Asn podem representar fatores genéticos que contribuem para o comprometimento espermato-genético (BALKAN, et al., 2010).

Após inúmeras mutações detectadas no gene FSHR humano, diversas mutações do gene FSHR foram caracterizadas em vários animais (SHARIFIYAZDI, et al., 2018). Em bovinos vários SNPs foram relatados no gene FSHR, alguns estão associados à puberdade precoce e traços de superovulação (HOUDE, et al., 1994; MILAZZOTTO, et al., 2008; YANG, et al., 2010)

Yang et al. (2014) relataram que houve associação significativa entre a mutação A > G localizada na posição -278 do gene FSHR e variação em resposta à superovulação de gado leiteiro na China e propuseram que o gene FSHR apresenta-se como um marcador molecular adequado devido aos seus efeitos na superovulação.

#### 4.1.4.2 Polimorfismo na região promotora do gene do receptor de FSH (FSHR)

Sabe-se que os promotores do gene desempenham um papel significativo na regulação da transcrição (WANG, et al., 2015; FAN, et al., 2016). A partir desse entendimento, estudos foram desenvolvidos onde clonaram com sucesso o promotor do gene FSHR em humanos, ratos, camundongos e ovelhas e o mecanismo de regulação da transcrição foi amplamente estudado (GROMOLL; DANKBAR; GUDERMANN, 1994; HECKERT; DALEY; GRISWOLD, 1992; LEVALLET; KOSKIMIES; RAHMAN; HUHTANIEMI, 2001; SAIRAM; SUBBARAYAN, 1997).

Em alguns estudos foi observado que tanto o promotor quanto os fatores de transcrição estão intimamente relacionados à atividade do promotor, e como exemplo, temos que no promotor do gene FSHR de humanos, ratos, camundongos e ovelhas, os fatores de transcrição USF1 e USF2 se ligam à E-box e regulam a atividade do promotor

(GOETZ; LLOYD; GRISWOLD, 1996; HECKERT; DAGGETT; CHEN, 1998; HERMANN; HORNBAKER; RICE; SAWADOGO; HECKERT, 2008 ; WOOD; WALKER, 2009; XING; SAIRAM, 2001).

O promotor do gene FSHR regula o local de iniciação da transcrição, o tempo e o nível de expressão, portanto, em vacas holandesas chinesas, pesquisadores observaram que os polimorfismos no local -278 na região promotora do gene FSHR afetaram significativamente o número de folículos e o número de embriões transferidos (YANG, et al., 2014).

Defeitos genéticos nos receptores de gonadotrofinas podem ser divididos em mutações ativadoras e inativadoras, sendo ativo ao carregar uma mutação ativadora (ganho de função), independentemente da ligação do ligante, enquanto que ao carregar uma inativadora (perca de função) pode reduzir a função do receptor (THEMMEN; HUHTANIEMI, 2000; BECK - PECCOZ, et al., 2006; CALEBIRO, et al., 2005).

#### 4.1.4.3. Mutações ativadoras x inativadoras relacionadas aos Polimorfismo no gene FSHR

As mutações ativadoras conferem ao FSHR uma maior responsividade ao FSH, tornando-o constitutivamente ativo mesmo na ausência do ligante, enquanto as mutações inativadoras reduzem a função do receptor até um bloqueio total, alterando a formação do complexo receptor-ligante ou a transdução do sinal de FSH (BHARTIYA; PATEL, 2021)

Ao que se trata de mutações ativadoras, estas foram descritas principalmente no domínio transmembranar da glicoproteína, sendo que a heteroziguidade é categórica para causar variações fenotípicas e uma herança dominante (VASSART, 2004, CALEBIRO, et al., 2005), enquanto que as inativadoras costumam estar localizadas em qualquer região e usualmente requerem homoziguidade para alterações fenotípicas e são transmitidas recessivamente (CALEBIRO, et al., 2005, BECK-PECCOZ, et al., 2006). Entretanto, dentro deste contexto, uma ressalva foi descrita para mutação inativadora do receptor de TSH (hormônio estimulante da tireóide) que é dominante, o que não ocorre quando se trata do FSHR (CALEBIRO, et al., 2005).

#### 4.1.4.4 Possíveis alterações reprodutivas associadas ao polimorfismo no receptor de FSH (FSHR)

No ano de 1995 em uma análise sobre insuficiência ovariana prematura (IOP), realizada com 21 mulheres com IOP e 40 mulheres com fertilidade normal (grupo controle), observou-se que o gene do receptor do FSH é polimórfico, no entanto não foi observado que o polimorfismo ocorre somente em mulheres portadoras de IOP (WHITNEY, et al., 1995)

O gene receptor do FSH em um estudo realizado por Sato et al. (2011), foi apontado como um gene candidato que determina a taxa de ovulação em suínos, onde polimorfismos (c.74C>G, c.532G>A e c.1166T>C) em sua sequência de codificação, foram encontrados associados ao número de corpos lúteo em uma população de Meishan x Duroc F2.

Ainda em suínos Zhang et al. (2015) estudou 3 populações (raças Berkshire, Wannan Black e seus cruzamentos) para avaliar os efeitos do gene FSHR sobre o número total nascido (NTN) e o número nascido vivo (NNV), onde observou 3 SNPs (C1491T, G1885A e C1977T) em exon 10, 3 genótipos (AA, AB e BB) para C1491T e 2 haplotipos (D e E) para G1885A e C1977T. Os resultados mostraram que o NTN e o NNV de porcas Wannan Black com o genótipo AB foram significativamente maiores do que nas porcas genótipos AA ( $P < 0,01$ ) em porcas de multiparidade e todas as paridades, já na raça Berkshire com o genótipo DE foram significativamente superiores aos genótipos DD e EE ( $P < 0,01$ ). No geral, NTN e NNV dos 3 genótipos identificados foi  $DE > DD > EE$ . Os resultados mostraram que os polimorfismos no exon 10 do gene FSHR tiveram um efeito significativo sobre os traços do tamanho da ninhada dos porcos Wannan Black e Berkshire corroborando que esses resultados podem ser aplicados para seleção assistida por marcadores nas duas raças suínas.

Em ovinos, o aumento da expressão do receptor FSHR no ovário é uma característica comum das ovelhas que carregam o alelo prolífico, indicando que o FSHR está envolvido na proliferação de ovelhas (JIA, et al., 2005; DROUILHET, et al., 2010; REGAN, et al., 2015).

