ARNALDO SHINDI MARUYAMA

Perfil de cortisol e sinalização dos glicocorticoides em corpo lúteo canino

São Paulo

2018

ARNALDO SHINDI MARUYAMA

Perfil de cortisol e sinalização dos glicocorticoides em corpo lúteo canino

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientadora:

Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa Keohane

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3715
FMVZ

Maruyama, Arnaldo Shindi
Perfil de cortisol e sinalização dos glicocorticoides em corpo lúteo canino / Arnaldo Shindi Maruyama. – 2018.
48 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa Keohane.

1. Cortisol. 2. Corpo lúteo. 3. Insulina. 4. Diestro. 5. RNA-Seq. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Maria Aparecida Laet, CRB 5673-8, da FMVZ/USP.

Certificado da Comissão de Ética (Artigo I)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Sinalização da insulina no corpo lúteo bovino e canino sob influência de concentrações altas e baixas de 17?-Estradiol", protocolada sob o CEUA nº 2630100315 (ID 002385), sob a responsabilidade de **Paula de Carvalho Papa** *e equipe; Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa; Profa. Dra. Maria Denise Lopes; Prof. Dr. Roberto Sartori Filho; Prof. Dr. Mariusz Kowalewski ; Prof. Dr. Mário Binelli; Prof. Dr. Francisco Palma Rennó; Prof. Dr. Ubiratan Fabres Machado; Dra. Liza Margareth Medeiros de Carvalho Sousa; Dra. Ana Augusta Pagnano Derussi; Dr. Bruno Moura Monteiro; Profa. Dra. Inês Cristina Giometti* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 18/05/2016.

We certify that the proposal "Insulin signaling in bovine and canine corpus luteum under the influence of high and low 17?-estradiol concentrations ", utilizing 16 Bovines (16 females), protocol number CEUA 2630100315 (ID 002385), under the responsibility of **Paula de Carvalho Papa** *and team; Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa; Profa. Dra. Maria Denise Lopes; Prof. Dr. Roberto Sartori Filho; Prof. Dr. Mariusz Kowalewski ; Prof. Dr. Mário Binelli; Prof. Dr. Francisco Palma Rennó; Prof. Dr. Ubiratan Fabres Machado; Dra. Liza Margareth Medeiros de Carvalho Sousa; Dra. Ana Augusta Pagnano Derussi; Dr. Bruno Moura Monteiro; Profa. Dra. Inês Cristina Giometti* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 05/18/2016.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 12/2014 a 11/2018 Área: Reprodução Animal

Origem:

Espécie:	Bovinos	sexo:	Fêmeas	idade:	a	N:	16
Linhagem:	Bos taurus			Peso:	a		

Local do experimento:

São Paulo, 05 de novembro de 2018

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária: Armando de Salles Oliveira CEP 05508-270 São Paulo/SP - Brasil - tel: 55 (11) 3091-7676
Horário de atendimento: 2ª a 5ª das 7h30 às 16h : e-mail: ceuavet@usp.br
CEUA N 2630100315

Certificado da Comissão de Ética (Artigo II)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "A influência do cortisol na resposta luteínica ao estímulo da insulina em cadelas cíclicas", protocolada sob o CEUA nº 6858110716 (ID 003114), sob a responsabilidade de **Paula de Carvalho Papa** *e equipe; Arnaldo Shindi Maruyama* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 03/01/2017.

We certify that the proposal "The influence of cortisol in cyclic dog's corpus luteum stimulated by insulin ", utilizing 20 Dogs (20 females), protocol number CEUA 6858110716 (ID 003114), under the responsibility of **Paula de Carvalho Papa** *and team; Arnaldo Shindi Maruyama* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 01/03/2017.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 09/2016 a 01/2019 Área: Reprodução Animal

Origem:	Animais de proprietários						
Espécie:	Cães	sexo:	Fêmeas	idade:	6 a 24 meses	N:	20
Linhagem:	Sem raça definida			Peso:	10 a 35 kg		

Local do experimento: OSH e coleta de amostras de saliva serão realizadas na unidade móvel do Projeto Temático e análises laboratoriais na FMVZ-USP

São Paulo, 05 de novembro de 2018

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária: Armando de Salles Oliveira CEP 05508-270 São Paulo/SP - Brasil - tel: 55 (11) 3091-7676
Horário de atendimento: 2ª a 5ª das 7h30 às 16h : e-mail: ceuavet@usp.br
CEUA N 6858110716

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MARUYAMA, Arnaldo Shindi

Título: **Perfil de cortisol e sinalização dos glicocorticoides em corpo lúteo canino**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

DEDICATÓRIA

À minha família, que sempre me apoiou em todas as minhas escolhas, me orientou e me deu a base para chegar até aqui. Ao meu noivo, Ed que teve muita paciência comigo durante esta fase, me deu a segurança e o apoio que eu precisei. À Merlotzinha que me fez acordar mais feliz todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Nesses mais de dois anos de muito trabalho tive a sorte de encontrar a ajuda de muitas pessoas às quais quero deixar meu agradecimento. Primeiro à minha orientadora Dra. Paula de Carvalho Papa Keohane, que me proporcionou esta oportunidade e sempre me desafiou a tentar mais, muito obrigado pelo apoio e pelos ensinamentos, pela compreensão e pelo diálogo fácil e com muito carinho.

Agradeço especialmente a Fran, minha amiga, minha parceira de jornada, por deixar meus dias no L.E.M.E. muito melhores. Agradeço pelos nossos cafés da manhã e da tarde, aos incontáveis ensinamentos, ao companheirismo nas coletas, nos almoços, nas alegrias, nas gordices, nas cantorias, nas tristezas e frustrações também. Sem você não teria conseguido nem metade do que consegui, muito obrigado.

Aos meus amigos do L.E.M.E. pela ajuda e pelos momentos de descontração. Obrigado à Vic por ter me cedido sua clínica para que pudesse realizar uma parte do experimento, também pelas conversas sempre boas.

À Dra. Olívia Mendonça-Furtado por me receber em seu laboratório e por realizar as análises das amostras de fezes das cadelas, por me orientar em momentos de dificuldade e por dividir momentos de boas risadas também.

À Dra. Cristiane Pizzutto pela ajuda no desenvolvimento do projeto e principalmente na fase final, pelos conselhos, pela orientação e por me tranquilizar.

Aos meus amigos, em especial Coketa, C&A, Fura, Lu, Annie, Tassi, Naila, Luana, Pat (Gêmea) e Aline por me apoiarem durante todo este processo, ouvindo meus problemas e muitas vezes me tranquilizando e aconselhando.

À Dra. Erica Duque do ICB pelos conselhos sobre cultivo celular e estímulo com glicocorticoides. Ao Dr. Adroaldo Zanella por oferecer seu laboratório e seu apoio para a análise das amostras de fezes das cadelas.

Às médicas veterinarias Ivana e Carol e suas equipes por permitirem que eu pudesse acompanhar as campanhas de castração, mesmo sem conseguir agregar os resultados nesta dissertação, sempre foram muito educadas e simpáticas.