Um estudo prospectivo observacional realizado por Allegra (2017), analisou a associação dos polimorfismos do gene FSHR do c. 2039 A>G e c. -29 G>A com os números de oócitos recuperados de 140 pacientes submetidas a ciclo de Fertilização *in vitro* (FIV) e Injeção Intracelular de Espermatozóide (ICSI) com fatores masculinos graves ( $\leq 5.000.000$  espermatozoides / mL) ou fatores tubários. Observou-se que a combinação genética de A / G para o polimorfismo c.2039 A > G com G / G para o polimorfismo c.-29 G > A, está significativamente associada ao maior número de

ócitos coletados ( $p = 0,03$ ). Essa associação foi significativa mesmo após o controle do efeito de outras variáveis clínicas.

Segundo Du et al. (2019) em seu estudo com 245 ovelhas, analisando a região promotora de -580 a -342 do gene FSHR, foram encontradas quatro mutações (c.-518T>C, c.-466C>T, c.-414A>G e c.-365C>T), seis genótipos (TT/CC/AA/CC, TT/CC/AG/CC, TC/CT/AG/CT/CT, TT/CC/GG/CC, TC/CT/GG/CT e CC/TT/GG/TT) e três haplotipos (T-C-A-C, T-C-G-C e C-T-G-T) e observou-se através de análise dos dados que os polimorfismos no principal promotor do gene estão associados ao desempenho reprodutivo das ovelhas Hu quanto a tamanho de ninhada, e na atividade transcricional do FSHR fornecendo assim um novo marcador candidato para seleção assistida por marcador na criação de ovelhas.

## 5 CONCLUSÃO

A revisão de literatura, foi de suma importância para se compreender como funciona a fisiologia reprodutiva da égua ligada a expressão do hormônio FSH e o seu receptor (FSHR), assim como, os polimorfismos que ocorrem no FSHR, através da busca de trabalho iniciais, até os dias atuais.

## 6 REFERÊNCIAS

ACHREKAR, S. K.; MODI, D. N.; MEHERJI, P. K.; PATEL, Z. M. Follicle stimulating hormone receptor gene variants in women with primary and secondary amenorrhea. **Journal Assisted Reproduction Genetics**, 27: 317-326, 2010.

ALLEN W. R. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. **Reproduction in Domestic Animals, Berlin**, v.40, n.4, p.310-329, 2005.

ALVARENGA, Marco Antônio; CARMO, M. T. Em reprodução equina: o que há de novo para o veterinário de campo. **Revista Brasileira Medicina Equina**, v. 14, p. 26-29, 2007.

ALVES, H. Quarto de Milha Cresce em 2021. Associação Brasileira dos Criadores de

Cavalos Quarto de Milha. ABQM, 2021. Disponível em: <https://online.fliphtml5.com/izvg/dklc/#p=12>

AURICH, C. Reproductive cycles of horses. **Animal Reproduction Science**, v.124, n.3, p.220-228, 2011.

AIRES, M. M. Fisiologia. **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro.1999.

ALLEGRA, A.; MARINO, A.; RAIMONDO, S.; MAIORANA, A.; GULLO, S.; SCAGLIONE, P.; VOLPES, A.; ALESSANDRO, R. The carriers of the A/G-G/G allelic combination of the c.2039 A>G and c.-29 G>A FSH receptor polymorphisms retrieve the highest number of oocytes in IVF/ICSI cycles. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, 34(2), 263–273, 2017.

BAKER, P.J.; PAKARINEN, P.; HUHTANIEMI, I.T.; ABEL, M.H.; CHARLTON, H.M.; KUMAR, T.R.; O'SHAUGHNESSY, P.J. Failure of normal Leydig cell development in follicle stimulating hormone (FSH) receptor-deficient mice, but not FSHbeta-deficient mice: role for constitutive FSH receptor activity. **Endocrinology**, 144, 138–145, 2003.

BALKAN, M.; GEDIK, A., AKKOC, H.; AY, O. I.; ERDAL, M. E.; ISI, H.; BUDAK, T. FSHR single nucleotide polymorphism frequencies in proven fathers and infertile men in Southeast Turkey. **Journal Biomed Biotechnol**. Vol.2010, 2010.

BERTOZZO, B. R.; SAMPAIO, B. F. B.; BENDER, E. S. C.; PAGNONCELLI, R. R.; SILVA, E. V. C.; ZÚCCARI, C. E. S. N. Vantagens e Desafios das Biotécnicas Avançadas Utilizadas na Reprodução Equina Assistida. **Boletim de Indústria Animal** 71(1): 84-93, 2014.

BLANCHARD, Terry L. et al. Manual of Equine Reproduction. 2ª ed. USA: Mosby, 2003. **Bibliografia recomendada**: 20 – 46, 130 – 140. ISBN 978-0-323-01713-8.

BOSCH, E.; ALVIGGI, C.; LISPI, M.; CONFORTI, A.; HANYALOGLU, A. C.; CHUDERLAND, D.; SIMONI, M.; RAINE-FENNING, N.; CRÉPIEUX, P.; KOL, S.; ROCHIRA, V.; D'HOOOGHE, T.; HUMAIDAN, P. Reduced FSH and LH action:

implications for medically assisted reproduction. **Humam Reproduction**, Vol.36, No.6, p. 1469–1480, 2021.

BHARTIYA D. E.; PATEL H. An overview of FSH-FSHR biology and explaining the existing conundrums. **Journal of Ovarian Research**, 14: 144, 2021.

CAMP, T. A.; RAHAL, J. O.; MAYO, K. E. Cellular Localization and Hormonal Regulation of Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone Receptor Messenger RNAs in the Rat Ovary. **Endocrinologia Molecular**, v.5 , p.1405-1417, 1991.

CALEBIRO, D.; FILIPPIS, T.; LUCCHI, S.; COVINO, C.; PANIGONE, S.; BECK-PECCOZ, P.; DUNLAP, D.; PERSANI, L. Intracellular entrapment of wild-type TSH receptor by oligomerization with mutants linked to dominant TSH resistance. **Humam Molecular Genetics**, v.14, p.2991–3002, 2005.

DU, X.; GUO, J.; CAO, Q. Y.; YAO, W.; LI, Q. F. A haplotype variant of Hu sheep follicle-stimulating hormone receptor promoter region decreases transcriptional activity. **Animal Genetics**, v.50(4):407-411, 2019.

DROUILHET, L.; TARAGNAT, C.; FONTAINE, J.; DUITTOZ, A.; MULSANT, P.; BODIN L. & FABRE S. Endocrine characterization of the reproductive axis in highly prolific lacaune sheep homozygous for the FecLL mutation. **Biology of Reproduction**, 82, 815–24, 2010.

DANKBAR, B.; BRINKWORTH, M. H.; SCHLATT, S.; WEINBAUER, G. F.; NIESCHLAG, E.; GROMOLL, J. Ubiquitous Expression of the Androgen Receptor and Testis-specific Expression of the FSH Receptor in the Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*) Revealed by a Ribonuclease Protection Assay. **O Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.55, p.35-41, 1995.

DAVID, F. F. A. **Fotoperíodo artificial no verão pode evitar o anestro estacional na égua?** 2010. 41p. (Dissertação de Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

FAN, X. P.; JI, X. F.; LI, X. Y.; GAO, S.; FAN, Y. C.; WANG, K. Methylation of the

glutathione-S-transferase P1 gene promoter is associated with oxidative stress in patients with chronic hepatitis B. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, 238, 57–64, (2016).

HECKERT, L. L.; DALEY, I. J.; GRISWOLD, M. D. Structural organization of the follicle-stimulating hormone receptor gene. **Molecular Endocrinology**, 6, 70–80, 1992.

FARIAS, L.D.; NEVES, A.P.; FIALA, S.M.E.; TAROUÇO, A.K. Indução da ovulação em éguas: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.40, n.1, p.17-21, 2016.

GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Role of diameter differences among follicles in selection of a future dominant follicle in mares. **Biology Reproduction**, v.57, p.1320-1327, 1997.

GINTHER, O. J. **Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects** (642p). 2.ed. Cross Plains: Equiservices, 1992.

GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of reproduction**, 55:1187-1994, 1996.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: role of two-way functional coupling between folliclestimulating hormone and the follicles. **Biology Reproduction**, v.62, p.920-927, 2000.

GOETZ, T. L.; LLOYD, T. L.; GRISWOLD, M. D. Role of E box and initiator region in the expression of the rat follicle-stimulating hormone receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, 271, 33317–33324, (1996).

GREB, R. R.; BEHRE, H. M.; SIMONI, M. Pharmacogenetics in ovarian stimulation – current concepts and future options. **Reproductive BioMedicine**, 11, 589–600, 2005.

GROMOLL, J.; DANKBAR, B.; GUDERMANN, T. Characterization of the 5' flanking

region of the human follicle-stimulating hormone receptor gene. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 102, 93–102, 1994.

GROMOLL, J.; SIMONI, M.; NIESCHLAG, E. An activating mutation of the follicle-stimulating hormone receptor autonomously sustains spermatogenesis in a hypophysectomized man. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.81, p.1367–1370, 1996.

GROMOLL, J.; SIMONI, M. Genetic Complexity of FSH receptor function. **Endocrinology and Metabolism**, vol. 16 n. 8, 2005.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal** (503p). 7ª ed., São Paulo: Manole, 2004.

HECKERT, L. L.; GRISWOLD, M. D. Expression of the FSH receptor in the testis. **Recent Progress in Hormone Research**, v.48, p.61-77, 1993.

HERMANN, B. P.; HORNBAKER, K.; RICE, D. A.; SAWADOGO, M.; HECKERT, L. L.). In vivo regulation of follicle-stimulating hormone receptor by the transcription factors upstream stimulatory factor 1 and upstream stimulatory factor 2 is cell specific. **Endocrinology**, 149, 5297–5306, 2008.

JIA, C.L.; LI, N., WEI, Z.H.; ZHU, X.P.; LIU, H.Y. & JIA, Z.H. Study on FSHR and LHR mRNA levels of different BMPR-IB genotypes from Small Tail Han sheep during the oestrus. **Scientia Agricultura Sinica**, 39, 170–5, 2005.

LEVALLET, J.; KOSKIMIES, P.; RAHMAN, N.; HUHTANIEMI, I.). The promoter of murine follicle-stimulating hormone receptor: Functional characterization and regulation by transcription factor steroidogenic factor 1. **Molecular Endocrinology**, 15, 80–92, 2001.

LEY, W. B. **Reprodução em Éguas para Veterinários de Equinos** (240p). 1ª ed., São Paulo: Roca, 2006.

LEVIN, E. R.; VITEK, W. S.; HAMMES, S. R. Estrogens, Progestins and the Female Reproductive Tract. In, **Brunton LL, Hilal-Dandan R, Knollman BC, Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of therapeutics (13<sup>a</sup> ed)**. Nova York: McGraw-Hill, p. 803-32, 2018.

MINEGISHI, T.; TANO, M.; IGARASHI, M.; ROKUKAWA, S.; ABE, Y.; IBUKI, Y.; MIYAMOTO, K). Expression of follicle-stimulating hormone receptor in human ovary. **European Journal of Clinical Investigation**, 27, 469–474, 1991.

NUSSBAUM, R. L.; MCLNNES, R. R.; WILLARD, H. F.; HAMOSH, A. **Genética Médica - Thompson &Thompson 7a ed**. Elsevier, 2008.

REGAN, S.L.; MCFARLANE, J.R.; O'SHEA, T.; ANDRONICOS, N.; ARFUSO, F.; DHARMARAJAN, A. & ALMAHBOBI G. Flow cytometric analysis of FSHR, BMRR1B, LHR and apoptosis in granulosa cells and ovulation rate in merino sheep. **Reproduction**, 150, 151– 63, 2015.

SAIRAM, M.R.; SUBBARAYAN, V.S.R. Characterization of the 5' flanking region and potential control elements of the ovine follitropin receptor gene. **Molecular Reproduction Development**, 48, 480–487, 1997.

SATO, S.; HAYASHI, T.; KOBAYASHI, E. Fine mapping the number of corpora lutea quantitative trait loci on SSC3: analysis of the porcine follicle-stimulating hormone receptor gene. **Animal Science Journal**, 82, 633–41, 2011.

SHASTRY BS. SNP alleles in human disease and evolution. **Journal Human Genetics**. 47(11):561-6, 2002.

SIMONI, M.; TEMPFER, C. B.; DESTENAVES, B.; FAUSER, B. C. Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: part I: polycystic ovary syndrome and ovarian response. **Human Reproduction**, 14, 459–84, 2008.

SQUIRES, E.L.; CARNEVALE, E. M.; MCCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E.. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**, 59:151- 170, 2003.

SHARIFIYAZDI, H.; MIRZAEI A.; GHANAATIAN Z. Characterization of polymorphism in the FSH receptor gene and its impact on some reproductive indices in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, 188:45-50, 2018.

SIEGEL, E. T.; KIM, H. G.; NISHIMOTO, H. K.; LAYMAN, L. C. The molecular basis of impaired follicle-stimulating hormone action: evidence from human mutations and mouse models. **Reproductive Sciences**, v.20, n.3, p.211-33, 2013.

THEMMEN, A. P.; HUHTANIEMI, I. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. **Endocrine Reviews**, v.21, p.551-583, 2000.

VASSART, G. Activating mutations of the TSH receptor. **Thyroid**, v.14, p.86–87, 2004.

WANG, M.; LI, D.; ZHANG, M.; YANG, W.; CUI, Y.; LI, S.). Methylation of KvDMR1 involved in regulating the imprinting of CDKN1C gene in cattle. **Animal Genetics**, 46, 354–360, 2015.