À Dra. Camila Infantosi Vannucchi, suas orientadas Letícia, Maíra e toda a equipe da professora Camila e à Dra. Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção, pelos conselhos

durante a elaboração do projeto e pelos ensinamentos sobre citologia vaginal para a avaliação do diestro em cadelas.

A todos os tutores que tiveram a paciência de coletar as amostras de suas cadelas.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Demanda Social concedido de novembro de 2016 a fevereiro de 2017. E apoio da FAPESP: processo n° 2016/22589-4 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – São Paulo/Brasil (FAPESP), concedido de março de 2017 a outubro de 2018.

RESUMO

MARUYAMA, A.S. **Perfil de cortisol e sinalização dos glicocorticoides em corpo lúteo canino**. 2018. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Glicocorticoides (GCs) modulam a reprodução, interferindo na produção de hormônios gonadais, estradiol (E2) e progesterona (P4). Concomitantemente, E2 e P4 também influenciam a liberação de cortisol. Além disso, em altas concentrações os GCs interferem na via de sinalização da insulina prejudicando o funcionamento dos órgãos, incluindo os do sistema reprodutivo bem como a produção de P4 pelo corpo lúteo (CL). O CL utiliza glicose para manter sua atividade, e o cortisol interfere na via de sinalização da glicose em diversos tecidos, porém ainda não existem estudos quanto à sua atividade no CL canino, tampouco quanto à presença de genes relacionados à via de sinalização dos GCs neste órgão. Os objetivos deste estudo foram caracterizar a expressão dos genes relacionados à via de sinalização dos GCs e da insulina em CL de cadelas cíclicas e identificar expressão diferencial destes genes entre os dias 20 e 60 do diestro, que correspondem à fase final de crescimento do CL e à fase de regressão luteínica, respectivamente. Ainda, avaliar as concentrações basais de cortisol salivar (CS) e metabólitos fecais de glicocorticoides (MGFs) em diferentes dias do diestro (10, 20, 30, 40, 50 e 60) de cadelas cíclicas, comparando com os níveis de E2 e P4 já publicados; correlacionar os valores obtidos nas duas técnicas; e estabelecer um intervalo de valores basais de CS e MFGs para o diestro. Para esta pesquisa foram selecionadas 28 cadelas cíclicas saudáveis; foi realizado o sequenciamento de nova geração (RNA-Seq) dos CLs coletados de 18 animais em dias específicos do diestro (dia 10, 20, 30, 40, 50 e 60 pós-ovulação); das outras 10 cadelas foram coletadas amostras de fezes e saliva, durante todo o diestro, e realizada mensuração da concentração de MFGs e CS. Nos resultados de RNA-Seq foi identificada a expressão dos genes NR3C1, HSD11B1, HSD11B2, SLC2A4, INSR e IRS1. Os genes NR3C1 ($p>0,3$; FDR>0,6) e SLC2A4 ($p>0,02$; FDR>0,1) não apresentaram expressão diferencial no diestro. Os genes HSD11B1 ($p=0,0001$; FDR=0,0021), HSD11B2 ($p=0,013$; FDR=0,06), INSR ($p=0,002$; FDR=0,01) mostraram maior expressão no dia 20 do diestro, quando comparado ao dia 60. O gene IRS1 ($p=0,0006$; FDR= 0,006) estava mais expresso no dia 60 do diestro em relação do dia 20. As dosagens hormonais demonstraram que no dia 10 do diestro (CS=0,0656 ± 0,0237µg/dL e MGFs=110,41 ± 46,51pg/ng) as duas mensurações apresentaram concentrações menores que nos demais dias do diestro (CS=0,1027 ± 0,0496µg/dL e MFGs=220,22 ± 183,74pg/ng). A

concentração média de CS=0,0972µg/dL (0,011-0,246µg/dL) e MFGs=189,875pg/ng (9pg/ng-1067,2pg/ng) foi definida para o diestro canino. Estes resultados sugerem que o CL canino também é influenciado pelo cortisol circulante da mesma forma que outros tecidos já estudados, podendo interferir na via de sinalização da insulina e, consequentemente, prejudicar seu funcionamento e o sucesso reprodutivo. Além disso, em relação aos resultados das dosagens hormonais, os níveis baixos de CS e MFGs no dia 10 do diestro corroboram com os achados em literatura e com a queda de E2 neste mesmo período, o que sugere uma associação entre a produção de ambos os hormônios.

Palavras-chave: Cortisol. Corpo lúteo. Insulina. Diestro. RNA-Seq.

ABSTRACT

MARUYAMA, A. S. **Cortisol profile and glucocorticoid signaling pathways in canine corpus luteum**. 2018. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Glucocorticoids (GCs) modulate reproduction by interfering in the gonadal hormones production, estradiol (E2) and progesterone (P4). Likewise, E2 and P4 influence release of cortisol. Furthermore, high concentrations of GCs may harm the functioning of organs, including reproductive organs and progesterone (P4) production by the corpus luteum (CL). CL utilizes glucose to maintain its own activity and cortisol interferes with the glucose signaling pathway in several tissues. Studies characterizing cortisol activity and expression of genes related to GC signaling pathways in canine CL are still scarce. The aims of this study were to characterize the expression of genes related to GCs and insulin signaling pathways in cyclic canine CL and to identify differential expression of these genes between day 20 and day 60 of diestrus which correspond, respectively to luteal final growth and regression phases. Moreover to evaluate the basal concentrations of salivary cortisol (SC) and fecal glucocorticoid metabolites (FGMs) on different days of diestrus (10, 20, 30, 40, 50 e 60) in cyclic bitches, moreover to compare E2 and P4 levels already published. As well as to correlate the values of SC and FGMs, and also to establish an interval of basal concentrations of SC and FGMs for diestrus. For this research 28 healthy cyclic bitches were selected; RNA-Seq of the corpora lutea from 18 animals on specific days of diestrus (day 10, 20, 30, 40, 50, 60) was made. Saliva and fecal samples were collected from the other 10 bitches during diestrus phase. Enzyme immunoassay was made to measure the concentrations of SC and FGMs. The RNA-Seq results identified the expression of the genes NR3C1, HSD11B1, HSD11B2, SLC2A4, INSR e IRS1. No difference on the expression of NR3C1 ($p>0,3$; $FDR>0,6$) and SLC2A4 ($p>0,02$; $FDR>0,1$) was observed during diestrus. Nevertheless HSD11B1 ($p=0,0001$; $FDR=0,0021$), HSD11B2 ($p=0,013$; $FDR=0,06$), INSR ($p=0,002$; $FDR=0,01$) showed a higher expression on day 20 of diestrus and the gene IRS1 ($p=0,0006$; $FDR= 0,006$) presented higher expression on day 60 of diestrus. Results related to hormonal evatuations showed lower SC and FGMs concentrations on day 10th (SC=0,0656 ± 0,0237µg/dL and FGMs=110,41 ± 46,51pg/ng) than on the other days of diestrus (SC=0,1027 ± 0,0496 µg/dL e FGMs=220,22 ± 183,74 pg/ng). Average concentrations of SC=0,0972µg/dL (0,011-0,246µg/dL) and FGMs=189,875pg/ng (9pg/ng-1067,2pg/ng) were defined for canine diestrus. These data suggest that canine CL is influenced by cortisol

similarly to other tissues in which cortisol may interfere in the insulin signaling pathway and, consequently, its function. Besides that, lower levels of SC and FGMs on day 10th of the diestrus corroborate with the literature data and with the decrease in E2 production at the same period. This data suggest that the production of both hormones are associated.