WHITNEY, E.A.; LAYMAN, L. C.; CHAN, P. J.; LEE, A.; PEAK, D. B.; MCDONOUGH, P. G. The follicle-stimulating hormone receptor gene is polymorphic in premature ovarian failure and normal controls. **Fertility and Sterility**, 64(3):518-24, 1995.

WOOD, M. A.; WALKER, W. H.). USF1/2 transcription factor DNA-binding activity is induced during rat Sertoli cell differentiation. **Biology of Reproduction**, 80, 24–33, 2009.

WÓJTOWICZ, A.; SZOLTYS, M. Preovulatory secretion of steroids by cultured cumulus oophorus complexes of the rat: effects of FSH and LH. **Experimental and Clinical Endocrinology Diabetes**, 106(6):500-5, 1998.

WU, Q.; ZHANG, J.; ZHU, P.; JIANG, W.; LIU, S.; NI, M.; ZHANG, M.; LI, W.; ZHOU, Q.; CUI, Y.; XIA, X. The susceptibility of FSHB -211G > T and FSHR G-29A, 919A > G, 2039A > G polymorphisms to men infertility: an association study and meta-

analysis. **BMC Medical Genetics**, 1;18(1):81, 2017.

XING, W.; SAIRAM, M. R. Characterization of regulatory elements of ovine follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene: The role of E-box in the regulation of ovine FSHreceptor expression. **Biology of Reproduction**, 64, 579–589, 2001.

YANG, W. C.; LI, S. J.; CHEN, L.; YANG, L. G. FSHR genotype affects estrogen levels but not pregnancy rates in Luxi cattle subjected to embryo transfer. **Genetics and Molecular Research**, 12;13(1):1563-9, 2014.

YAN, Y.; GONG, Z.; ZHANG, L.; LI, Y.; LI, X.; ZHU, L.; SUN, L. Association of follicle-stimulating hormone receptor polymorphisms with ovarian response in Chinese women: a prospective clinical study. **PLoS One**, v.22, n.8, 2013.

ZHANG, X.D.; ZHU, H.Y.; ZHOU, J.; WANG, N.; ZHOU, N.; HUANG, L.; WU, T.; FENG, Y.F.; DING, Y.Y.; YIN, Z.J. Relationship between polymorphisms in exon 10 of FSHR gene and litter size in swine. **Genetics and Molecular Research**, 14(3), 8252–8261, 2015.

## **7. CAPÍTULO II**

### **CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DO RECEPTOR DE FSH EM ÉGUAS DA RAÇA QUARTO DE MILHA**

## **CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DO RECEPTOR DE FSH EM ÉGUAS DA RAÇA QUARTO DE MILHA**

O artigo será submetido à revista Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture

Roberta de Araújo Silva \*, Moisés de Lima Moreira<sup>a</sup>, Elem Cristina Macedo Barra<sup>a</sup>  
Priscilla do Carmo de Azevedo Ramos<sup>a</sup>, Lawrence de Oliveira Barros<sup>b</sup>, Gustavo  
Ferrer Carneiro<sup>b</sup>, Elizabeth Machado Barbosa<sup>c</sup>, Sebastião Tavares Rolim Filho<sup>a</sup>,  
Ednaldo Silva Filhoa<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia, PA, Brasil.

<sup>b</sup>Departamento de Medicina Veterinária Universidade Federal Rural de Pernambuco, PE, Brasil.

<sup>c</sup>Departamento de Ciências Agrárias e Biologia, Universidade Federal do Amapá, Campus Mazagão - AP, Brasil.

\*Correspondência: Universidade Federal Rural da Amazônia; Instituto de saúde e Produção Animal, Laboratório de Biologia Molecular, Pa, Brasil. CEP. 66.077-830. Fone +55 91 981307350

Endereço de e-mail: [robertaaraujovet@gmail.com](mailto:robertaaraujovet@gmail.com)

## 7.1 Introdução

Os polimorfismos de Única Base (SNP) são os mais comuns nos genomas eucariontes e podem ocorrer nos genes, principalmente nas regiões codificadoras e não-codificadoras de proteínas (RAMÍRE-BELLO; JIMÉNEZ-MORALES, 2017). Nas regiões reguladoras dos muitos genes, frequentemente são identificados inúmeros e considerados SNPs (LIANG, et al., 2020) No entanto, as mutações ocorridas na região promotora dos genes podem causar alterações consideradas nas expressões gênicas alterando os sítios de ligações de proteínas importantes para o mecanismo de transcrição dos genes, resultando assim, em mudanças nas características associadas aos genes (BRNIARCZYK, et al., 2015).

O hormônio folículo estimulante (FSH) desempenha papel importante na gametogênese e sua atividade é mediada por seu receptor específico de FSH (FSHR), sendo expresso nas células da granulosa e células de Sertoli (SZYMANSKA, et al., 2018). O FSHR é um membro da superfamília dos receptores acoplados à proteína G e tem papel crucial na reprodução (ULLOA- AGUIRRE, et al., 2018).

Polimorfismos no gene do FSHR podem estar associados a infertilidade em paciente masculinos devido a substituições de aminoácidos na estrutura proteica (LUO, et al., 2017). Em pacientes mulheres, alguns polimorfismos estão associados à insuficiência ovariana prematura (LIU, et al., 2019). Já Paschalidou et al. (2020) avaliaram um polimorfismo no gene do FSHR em pacientes sob tratamento de Fertilização *in Vitro* (FIV) e Injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) associando o mesmo características como com quadro clínico, bioquímico, e características relacionadas ao protocolo de estimulação ovariana, bem como a taxa de prenhes.

Em animais, um estudo com ovinos reporta que um polimorfismo na região 3' não traduzida (3'-UTR) tem papel importante na regulação da transcrição do FSHR (WANG, et al., 2019). Enquanto que polimorfismos na região 5' reguladora foram fortemente associados com o tamanho da ninhada em raças de ovinos de alta e baixa prolificidade (CHU, et al., 2012). Outro estudo identificou polimorfismos no éxon 10 do gene do FSHR em suínos que estão associados com o número total de nascidos (TNB) e o número de nascidos vivos (NBA) nas ninhadas (ZHANG, et al., 2015). Em galinhas poedeiras foram identificados polimorfismos na região promotora do gene do FSHR e os mesmos estão fortemente associados com a idade da postura do primeiro ovo e número de ovos

produzidos até a idade de 43 semanas Li, et al. (2019) e Kang et al. (2012) também avaliaram as mesmas características associadas a um INDEL (Inserção/Deleção) na região promotora do FSHR e evidenciaram fortes associações. Portanto, polimorfismos no gene do FSHR podem ser excelentes marcadores moleculares em reprodução assistida (PAPANIKOLAOU, et al., 2019).

A busca por animais com alto valor genético e a possibilidade do uso de indivíduos com subfertilidade adquirida impulsionou o desenvolvimento de algumas técnicas reprodutivas em equinos, como a inseminação artificial, transferência de embriões, transferência de oócitos e injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ISCI) (BERTOZZO, et al, 2014; HINRICH, 2018). Contudo, pouco se conhece sobre os fatores genéticos que atuam na fertilidade equina, sendo assim, os estudos de genômica aplicada à reprodução de equinos tem focado muito na fertilidade de garanhões (GIESECKE, et al., 2010; HINRICH, 2018).

A implementação de técnicas de biologia molecular na identificação de genes importantes relacionados a características econômicas em equinos, principalmente na seleção de animais de alto valor genético tem sido positivo no melhoramento de várias raças de cavalos em todo o mundo (VIEIRA, 2020). Dentre as várias raças de cavalos, se destaca o Quarto de Milha (QM), que se caracteriza por sua versatilidade possuindo aptidão para diversas modalidades esportivas como rédeas, apatação, conformação, corrida e vaquejada (ALVES, 2021). Por ser uma raça adaptável a qualquer situação, transformou-se em instrumento de força, transporte e difícil de ser derrotado em provas equestres, além de melhorador genético de plantel, contudo os equinos de um modo geral, se comparados com outras espécies, ainda estão aquém quando se trata de avanços relacionados a reprodução (ALVES, 2021).

Neste contexto, por não ter pesquisas relacionadas a caracterização e polimorfismos em receptores de FSH de éguas doadoras de embrião, objetivou – se com este trabalho caracterizar geneticamente e identificar polimorfismos nas regiões promotora e 5'-UTR do gene FSHR em éguas da raça quarto de milha doadoras de embriões, bem como identificar possíveis sítios de ligações nos SNPs.

## **7.2 Material e métodos**

### **7.2.1 Aspectos éticos da pesquisa**

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade

Federal Rural da Amazônia (CEUA/UFRA) sob o número (CEUA n° 6957170620 ID000213).

### 7.2.2 Animais utilizados

Foram utilizadas 92 éguas (*Equus caballus*) da raça Quarto de Milha, pertencentes a haras no Pará (30), Pernambuco (16) e Rio Grande do Norte (46) com idade de aproximadamente 8 anos e peso entre 400 e 500kg. Os animais se encontravam sob responsabilidade técnica de 3 veterinários (1 por estado citado anteriormente), onde os mesmo controlavam a reprodução, sanidade, nutrição e bem estar dos animais. As éguas eram submetidas as mesmas condições sanitárias (vacinas múltiplas anuais, 4 vermifugações/ano, controle de ectoparasitas mensais). Os animais foram submetidos a manejo nutricional e hidrico equivalentes.

#### 7.2.2.1 Obtenção das Amostras

As amostras de sangue foram coletadas através da punção a vacuo da veia jugular em tubos contendo EDTA (4 ml). Em seguida identificadas e armazenadas em caixa térmica refrigeradas e em seguida transferidas para freezer a -20°C, para posterior análises laboratoriais.

#### 7.2.3 Extração de DNA

As amostras de sangue foram submetidas ao protocolo de extração de DNA genômico, realizado pelo método do Fenolclorofórmio desenvolvido por Sambrook et al. (1989). Após as extrações, as amostras de DNA foram submetidas a análise quanto sua integridade à eletroforese em gel de agarose 1,5% e corado com gel red.

#### 7.2.4 Reações em cadeia da polimerase (PCR)

Para realização das reações das PCRs foi desenhado um par de primers que flaqueasse a região 5'UTR e parte da região promotora do gene receptor FSHR de equinos, baseada na sequência depositadas no *Genbank* ID: 100052957. Para ela elaboração dos primers foi utilizado o programa Primer3 (<http://simgene.com/Primer3>) da website

(<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>). As sequências dos primers são For: TCCCCACTGAAAACATAGCC posição:-319:-300 e Rev: AAGGAGACCAGGAGCAAGG posição: 365: 388 o tamanho do produto de amplificação é de 707 pb.

As Reações em Cadeia da Polimerase foram realizadas a um volume final de 25  $\mu$ L utilizando Kit Master mix (Cellco Biotec do Brasil Ltda, São Carlos, SP, Brasil) de acordo com as recomendações do fabricante. As reações foram realizadas em um Termociclador CFX 96 (BIO-RAD, Hercules, CA, USA). As reações seguiram as seguintes condições de temperatura e tempo: Temperatura de desnaturação inicial 95°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 62,5°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, e temperatura de extensão final de 72°C por 5 minutos.

#### 7.2.4.1 Purificação e sequenciamento do produto da PCR.

As purificações dos produtos das PCRs (25  $\mu$ L), foram realizadas com o kit de purificação de DNA em banda de gel de agarose (Ludwig Biotech LTDA, Alvorá, RS, BR), seguindo recomendações do fabricante.

Os produtos das purificações foram submetidas as reações de sequenciamento pelo método de Sanger utilizando o kit BigDye (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as recomendações do fabricante e corridas no sequenciador de DNA ABI3500XL (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

#### 7.2.5 Alinhamento das sequências e identificação dos polimorfismos

Os ferogramas gerados foram editados utilizando o programa computacional FinchTV Versão 1.4.0 (Geospiza Research Team, USA), sendo sempre comparadas com a sequência referencia depositada no *Genbank* ID: 100052957 e alinhadas para comparação da mesma entre os animais para detectar os possíveis polimorfismos através do programa Bioedit (HALL; MCDONNELL, 1999).

A sequência em estudo foi submetida para identificação de segmentos, como potenciais sitios de ligação no programa AliBaba 2.1.

#### 7.2.6 Análises estatísticas

Os SNPs detectados foram tabulados e submetidos ao programa GENEPOP v.5 Raymond M and Rousset F (1995) no qual foi determinado as frequências alélicas, genóticas, os coeficientes de endocruzamento ( $F_{IS}$ ) e as probabilidades para o equilíbrio

de Hardy-Weinberg. Os haplotipos que tiveram frequência igual ou maior a 0,05 foram testados através do teste *ANOVA* como efeito de manejo (três fazendas diferentes, efeito da idade dos animais) utilizando o aplicativo *PROC MIXED* do pacote estatístico do SAS (OnDemand) com nível de significância de 0,05.

### 7.3 Resultados

Após alinhamento as sequências foram identificadas 3 SNPs, sendo 2 na região promotora e 1 na região 5' - UTR (região 5' não traduzida) (Figura 1). O primeiro polimorfismo (SNP 1) na posição -217G>T, onde o alelo G é o mais frequente, foram identificados 3 genótipos, sendo que o GG foi o que mais apareceu. O SNP 2 foi identificado na posição -195G>A, onde o alelo G foi o mais frequente e, entre os genótipos, o GG foi o mais frequente. O SNP 3 foi identificado na posição 127 A>G onde o alelo G foi o mais frequente e entre os genótipos o GG foi o que mais apareceu. Os valores dos coeficientes de endocruzamentos ( $F_{IS}$ ) foram todos positivos para ambos os SNPs, ou seja, indicando possíveis relações de endocruzamentos. Todos os SNPs apresentaram desvios de Hardy-Weinberg ( $p < 0,05$ ) (Tabela 1).