Keywords: Cortisol. Corpus luteum. Insulin. Diestrus. RNA-Seq.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14

2 Caracterização da expressão gênica associada às vias de sinalização da insulina e dos glicocorticoides no corpo lúteo de cadelas cíclicas 17

2.1 INTRODUÇÃO 19

2.2 MATERIAL E MÉTODOS 21

2.2.1 Animais e coleta de amostras 21

2.2.2 Extração de RNA 21

2.2.3 Construção das bibliotecas de cDNA e sequenciamento de RNA 22

2.2.4 Análise de dados 22

2.3 RESULTADOS 22

2.4 DISCUSSÃO 23

2.5 CONCLUSÃO 24

2.5 AGRADECIMENTOS 24

REFERÊNCIAS 25

3 Caracterização do perfil de cortisol salivar e metabólitos fecais de glicocorticoides em cadelas durante o diestro não gestacional 31

3.1 INTRODUÇÃO 32

3.2 MATERIAL E MÉTODOS 34

3.3 RESULTADOS 36

3.4 DISCUSSÃO 39

3.5 CONCLUSÃO 40

3.6 AGRADECIMENTOS 40

REFERÊNCIAS 41

4 **CONCLUSÕES** 44

REFERÊNCIAS 45

1 INTRODUÇÃO

A reprodução é um dos processos de grande foco tanto na medicina veterinária quanto na medicina humana. O estresse e os glicocorticoides (GCs) circulantes afetam a reprodução animal (ex: cortisol); altas concentrações de cortisol estão associadas a alterações reprodutivas como supressão do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG), redução da gametogênese, perda embrionária e aborto (Dobson e Smith, 2000; Whirledge e Cidlowski, 2010; Geraghty e Kaufer, 2015; Whirledge e Cidlowski, 2017). Assim como os GCs podem afetar a produção de hormônio gonadais, estradiol (E2) e progesterona (P4), os hormônios esteroides gonadais também podem afetar a produção de GCs, interferindo diretamente no eixo HHA (Handa e Weiser, 2014; Gallelli *et al.*, 2015).

A elevação na concentração de cortisol pode estar relacionada a um estímulo estressante que ativa o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), induzindo a liberação de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico), levando à síntese e aumento da secreção de cortisol pelo córtex da adrenal.

A mensuração de cortisol plasmático é um indicador de estresse e bem-estar animal amplamente utilizado (McDonald, 1980; Beerda *et al*., 1997). Métodos de dosagens hormonais não invasivos interferem menos nos resultados, principalmente na mensuração de cortisol basal, portanto estão sendo cada vez mais utilizados; dentre estes métodos, a dosagem da concentração de cortisol salivar e a de metabótitos fecais de glicocorticoides (MFGs) são métodos altamente confiáveis (Beerda *et al.*, 1998; Schatz & Palme, 2001; Dreschel e Granger, 2009; Bennet e Hayssen, 2010; Obayashi, 2013; Glenk *et al*., 2014; Cummings *et al*., 2007; Vasconcellos *et al*., 2011).

Mesmo em concentrações basais os GCs possuem função moduladora em diversos órgãos, inclusive nos órgãos do sistema reprodutivo, modulando a ação e produção de diversas citocinas e prostaglandinas necessárias para a ovulação, luteólise, desenvolvimento placentário, implantação embrionária, crescimento fetal e indução do parto (Hillier e Tetsuka, 1998; Andersen, 2002; Michael *et al.*, 2003; Chida *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2014; Erichsen *et al.*, 2010; Wyrwoll, 2014).

A ação dos GCs depende do momento em que está ocorrendo, da sua concentração e da regulação de sua atuação pela expressão dos receptores de glicocorticoides (GRs/NR3C1) e por duas enzimas, 11-beta-hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1 (11βHSD1), que converte cortisona na forma ativa, cortisol, e 11-beta-hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2 (11βHSD2), que converte cortisol em cortisona (DUONG *et al.*, 2012).

Tanto os GRs quanto as enzimas 11βHSD1 e 11βHSD2 já foram identificadas em diversos órgãos do sistema reprodutor de humanos, vacas e camundongos (Benediktsson *et al.*, 1992; Michael *et al.*, 1997; Tetsuka, 1999; Tetsuka *et al.*, 2003; McDonald *et al.*, 2006), inclusive em corpo lúteo (CL) de ratos e vacas (Waddell, 1996; Michael *et al.*, 1997; Tetsuka *et al.*, 2003; Komiyama *et al.*, 2008), porém ainda não foram descritos em cães e os mecanismos moleculares pelos quais os GCs interferem na reprodução ainda não estão totalmente esclarecidos. Técnicas de sequenciamento de nova geração são ferramentas efetivas para identificar os padrões de expressão de transcritos e genes diferentemente expressos (Ling *et al.*, 2014) e assim podem ajudar a solucionar alguns questionamentos da ação molecular dos GCs.

O CL é o principal órgão responsável pela produção de progesterona (P4) durante o diestro de cadelas (*Canis lupus familiaris*). A P4 tem função essencial na manutenção da gestação, uma vez que as cadelas, diferente das vacas, não apresentam esteroidogênese placentária (Nishiyama *et al.*, 1999; Tait *et al.*, 2008). Fêmeas de cão doméstico são consideradas monoéstricas não estacionais, porque apresentam apenas um estro a cada ciclo reprodutivo e este não possui nenhuma relação com a estação do ano. O ciclo reprodutivo apresenta uma duração de 5 a 12 meses, dividido em anestro (período de inatividade ovariana), proestro (fase folicular), estro (fase reprodutiva) e diestro (fase luteínica). O CL canino tem duração de aproximadamente 60 dias pós-ovulação (p.o.), o período de formação dura de 0 a 15 dias p.o., a fase secretória ocorre do dia 15 ao 45 p.o. e a regressão do dia 45 ao 60 p.o. (Hoffmann *et al.*, 1994; Nishiyama *et al.*, 1999).

A falha na manutenção do CL e da produção de P4 acarreta em falhas reprodutivas. Uma das suspeitas pelas quais essa alteração ocorra está relacionada à ação deste hormônio na via de sinalização da insulina, uma vez que, já demonstrado em estudos anteriores, altas concentrações de GCs aumentam a predisposição à resistência insulínica (Geer *et al.*, 2014; Qi *et al.*, 2018) e a resistência insulínica pode causar prejuízos na reprodução, incluindo redução na produção de progesterona (Fedorcsák *et al.*, 2000; Nandi *et al.*, 2010). Como a insulina também regula a absorção de glicose no CL canino (Sousa *et al.*, 2016), se esta via for afetada, a funcionalidade e a duração do CL serão afetadas, e consequentemente a produção de P4.

Os objetivos destes estudos foram caracterizar a expressão de genes relacionados às vias de sinalização dos GCs e da insulina que são afetados pelos GCs em corpo lúteo de cadelas cíclicas saudáveis durante o diestro e indentificar expressão diferencial destes genes.

Além de avaliar as concentrações basais de cortisol salivar e MGFs em diferentes dias do diestro (dia 10, 20, 30, 40, 50 e 60) de cadelas cíclicas.

2 Caracterização da expressão gênica associada às vias de sinalização da insulina e dos glicocorticoides no corpo lúteo de cadelas cíclicas

Maruyama, A.S.[1], Garcia Santos, F.A.[1], Keohane, P.C.P.[2]

[1]Laboratório para estudos morfofuncionais e endocrinologia, Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. e-mail: arnaldo.maruyama@usp.br
[2]Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. e-mail: ppapa@usp.br

Corresponding author: Arnaldo Shindi Maruyama
+5511994449508
e-mail: arnaldo.maruyama@usp.br
Address: Avenida Professor Dr. Orlando Marques de Paiva, nº 87. Departamento de Anatomia dos animais domésticos e silvestres - Laboratório LEME. Cidade Universitária " Armando de Salles Oliveira" - São Paulo - SP - CEP 05508-270.

Resumo

Os glicocorticoides (GCs) interferem na via de sinalização da insulina e em altas concentrações prejudicam o funcionamento dos órgãos, incluindo os do sistema reprodutivo bem como a produção de progesterona (P4) pelo corpo lúteo (CL). O CL utiliza glicose para manter sua atividade, e o cortisol, principal glicocorticoide produzido pelos cães, interfere na via de sinalização da glicose em diversos tecidos, porém ainda não existem estudos quanto à sua atividade no CL canino, tampouco quanto à presença de genes relacionados à via de sinalização dos GCs neste órgão. Os objetivos deste estudo foram caracterizar a expressão dos genes relacionados à via de sinalização dos GCs e da insulina em CL de cadelas cíclicas e identificar expressão diferencial destes genes entre os dias 20 e 60 do diestro, que correspondem à fase final de crescimento do CL e à fase de regressão luteínica, respectivamente. Para esta pesquisa foi realizado o sequenciamento de nova geração (RNA-Seq) dos CLs de 18 cadelas cíclicas saudáveis em dias específicos do diestro (dia 10, 20, 30, 40, 50 e 60 pós-ovulação). Nos resultados foi identificada a expressão dos genes NR3C1,

HSD11B1, HSD11B2, SLC2A4, INSR e IRS1. Os genes NR3C1 (p>0,3; FDR>0,6) e SLC2A4 (p>0,02; FDR>0,1) não apresentaram expressão diferencial no diestro. Os genes HSD11B1 (p=0,0001; FDR=0,0021), HSD11B2 (p=0,013; FDR=0,06), INSR (p=0,002; FDR=0,01) mostraram maior expressão no dia 20 do diestro, quando comparado ao dia 60. O gene IRS1 (p=0,0006; FDR= 0,006) estava mais expresso no dia 60 do diestro em relação do dia 20. Estes resultados sugerem que o CL canino também é influenciado pelo cortisol circulante da mesma forma que outros tecidos já estudados, podendo interferir na via de sinalização da insulina e, consequentemente, prejudicar seu funcionamento e o sucesso reprodutivo.

Palavras-chave: Corpo lúteo. Cortisol. Insulina. Reprodução. RNA-Seq.

Abstract

Glucocorticoids (GCs) interfere with the insulin signaling pathway. It may harm the functioning of organs, including progesterone (P4) production by the corpus luteum (CL). The aims of this study were to characterize the expression of genes related to GCs and insulin signaling pathways in cyclic canine CL and to identify differential expression of these genes between day 20 and day 60 of diestrus which correspond, respectively to luteal final growth and regression phases. For this research RNA-Seq of the corpora lutea from 18 cyclic bitches on specific days of diestrus (day 10, 20, 30, 40, 50, 60) was made. This work identified the expression of the genes NR3C1, HSD11B1, HSD11B2, SLC2A4, INSR e IRS1. No difference on the expression of NR3C1 (p>0,3; FDR>0,6) and SLC2A4 (p>0,02; FDR>0,1) was observed during diestrus. Nevertheless HSD11B1 (p=0,0001; FDR=0,0021), HSD11B2 (p=0,013; FDR=0,06), INSR (p=0,002; FDR=0,01) showed a higher expression on day 20 of diestrus and the gene IRS1 (p=0,0006; FDR= 0,006) presented higher expression on day 60 of diestrus. These data suggest that canine CL is influenced by cortisol similarly to other tissues in which cortisol may interfere in the insulin signaling pathway and, consequently, its function.

Keywords: Corpus luteum. Cortisol. Insulin. Reproduction. RNA-Seq.

2.1 Introdução

Os glicocorticoides (GCs) possuem função moduladora em diversos órgãos, inclusive nos órgãos do sistema reprodutivo. Quando em condições de estresse há aumento na produção de GCs, principalmente pela glândula adrenal. Concentrações elevadas de GCs podem levar a alterações reprodutivas, inibindo o eixo hormonal que regula a reprodução tanto de forma central como periférica (Whirledge e Cidlowski, 2010; Geraghty e Kaufer, 2015; Whirledge e Cidlowski, 2017).

As alterações na concentração de GCs, quando agudas, possuem valor benéfico para o animal, uma vez que a energia estará direcionada para sua sobrevivência. No entanto, quando esta alteração persiste as falhas reprodutivas podem perdurar (Geraghty e Kaufer, 2015), trazendo prejuízos em diversas áreas da medicina veterinária, biologia e medicina humana (Wingfield *et al.*, 1997; Nepomnsachy *et al.*,2006; Ellenberg *et al.*, 2007; Von Keyserlingk, 2009; Watson *et al*,. 2014; Vaughan *et al.*, 2016; Polsky, 2017).

Além de sua ação anti-inflamatória os GCs, em doses fisiológicas, também modulam a ação e produção de diversas citocinas e prostaglandinas necessárias para a ovulação, luteólise, desenvolvimento placentário, implantação embrionária, crescimento fetal e indução do parto (Hillier e Tetsuka, 1998; Andersen, 2002; Michael *et al.*, 2003; Chida *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2014; Erichsen *et al.*, 2010; Wyrwoll, 2014).

Desta forma, os GCs são essenciais para a manutenção da função reprodutiva e agem em momentos e concentrações específicas. A regulação da atuação deste hormônio se dá pela expressão dos receptores de glicocorticoides (GRs/NR3C1) e por duas enzimas, 11-beta-hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1 (11βHSD1), que converte cortisona na forma ativa, cortisol, e 11-beta-hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2 (11βHSD2), que converte cortisol em cortisona (DUONG *et al.*, 2012).