**Figura 1:** Sequência caracterizada da região do gene FSHR de equinos.

```

-320 TCCCCACTG AAAACATAGC CGCTCCTTAG ATCACTTGGG TTAGTCAGTT ATCTCAGCTG ATAACCCAGT-251
-250 CAAGAGTGCC TCCCACCCAC AGAGATCTGC CTCGGGCTCC CTACCCACCC CGCCTGTCTT CTGAGCAATG-181
-180 CCATTACAG TTATTAATTA CAGAGAGAAA GAGGATCAAT GACCAGAACC CAGAAGTTCG GGTTTTCTAT-111
-110 CAAGCGGGCT GGAAGGAGAA GGTGATGCCA AGACTAGAAA CAGGTCCCTG CTCTTCACTT AGTGGCACTC -41
-40 TTAGTGATGT GTCATATTGT AGGTGTGTGT TTGTTTGGAG AAAGTCAATG ATGTCATTCT TCTGAAAAGA 30
31 GAATGGTGAC CAGCAGGGAC ACTTCTGCAG TGAAAGAATG TGAACTACTC CAGACATACA TCGAGCTTCT 100
101 ATTTGCTCTC TTCTTGGGT CAGGGCATAA GAAACCGATC CTGAAAGATA AGGGAGTAGA TTATCTTGCC 170
171 CCGGAATCA CTGCTGGCAC AGAGGAATTG TGCTATTTGT CTGGAAGTGA CAAAAAAAAA GCATCATTTG 240
241 GTGGGTCATG TGACTCTCCA CTCTCAAGGC GGATCTCTTC CAAGGGCTCT GTGTGGAGGC TCTGAAATCT 310
311 GTGGAGATTT TTCTCTGCAG ATGCAGGAAG AAAGCAGGTG GATGGATAAA TAAGCATGGC CTTGCTCCTG 380
381 GTCTCCTT

```

Em sublinhados estão as posições dos primers. **Sequência em preto:** representa a região promotora. **Sequência em vermelho:** representa a região 5'UTR. **Sequência em cinza:** início do éxon 1. **Letras em amarelo:** representam as posições dos SNPs.

**Tabela 1.** Posição dos SNPs e respectivas descrições estatísticas na região promotora do gene FSHR em éguas quarto de milha doadoras de embrião.

SNPs	Alelos	Freq	Genótipos	Freq	$F_{IS}$	PHW
SNP1	G	0,939	GG	0,902	0,0009	0,025
-217G→T	T	0,061	GT	0,073		
			TT	0,024		
SNP2	A	0,104	AA	0,049	0,0003	0,003
-195G→A	G	0,896	AG	0,110		
			GG	0,841		
SNP3	A	0,271	AA	0,145	0,0002	0,002
127A→G	G	0,729	AG	0,253		
			GG	0,602		
<b>TOTAL</b>						0,00001

**SNPs:** Polimorfismo de base única; **Freq:** Frequência;  **$F_{IS}$ :** coeficiente de endocruzamento; **PHW:** Probabilidade de Hardy-Weinberg.

A análise de desequilíbrio de ligação só foi significativa ( $P < 0,05$ ) entre o SNP1 e o SNP2, ou seja, indicando que existe maior interação de ligação entre os mesmos (Tabela 2).

**Tabela 2.** Análise de desequilíbrio de ligação entre os SNPs.

SNP vs SNP	P-Valor	S.E
SNP1 vs SNP2	0,00021	0,000191
SNP1 vs SNP3	0,39201	0,004892
SNP2 vs SNP3	0,47382	0,005371

Um total de 12 haplótipos foram identificados, onde somente 4 tiveram frequências igual ou superior a 0,05. Esses haplótipos foram avaliados quanto ao número de embriões produzidos na estação de 2021 e o haplótipo G/G/A teve o maior número de embriões

produzidos enquanto que o G/G/G apresentou o menor número de embriões, com tudo não houve diferença significativa do número de embriões produzidos entre os haplótipos ( $>0,05$ ) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Identificação de haplótipos a partir de 3 SNPs do gene FSHR.

Haplótipos	Frequências	NEPE2021 (Média±DP)
G/A/G	0,01	
<b>G/G/A</b>	<b>0,14</b>	<b>0,827±0,541</b>
<b>G/G/G</b>	<b>0,46</b>	<b>0,664±0,464</b>
<b>G/G/GA</b>	<b>0,23</b>	<b>0,761±0,380</b>
<b>G/GA/G</b>	<b>0,05</b>	<b>0,741±0,354</b>
G/GA/A	0,01	
G/GA/GA	0,01	
GT/A/G	0,01	
GT/G/G	0,02	
GT/GA/G	0,02	
GT/GA/GA	0,01	
T/A/G	0,01	

**NEPE2021:** Número de embriões produzidos na estação de 2021.

Ao longo de toda sequência selvagem analisada foram identificados 74 segmentos como potenciais sítios de ligações, sendo que nas posições dos SNPs foram identificados importantes sítios de ligações. Na posição -217G>T foram identificados dois segmentos de ligações para Sp1 (Proteína específica 1) e TFAP-2alpha (Proteína de ativação de ligação nos reguladores-2 alfa), enquanto que na posição -195G>A foi identificado um segmento de sítios de ligação para GR (*Receptor de Glicocorticoide*). Quando a sequência mutante é avaliada, o total de segmentos cai para 71, pois os referidos sítios de ligações são perdidos.

#### 7.4 Discussão

A identificação de SNPs no gene do FSHR, independente de espécie, é observada em toda sua extensão, desde a região reguladora (promotora e 5'-UTR), regiões

codificadoras e a porção 3'-UTR. Como observado em vários organismos, desde humanos (PASCHOLIDOU et al., 2020) e animais de produção como ovinos (CHU et al., 2012; WANG et al., 2019), suínos (ZHANG et al., 2015) e em aves de postura (KANG et al., 2012; LI et al., 2019). Agora foram identificados os primeiros SNPs no gene eFSHR, na raça QM. A região promotora apresentou-se variada semelhante a regiões promotoras de outros genes de interesse reprodutivos como o receptor de melatonina em búfalos (BARBOSA et al., 2017) e no gene da leptina em bovinos (GUIMARÃES et al., 2016).