Tanto os GRs quanto as enzimas 11βHSD1 e 11βHSD2 já foram identificadas em diversos órgãos do sistema reprodutor de humanos, vacas e camundongos (Benediktsson *et al.*, 1992; Michael *et al.*, 1997; Tetsuka, 1999; Tetsuka *et al.*, 2003; McDonald *et al.*, 2006), porém os mecanismos moleculares pelos quais os GCs interferem na reprodução ainda não estão totalmente esclarecidos.

Uma das suspeitas está relacionada à ação deste hormônio na via de sinalização da insulina e sua relação com a produção de progesterona pelo corpo lúteo (CL), uma vez que, já foi mostrado em estudos anteriores que altas concentrações de GCs aumentam a predisposição à resistência insulínica (Geer *et al.*, 2014; Qi *et al.*, 2018) e a resistência insulínica pode

causar prejuízos na reprodução, incluindo redução na produção de progesterona (Fedorcsák *et al.*, 2000; Nandi *et al.*, 2010).

O entendimento mais profundo destas vias moleculares nas quais o cortisol pode atuar e afetar na reprodução poderá guiar novas pesquisas e novos direcionamentos para o estudo de terapias para problemas de fertilidade. Em musculatura esquelética e tecido adiposo os GCs reduzem a absorção e consumo de glicose antagonizando a resposta insulínica e prejudicando a translocação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) do citoplasma para a membrana celular (Piroli *et al.*, 2007). Ainda, em musculatura esquelética, GCs causam resistência insulínica por reduzirem a transcrição do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) (Giogino *et al.*, 1993; Morgan *et al.*, 2009). O IRS-1 pertence à família IRS de moléculas adaptadoras e é fosforilado em tirosina em resposta à insulina, além disso, desempenha um papel importante na via de sinalização da insulina, favorecendo a absorção de glicose pela célula (Gual *et al.*, 2005).

O principal órgão responsável pela produção de progesterona (P4) nas cadelas é o corpo lúteo (CL). A P4 tem função essencial na manutenção da gestação, principalmente em sua fase inicial, uma vez que as cadelas, diferente das vacas, não apresentam esteroidogênese placentária. O CL canino tem duração de aproximadamente 60 dias pós-ovulação (p.o.), o período de formação dura de 0 a 15 dias p.o., a fase secretória ocorre do dia 15 ao 45 p.o. e a regressão do dia 45 ao 60 p.o. (Hoffmann *et al.*, 1994; Nishiyama *et al.*, 1999).

A presença do GRs e das enzimas 11βHSD1 e 11βHSD2 já foram identificadas em corpo lúteo de ratos e vacas (Waddell, 1996; Michael *et al.*, 1997; Tetsuka *et al.*, 2003; Komiyama *et al.*, 2008), porém ainda não existem estudos evidenciando a expressão gênica de GR ou destas enzimas em CL canino. Ainda, segundo Sousa *et al.* (2016), a insulina regula a utilização de glicose pelas células luteínicas, participando na manutenção e funcionalidade do CL; sendo assim, se o cortisol interfere na via de sinalização da insulina ele pode prejudicar a produção de P4. Em bovinos, por exemplo, o cortisol aumenta a síntese de P4 pelo CL em estágio inicial de desenvolvimento, porém no final do estágio de desenvolvimento luteínico o cortisol reduz a produção de P4 e acelera a regressão luteínica (Duong *et al.*, 2012).

Técnicas de sequenciamento de nova geração são ferramentas efetivas para o estudo de transcriptoma em larga escala, podendo ser utilizadas para a criação de bibliotecas de sequenciamento de cDNA (Lan *et al.*, 2014). A técnica de sequenciamento de RNA (RNA-Seq) é capaz de identificar os padrões de expressão de transcritos, transcritos raros e transcritos desconhecidos, variantes de splice, eventos de fusão de genes e formação de

quimeras, polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) e genes diferentemente expressos (Ling *et al.*, 2014)

Estas técnicas já foram realizadas em folículo ovariano de ovelhas e mulheres (Bonnet *et al.*, 2013; Yerushalmi *et al.*, 2014), tecidos relacionados ao tecido ovariano de primatas, vacas e cabras (Babbit *et al.*, 2012; Cánovas *et al.*, 2014; Lan *et al.*, 2014; Ling *et al.*, 2014) e CL canino (Sousa *et al.*, 2016), porém sem caracterização dos genes envolvidos na via de sinalização do cortisol e sua variação durante o diestro em cadelas cíclicas não prenhes.

Os objetivos deste estudo foram caracterizar a expressão de genes relacionados às vias de sinalização dos GCs e da insulina que são afetados pelos GCs em corpo lúteo de cadelas cíclicas saudáveis durante o diestro e indentificar expressão diferencial destes genes durante a fase inicial (dia 20 p.o.) e final (dia 60 p.o.) do diestro, que correspondem à fase secretória e à fase de regressão luteínica respectivamente.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Animais e coleta de amostras

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso e Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil (número do protocolo 2385/2016). Corpos lúteos (CLs) de dezoito cadelas sem raça definida, clinicamente saudáveis, foram coletados através do procedimento de ovariosalpingohisterectomia (OSH). As coletas foram realizadas em dias específicos do diestro (dia 10, 20, 30, 40, 50 e 60). O dia exato do diestro foi confirmado através de coletas de sangue, realizadas a cada dois dias após o início do proestro (vulva edemaciada e secreção vulvar sanguinolenta), para a determinação da concentração sérica de progesterona (P4). Sendo considerado o dia da ovulação como o dia em que a concentração sérica de P4 atingiu 5ng/ml (Concannon *et al.*, 1989). As amostras de CLs foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido até o memento da extração de RNA.

2.2.2 Extração de RNA

O RNA total foi extraído utilizando o protocolo de TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Para determinar a concentração e a razão A260/A280 foi utilizado o Biophotometro (Eppendorf, Hamburg, Germany) e em seguida as amostras foram diluídas para a concentração de 150ng/µL de

RNA. Foi realizada análise da integridade do RNA pelo Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies).

2.2.3 Construção das bibliotecas de cDNA e sequenciamento de RNA

Todas as bibliotecas RNA-seq foram construídas a partir de 150ng de RNA utilitando TruSeq RNA Sample Preparation (Ilumina, San Diego, CA, USA) e a qualidade do material mensurada através do Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Todas as amostras utilizadas apresentaram fragmentos de aproximadamente 260 pares de bases. Em seguida foi realizada quantificação das bibliotecas individuais pela técnica de PCR em tempo real, kit KAPA Library Quantification (KAPA Biosystems, Willmigton, MA, USA). O sequenciamento de nova geração foi realizado utilizando Ilumina HiqSeq 200 (Ilumina, San Diego, CA, USA).

2.2.4 Análise de dados

Os reads foram mapeados confrontando o genoma de referência (Canis_familiaris.CanFam3.1.75.dna.toplevel.fa) usindo o software Hisat (‘Our Galaxy’ – ETH-Zurich), que gerou os arquivos em format BAM (Binary Alignment/Map). As analyses estatísticas dos dados foram realizadas pelo programa Cuffdiff (pipeline Cufflinks) e a quantidade relativa de transcritos relacionados à via de sinalização dos GCs e da insulina afetados pelo mesmo foi mensurada em FPKM (Fragmentos por quilobase de exon por milhões de fragmentos mapeados). Para cada gene foi comparado o nível de expressão par a par entre os grupos. Cufflinks forneceu o logaritmo da razão de FPKM entre os sujeitos dentro de cada grupo e utilizou o método delta para estimar a variância da razão de log. O método estatístico utilizou a razão log de FPKM dividido pelo desvio padrão da razão log (Trapnell *et al.*, 2012). Os genes foram considerados diferencialmente expressos se o valor de p ajustado ao FDS fosse < 0,05.

2.3 Resultados

O total de 15.240 genes foram identificados como expressos, em algum nível, no CL canino durante o diestro não gestacional. Destes genes foi caracterizada a expressão de seis genes relacionados às vias de sinalização dos GCs e da insulina afetados pelos GCs, sendo eles NR3C1, responsável pela transcrição do GR; HSD11B1, responsável pela transcrição da enzima 11-beta-hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1; HSD11B2, responsável pela transcrição da enzima 11-beta-hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2; SLC2A4, responsável

pela transcrição do GLUT4; INSR, pela expressão do receptor de insulina; IRS1, pelo substrato 1 do receptor de insulina.

Não foi identificada expressão diferencial dos genes NR3C1 (p>0,3; FDR>0,6) e do SLC2A4 (p>0,02; FDR>0,1) durante os diferentes períodos do diestro (dias 10, 20, 30, 40, 50 e 60 po), ou seja, a expressão destes genes se manteve estável durante todo o diestro. Por outro lado, os genes HSD11B1 (p=0,0001; FDR=0,0021), HSD11B2 (p=0,013; FDR=0,06), INSR (p=0,002; FDR=0,01) e IRS1 (p=0,0006; FDR= 0,006) apresentaram expressão diferencial no diestro, quando comparados os dias 20 e 60 após a ovulação (tabela 1).

Os genes HSD11B1, HSD11B2 e INSR apresentaram maior quantidade de reads no dia 20 do diestro quando comparado ao dia 60 da mesma fase do ciclo estral. Adicionalmente, o IRS1 apresentou uma maior expressão no dia 60 e menor no dia 20 do diestro (figura 1).

2.4 Discussão

Os resultados indicam que o corpo lúteo canino também pode ser afetado por cortisol circulante, uma vez que ele possui a expressão dos genes do receptor de glicocorticoides e das enzimas 11β-hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1 e tipo 2. Os dados obtidos condizem com os já relatados na literatura em corpo lúteo de ratos e vacas (Waddell, 1996; Michael *et al.*, 1997; Tetsuka *et al.*, 2003; Komiyama *et al.*, 2008).

Uma vez que o gene NR3C1 (GR) está expresso sem alterações significativas durante toda a fase de diestro e os genes HSD11B1 e HSD11B2 codificadores das enzimas 11βHSD1 e 11βHSD2, respectivamente, apresentaram-se mais expressos no início do diestro, isso indica que estas enzimas podem desempenhar um papel chave na concentração de cortisol intracelular, como ocorre em outros tipos de tecido (Tetsuka *et al.*, 2003; Komiyama *et al.*, 2008).

A maior expressão do gene INSR durante a fase luteínica inicial encontrada nos resultados condiz com o período de desenvolvimento do CL e início do aumento da secreção de P4, sendo o período com necessidade de maior absorção de glicose. Embora o gene SLC2A4, responsável pela transcrição do GLUT4, não ter apresentado expressão diferencial no RNA-Seq, dados anteriores de PCR quantitativo mostraram queda na transcrição deste gene do dia 20 para o dia 60 pós-ovulação (Sousa *et al.*, 2016), o que condiz com o padrão de redução da expressão do gene INSR. Além disso, a ausência de expressão diferencial do gene SLC2A4 pode ter ocorrido devido à sua baixa expressão no RNA-Seq, o que dificultou sua análise estatística, mas também porque as diferentes concentrações basais de glicocorticoides

não afetem a sua transcrição, apenas a translocação da proteína codificada por este gene (GLUT4) para a membrana celular (Piroli *et al.*, 2007).

O aumento na expressão de IRS1 pode indicar que as cadelas não estavam sob influência de altas concentrações de cortisol, ou que as concentrações de cortisol não foram suficientes para reduzir a expressão do gene IRS1, uma vez que, trabalhos anteriores já demonstraram que quando o tecido está sob altas influências de cortisol a expressão do IRS1 é reduzida (Giogino *et al.*, 1993; Morgan *et al.*, 2009). Além disso, apesar de não terem sido realizadas dosagens de cortisol plasmático das cadelas, esse resultado condiz com o status de saúde dos animais, que não apresentavam alterações que pudessem causar elevação dos níveis séricos de cortisol.

2.5 Conclusão

Estes dados sugerem que o CL canino também pode ser influenciado pelo cortisol circulante, assim como pela insulina, de forma similar a outros tecidos nos quais o cortisol interfere na via de sinalização da insulina, podendo causar redução da sensibilidade à insulina e prejuízo na função do tecido ou órgão. Desta forma, o cortisol pode ter papel fundamental no prejuízo da função luteínica através de sua atuação nesta via de sinalização, favorecendo a ocorrência de falhas reprodutivas.

2.6 Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Demanda Social concedida de novembro de 2016 a fevereiro de 2017. Em seguida com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – São Paulo/Brasil (FAPESP) - (processo n° 2016/22589-4) concedida de março de 2017 a outubro de 2018.

Referências

Andersen CY. Possible new mechanism of cortisol action in female reproductive organs: physiological implications of the free hormone hypothesis. J. Endocrinol. 2002; 173:211–217.

Babbitt CC, Tung J, Wray GA, Alberts SC. Changes in gene expression associated with reproductive maturation in wild female baboons. Genome Biol. Evol. 2012; 4(2):102-109.

Benediktsson R, Yau JLW, Brett LP, Cooke BE, Edwards CRW, Seckl JR. 11β-Hydroxysteroid dehydrogenase in the rat ovary: high expression in the oocyte. J Endocrinol. 1992; 135(1):53–58.

Bonnet A, Cabau C, Bouchez O, Sarry J, Marsaud N, Foissac S, Woloszyn F, Mulsant P, Mandon-Pepin B. An overview of gene expression dynamics during early ovarian folliculogenesis: specificity of follicular compartments and bi-directional dialog. BMC Genomics. 2013; 14:904.

Cánovas A, Reverter A, Deatley KL, Ashley RL, Colgrave ML, Fortes MR, Islas-Trejo A, Lehnert S, Porto-Neto L, Rincón G, Silver GA, Snelling WM, Medrano JF, Thomas MG. Multi-tissue omics analyses reveal molecular regulatory networks for puberty in composite beef cattle. PLoS One. 2014; 9(7):e102551.