As altas frequências alélicas em todos os SNPs também refletem nos coeficientes de endocruzamentos, os quais revelam que as éguas apresentam um alto grau de consanguinidade, assim como nos desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P < 0,05$ ). Pois as altas frequências alélicas e genotípicas estão diretamente associadas ao processo de seleção pelos quais os animais são submetidos, devido ao interesse dos produtores em características de alto valor econômico. Silva-Filho et al. (2008) observaram significativos graus de consanguinidades em seis raças de cavalos, inclusive a raça QM através de marcadores não gênicos (DNA microsatélite), o que consequentemente tinha desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg.

O desequilíbrio de ligação entre o SNP1 e SNP2 está diretamente associado aos padrão de variação gênica e genotípica dos dois SNPs, pois o SNP3 apresenta maior variação gênica e genotípica e portanto, não tem forte associação com o SNP1 e SNP2. Essa observação também é vista quando se compara o padrão gênico e genotípico de SNPs entre os genes PRND e PRNP em cavalos (WON, et al., 2020).

A produção média de embriões após inseminação está diretamente associado a um complexo bioquímico interfolicular que ativa a inibina no qual controla a síntese e liberação de FSH, enquanto que o Estradiol atua na diminuição da expressão de FSHR e LHR nos folículos. Como decorrência, ocorre o aumento de IGF-1 nos fluídos do folículo dominante, alterando o fluxo sanguíneo nos demais folículos, ou seja, liberando apenas um folículo (GURGEL, et al., 2008). Essa explicação justifica a baixa taxa de produção de embriões produzidos pelas doadoras durante a estação reprodutiva de 2021 e não foi distinta entre os haplótipos.

Dos mais de 70 segmentos como potenciais sítios de ligação de fatores que auxiliam e regulam a expressão gênica. No SNP1 foi destacado o fator de transcrição SP1 (Proteína específica 1) que atua na regulação de muitos genes se ligando nos promotores boxes GT ou GC e estão envolvidos na diferenciação celular e no desenvolvimento embrionário (THOMAS, et al., 2007).

Em relação ao fator TFAP-2alpha, o mesmo se liga nas regiões reguladoras ricas em GC nas região reguladora 5' e está diretamente associada aos desenvolvimento embrionário de muitas espécies quando envolvida com outros genes (PRAETORIUS, et al., 2013). O GR (Receptor de glicocorticoides) foi o sítio de ligação encontrado no SNP2 e sua ausência está diretamente associada com a resistência a glicocorticoides (CHARMANDARI, et al., 2007).

## 7.5 Conclusão

A região reguladora do gene FSHR apresenta consideráveis variações polimórficas para análises populacionais que podem estar envolvidos nos processos de seleção assistida por marcadores moleculares para características envolvidas em fatores reprodutivos, funcionando dessa forma, como marcadores de alterações reprodutivas em éguas.

## 8 REFERÊNCIAS

ALVES, H. Quarto de Milha Cresce em 2021. Associação Brasileira dos Criadores de Cavalos Quarto de Milha. ABQM, 2021. Disponível em: <https://online.fliphtml5.com/izvg/dklc/#p=12>

BARBOSA, E. M.; SOUZA, B. B.; GUIMARÃES, R. C.; SILVA, L. K. N.; AZEVEDO, J. S. N.; GONÇALVES, E. C.; RIBEIRO, H. F. L.; ROLIM-FILHO, S. T.; SILVA-FILHO, E. Polymorphisms in the melatonin receptor gene promoter and their associations with fertility characteristics in buffalo herd in Eastern Amazon. **Genetics Molecular Research**, 25;16(2), 2017.

BERTOZZO, B. R.; SAMPAIO, B. F. B.; BENDER, E. S. C.; PAGNONCELLI, R. R.; SILVA, E. V. C.; ZÚCCARI, C. E. S. N. Vantagens e Desafios das Biotécnicas Avançadas Utilizadas na Reprodução Equina Assistida. **Boletim de Indústria Animal** 71(1): 84-93, 2014.

BRNIARCZYK, J. K.; KĘDZIA, A.; NOWAK, W.; KOŚCIŃSKI, Ł.; LEWANDOWSKI, M.; GOŹDZICKA-JÓZEFIAK, A. Polymorphisms in the P1 promoter of the IGF-1 gene in children with growth disorders. **Pediatric Endocrinology**

**Diabetes Metabolism**, 20(4):136-42, 2015.

CHARMANDARI, E.; KINO, T.; ICHIJO, T.; JUBIZ, W.; MEJIA, L.; ZACHMAN, K.; CHROUSOS, G. P. A novel point mutation in helix 11 of the ligand-binding domain of the human glucocorticoid receptor gene causing generalized glucocorticoid resistance. **Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, 92(10):3986-90, 2007.

CHU, M. X.; GUO, X. H.; FENG, C. J.; LI, Y.; HUANG, D. W.; FENG, T.; CAO, G. L.; FANG, L.; DI, R.; TANG, Q. Q.; MA, Y. H.; LI, K. Polymorphism of 5' regulatory region of ovine FSHR gene and its association with litter size in Small Tail Han sheep. **Molecular Biology Reports**, 39(4):3721-5, 2012.

GIESECKE, K.; SIEME, H.; DISTL, O. Infertility and candidate gene markers for fertility in stallions: a review. **The Veterinary Journal**, 185(3):265-71, 2010.

GUIMARÃES, R. C.; AZEVEDO, J. S.; CORRÊA, S. C.; CAMPELO, J. E.; BARBOSA, E. M.; GONÇALVES, E. C.; SILVA-FILHO, E. Polymorphisms in the leptin gene promoter in Brazilian beef herds. **Genetics Molecular Research**, 2;15(4), 2016.

GURGEL, J. R. C.; VIANA, C. H. C.; PEREZ, E. G. A.; NICHI, M. Dinâmica folicular em éguas: aspectos intrafoliculares. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.32, n.2, p.122-132, 2008.

HALL, J. M.; MCDONNELL, D. P. The Estrogen Receptor  $\beta$ -Isoform (ER $\beta$ ) of the Human Estrogen Receptor Modulates ER $\alpha$  Transcriptional Activity and Is a Key Regulator of the Cellular Response to Estrogens and Antiestrogens. **Endocrinology**, Vol. 140, pag. 5566–5578, 1999.

HINRICH, K. Assisted reproductive techniques in mares. **Reproduction in Domestic Animals**, 53, 4–13, 2018.

KANG, L.; ZHANG, N.; ZHANG, Y.; YAN, H.; TANG, H.; YANG, C.; WANG, H.; JIANG, Y. Molecular characterization and identification of a novel polymorphism of 200 bp indel associated with age at first egg of the promoter region in chicken follicle-

stimulating hormone receptor (FSHR) gene. **Molecular Biology Reports**, 39(3):2967-73, 2012.