Chida D, Miyoshi K, Sato T, Yoda T, Kikusui T, Iwakura Y. The role of glucocorticoids in pregnancy, parturition, lactation, and nurturing in melanocortin receptor 2-deficient mice. Endocrinology. 2011; 152:1652–1660.

Concannon PW, McCann JP, Temple M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. J. Reprod. Fertil. Suppl. 1989; 39:3–25.

Duong HT, Piotrowska-Tomala KK, Acosta TJ, Bah MM, Sinderewicz E, Majewska M, Jankowska K, Okuda K, Skarzynski DJ. Effects of cortisol on pregnancy rate and corpus luteum function in heifers: an in vivo study. J. Reprod. Develop. 2012; 58(2):223-230.

Erichsen MM, Husebye ES, Michelsen TM, Dahl AA, Løvås K. Sexuality and fertility in women with Addison's disease. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2010; 95:4354–4360.

Fedorcsák P, Storeng G, Dale PO, Tanbo T, Abyholm T. Impaired insulin action on granulose-lutein cells in women with polycystic ovary syndrome and insulin resistance. Gynecol. Endocrinol. 2000; 14(5):327-336.

Geer EB, Islam J, Buettner C. Mechanism of glucocorticoid-induced insulin resistance: focus on adipose tissue function and lipid metabolism. Endocrinol. Metab. Clin. North Am. 2014; 43(1):75-102.

Geraghty AC, Kaufer D. Glucocorticoid regulation of reproduction. In: Wang JC, Harris C, eds. Glucocorticoid Signaling: From Molecules to Mice to Man. Nova York, NY: Springer, 2015:253-278.

Giorgino F, Alamahfouz A, Goodyear LJ, Smith RJ. Glucocorticoid regulation of insulin receptor and substrate IRS-1 tyrosine phosphorylation in rat skeletal muscle in vivo. J. Clin. Invest. 1993; 91(5):2020-2030.

Guall P, Marchand-Brustel YL, Tanti JF. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. Biochimie. 2005; 87:99-109.

Hoffmann B, Hoveler R, Nohr B, Hasan SH. Investigations on hormonal changes around parturition in the dog and the occurrence of pregnancy specific non conjugated oestrogens. Exp. Clin. Endocrinol. 1994; 102(3):185–189.

Komiyama J, Nishimura R, Lee HY, Sakumoto R, Tetsuka M, Acosta TJ, Skarzynski DJ, Okuda K. Cortisol is a suppressor of apoptosis in bovine corpus luteum. Biol. Reprod. 2008; 78:888–895.

Lan D, Xiong X, Wei Y, Xu T, Zhong J, Zhi X, Wang Y, Li J. RNA-Seq analysis of yak ovary: improving yak gene structure information and mining reproduction-related genes. Sci. China Life Sci. 2014; 57(9):925-935.

Li XQ; Zhu P, Myatt L, Sun K. Roles of glucocorticoids in human parturition: a controversial fact? Placenta. 2014; 35:291–296.

Ling YH, Xiang H, Li YS, Liu Y, Zhang YH, Zhang ZJ, Ding JP, Zhang XR. Exploring differentially expressed genes in the ovaries of uniparous and multiparous goats using the RNA-Seq (Quantification) method. Gene. 2014; 15(1):148-153.

McDonald SE, Henderson TA, Gomez-Sanches CE, Critchley HOD, Mason JI. 11Betahydroxysteroid dehydrogenases in human endometrium. Mol. Cell. Endocrinol. 2006; 248(1–2):72–78.

Michael AE, Evangelatou M, Norgate DP, Clarke RJ, Antoniw JW, Stedman BA, Brennan A, Welsby R, Bujalska I, Stewart PM, Cooke BA. Isoforms of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase in human granulosa-lutein cells. Mol. Cell. Endocrinol. 1997; 132(1–2):43–52.

Michael AE, Thurston LM, Rae MT. Glucocorticoid metabolism and reproduction: a tale of two enzymes. Reproduction. 2003; 126(4):425–441.

Morgan SA, Sherlock M, Gathercole LL, Lavery GG, Lanaghan C, Bujalska IJ, Laber D, Yu A, Convey G, Mayers R, Hegyi K, Sethi JK, Stewart PM, Smith DM, Tomlinson JW. 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 regulates glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal muscle. Diabetes. 2009; 58(11):2506-2515.

Nandi A, Wang X, Accilli D, Wolgemuth DJ. The effect of insulin signaling on female function independent of adiposity and hyperglycemia. Endocrinology. 2010; 151:1863-1871.

Nepomnaschy PA, Welch KB, McConnell DS, Low BS, Strassmann BI, England BG. Cortisol levels and very early pregnancy loss in humans. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2006; 103(10):3938-3942.

Nishiyama T, Tsumagari S, Ito M, Kimura J, Watanabe G, Taya K, Takeshi M. Immunohistochemical study of steroidogenic enzymes in the ovary and placenta during pregnancy in the dog. Anat. Histol. Embryol. 1999; 28:125–129.

Piroli GG, Grillo CA, Reznikov LR, Adams S, McEwen BS, Charron MJ, Reagan LP. Corticosterone impairs insulin-stimulated translocation of GLUT4 in the rat hippocampus. Neuroendocrinology. 2007; 85:71-80.

Polsky L, Von Keyserlingk MAG. Invited Review: Effects of heat stress on dairy cattle welfare. J. Dairy Sci. 2017; 100(11):8645-8657.

Qi J, Wang W, Zhu Q, He Y, Lu Y, Wang Y, Li X, Chen Z, Sun Y. Local cortisol elevation contributes to endometrial insulin resistance in polycystic ovary syndrome. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2018; 103(7):2457-2467.

Sousa LMMC, Silva RS, Fonseca VU, Leandro RM, Di Vincenzo TS, Alves-Wagner AB, Machado UF, Papa PC. Is the canine corpus luteum an insulin-sensitive tissue? J. Endocrinol. 2016; 231:223-233.

Tetsuka M. Expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, glucocorticoid receptor, and mineralocorticoid receptor genes in rat ovary. Biol. Reprod. 1999; 60(2):330–335.

Tetsuka M, Yamamoto S, Hayashida N, Hayashi KG, Hayashi M, Acosta TJ, Miyamoto A. Expression of 11β-hudroxysteroid dehydrogenases in bovine follicle and corpus luteum. J. Endocrinol. 2003; 177:445-452.

Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, Pimentel H, Salzberg SL, Rinn JL, Pachter L. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. Nat. Protoc. 2012; 7(3):562-578.

Vaughan OR, Davies KL, Ward JW, De Blasio MJ, Fowden AL. A physiological increase in maternal cortisol alters uteroplacental metabolism in the pregnant ewe. J. Physiol. 2016; 594(21):6407-6418.

Von Keyserlingk MAG, Rushen J, De Passillé AM, Weary DM. Invited review: The welfare of dairy cattle – Key concepts and the role of science. J. Dairy Sci. 2009; 92:4101-4111.

Waddell BJ, Benediktsson R, Seckl JR. 11-Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in the rat corpus luteum: induction of messenger ribonucleic acid expression and bioactivity coincident with luteal regression. Endocrinology. 1996; 137(12):5386–5391.