LI, X.; LU, Y.; LIU, X.; XIE, X.; WANG, K.; YU, D. Identification of chicken FSHR gene promoter and the correlations between polymorphisms and egg production in Chinese native hens. **Reproduction Domestic Animals**, 54(4):702-711, 2019.

LIANG, S.; SU, Y. Q.; LIANG, Y. L.; WU, F.; ZHANG, H.; HONG, W. X. Allele Frequency and Distribution of Single Nucleotide Polymorphisms in Promoter Region of Gene Encoding the Kidd Blood Group Antigens. **Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi**, 28(1):300-306, 2020.

LIU, H.; GUO, T.; GONG, Z.; YU, Y.; ZHANG, Y.; ZHAO, S.; QIN, Y. Novel FSHR mutations in Han Chinese women with sporadic premature ovarian insufficiency. **Molecular Cellular Endocrinology**, 15;492:110446, 2019.

LUO, J.; WANG, L.; SHI, H. C.; ZENG, Q. Q.; WU, Q. Y.; LI, W. W. Relationship between the FSHR Thr307Ala-Asn680Ser gene polymorphism and male infertility: A meta-analysis. **Zhonghua Nan Ke Xue**, 23(12):1121-1126, 2017.

PAPANIKOLAOU, I. G.; GIANNELOU, P.; ANAGNOSTOU, E.; MAVROGIANNI, D.; DRAKAKIS, P.; LOUTRADIS, D. Combined study on the single nucleotide polymorphisms in the follicle-stimulating hormone receptor (Ser680Asn) and anti-Müllerian hormone receptor type II (-482A>G) as genetic markers in assisted reproduction. **Hormone. Molecular Biology Clinical Investigation**, 25;38(1), 2019.

PRAETORIUS, C.; GRILL, C.; STACEY, S. N.; METCALF, A. M.; GORKIN, D. U.; ROBINSON, K. C.; OTTERLOO, V. E.; KIM, R. S.; BERGSTEINSDOTTIR, K.; OGMUNSDOTTIR, M. H.; MAGNUSDOTTIR, E.; MISHRA, P. J.; DAVIS, S. R.; GUO, T.; ZAIDI, M. R.; HELGASON, A. S.; SIGURDSSON, M. I.; MELTZER, P. S.; MERLINO, G.; PETIT, V.; LARUE, L.; LOFTUS, S. K.; ADAMS, D. R.; SOBHIAFSHAR, U.; EMRE, N. C.; PAVAN, W. J.; CORNELL, R.; SMITH, A.G.; MCCALLION, A. S.; FISHER, D. E.; STEFANSSON, K.; STURM, R. A.; STEINGRIMSSON, E. A polymorphism in IRF4 affects human pigmentation through a

tyrosinase-dependent MITF/TFAP2A pathway. **The Cell**, 21;155(5):1022-33, 2013.

PASCHALIDOU, C.; ANAGNOSTOU, E.; MAVROGIANNI, D.; RAOUASNTE, R.; KLIMIS, N.; DRAKAKIS, P.; LOUTRADIS, D. The effects of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) -29 and Ser680Asn polymorphisms in IVF/ICSI. **Hormone Molecular Biology Clinical Investigation**, Mar 2;41(2), 2020.

RAMÍREZ-BELLO, J.; JIMÉNEZ-MORALES, M. Functional implications of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in protein-coding and non-coding RNA genes in multifactorial diseases. **Gaceta Médica México**, 153(2):238-250, 2017.

SAMBROOK, J.; MANIATIS, T; FRITSCH, E. F. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Second Edition (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory). 1989.

SILVA-FILHO, E.; SCHNEIDER, M. P. C.; SILVA, A. L. C. Variabilidade genética de cavalos baseada em DNA microssatélites. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 76-87, 2008.

SZYMAŃSKA, K.; KAŁAFUT, J.; PRZYBYSZEWSKA, A.; PAZIEWSKA, B.; ADAMCZUK, G.; KIEŁBUS, M.; RIVERO-MÜLLER, A. FSHR Trans-Activation and Oligomerization. **Frontiers Endocrinology**, 13;9:760, 2018.

THOMAS, K.; WU, J.; SUNG, D. Y.; THOMPSON, W.; POWELL, M.; MCCARREY, J.; GIBBS, R.; WALKER, W. SP1 transcription factors in male germ cell development and differentiation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 30;270(1-2):1-7, 2007.

VIEIRA, C. E. M. **Perfil biométrico de equinos quarto de milha na região de Manaus. Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - PPGCAN da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, .p 36, 2020.

ULLOA-AGUIRRE, A.; ZARIÑÁN, T.; JARDÓN-VALADEZ, E.; GUTIÉRREZ-SAGAL, R.; DIAS, J. A. Structure-Function Relationships of the Follicle-Stimulating Hormone Receptor. **Frontiers Endocrinology**, 29;9:707, 2018.

WON, S. Y.; KIM, Y. C.; DO, K.; JEONG, B. H. Absence of Strong Genetic Linkage Disequilibrium between Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in the Prion Protein Gene (*PRNP*) and the Prion-Like Protein Gene (*PRND*) in the Horse, a Prion-Resistant Species. **Genes**, 7;11(5):518, 2020.

WANG, D.; DU, X.; LI, Y.; LI, Q. A polymorphism in the transcriptional regulatory region strongly influences ovine FSHR mRNA decay. **Reproduction Domestic Animals**, 54(1):83-90, 2019.

ZHANG, X. D.; ZHU, H. Y.; ZHOU, J.; WANG, N.; ZHOU, N.; HUANG, L.; WU, T.; FENG, Y. F.; DING, Y. Y.; YIN, Z. J. Relationship between polymorphisms in exon 10 of FSHR gene and litter size in swine. **Genetics Molecular Research**, 27;14(3):8252-61, 2015.

## 9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

a) A revisão de literatura acerca do assunto abordado no capítulo II, “polimorfismos no gene receptor de FSH ocasiona impactos reprodutivos positivos em éguas?”, foi de suma importância para se compreender como funciona a fisiologia reprodutiva da égua ligada a expressão do hormônio FSH e o seu receptor (FSHR), assim como, os polimorfismos que ocorrem no FSHR, através da busca de trabalhos iniciais, até os dias atuais.

b) No capítulo II: “caracterização genética da região promotora do gene do receptor de FSH em éguas da raça quarto de milha”. A região reguladora do gene FSHR apresentou variações polimórficas para análises populacionais podendo ser considerado um gene candidato nos processos de seleção assistida por marcadores moleculares para características envolvidas na reprodução, porém que não seja a produção de embriões em equinos, haja visto que a liberação folicular não está diretamente associada com a quantidade de folículos em maturação, mas pode ser empregada em estudos que avaliam a onda folicular em éguas. Sendo necessários coletas de dados relacionados a onda folicular para responder dessa forma a hipótese e objetivos do capítulo II do presente trabalho.