Whirledge S, Cidlowski JA. Glucocorticoid, stress and fertility. Minerva Endocrinol. 2010; 35(2):109-125.

Whirledge S, Cidlowski JA. Glucocorticoids and Reproduction: Traffic Control on the Road to Reproduction. Trends Endocrinol. Metab. 2017; 28(6):399-415.

Wingfield J, Hunt K, Breuner C, Dunlap K, Fowler G, Freed L, Lepson J. Environmental stress, field endocrinology, and conservation biology. In: Clemmons J, Buchholz R, eds. Behavioral Approaches to Conservation in the Wild. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1997:95–131.

Wyrwoll CS. Developmental programming and the placenta: focusing in on glucocorticoids. In: Seckl JR, Christen Y, eds. Hormones, Intrauterine Health and Programming, Switzerland: Springer, 2014:17–26.

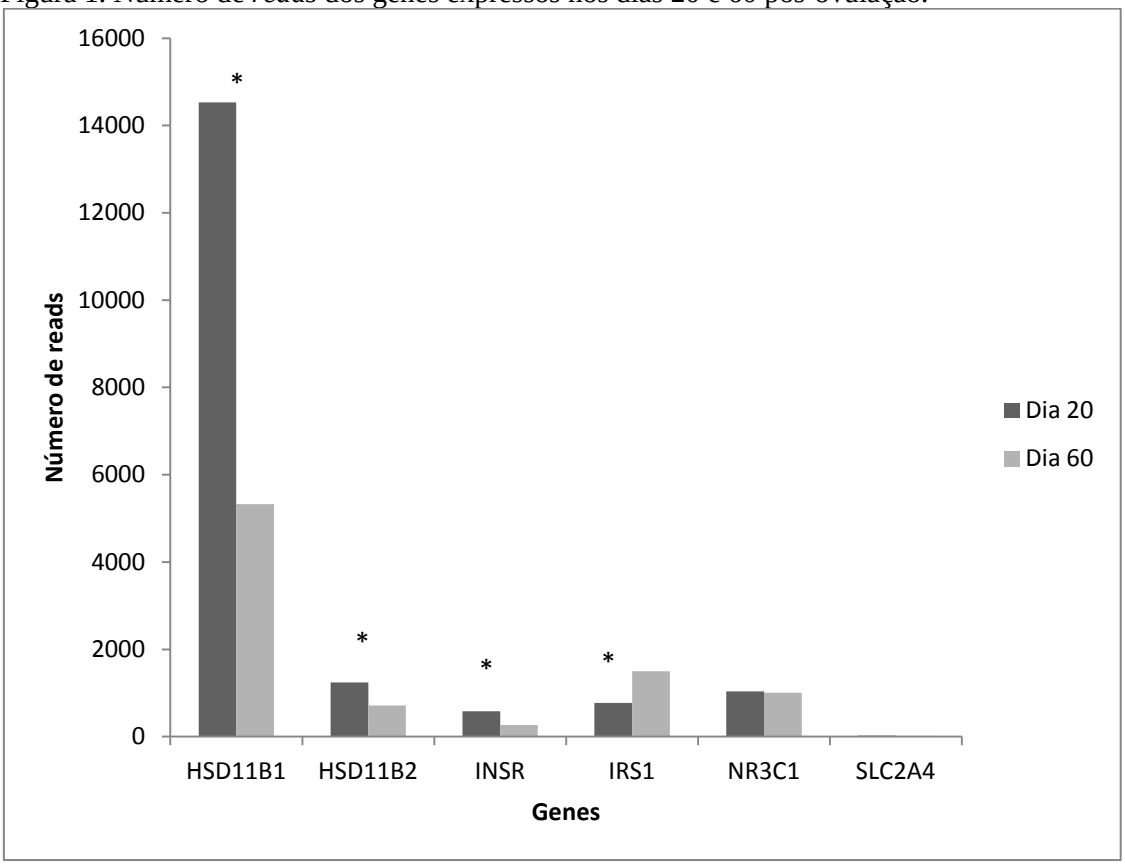
Yerushalmi GM, Salmon-Divon M, Yung Y, Maman E, Kedem A, Ophir L, Elemento O, Coticchio G, Dal Canto M, Mignini Renzinu M, Fadini R, Hourvitz A. Characterization of the human cumulus cell transcriptome during final follicular maturation and ovulation. Mol. Hum. Reprod. 2014; 20(8):719-735.

Tabela 1. Valor de p e FDR dos genes diferentemente expressos entre os dias 20 e 60 pós-ovulação.

Gene	**Valor de p**	**FDR**
NR3C1	0,8727	0,9328
SLC2A4	0,2747	0,4745
HSD11B1	0,0001 *	0,0021
HSD11B2	0,013 *	0,06
INSR	0,002 *	0,01
IRS1	0,0006 *	0,006

(Fonte: Maruyama, A. M., 2018)

Figura 1. Número de *reads* dos genes expressos nos dias 20 e 60 pós-ovulação.



(Fonte: Maruyama, A. M., 2018)

3 Caracterização do perfil de cortisol salivar e metabólitos fecais de glicocorticoides em cadelas durante o diestro não gestacional.

Characterization of salivary cortisol and fecal glucocorticoid metabolites profiles in bitches during non-gestational diestrus.

Maruyama, A.S.[1], Garcia-Santos, F.A.[1], Mendonça-Furtado, O.[2], Cavalcante, V.P.[1], Palme, R.[3], Pizzutto, C.S.[1], Leandro, R.M., Keohane, P.C.P[1].

[1]Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.
[2]Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.
[3]Departmento de Ciências Biomédicas, Universidade de Medicina Veterinária, Viena, Áustria.

Resumo

Glicocorticoides (GCs) modulam a reprodução, interferindo na produção de hormônios gonadais, estradiol (E2) e progesterona (P4). Concomitantemente, E2 e P4 também influenciam a liberação de cortisol. Os objetivos deste trabalho foram avaliar as concentrações basais de cortisol salivar (CS) e metabólitos fecais de glicocorticoides (MGFs) em diferentes dias do diestro (10, 20, 30, 40, 50 e 60) de cadelas cíclicas, comparando com os níveis de E2 e P4 já publicados; correlacionar os valores obtidos nas duas técnicas; e estabelecer um intervalo de valores basais de CS e MFGs para o diestro. Foram coletadas amostras de fezes e saliva de 10 cadelas durante o diestro, e realizada mensuração da concentração de MFGs e CS. Os resultados demonstraram que no dia 10 do diestro (CS=0,0656 ± 0,0237µg/dL e MGFs=110,41 ± 46,51pg/ng) as duas mensurações apresentaram concentrações menores que nos demais dias do diestro (CS=0,1027 ± 0,0496 µg/dL e MFGs=220,22 ± 183,74 pg/ng). A concentração média de CS=0,0972µg/dL (0,011-0,246µg/dL) e MFGs=189,875pg/ng (9pg/ng-1067,2pg/ng) foi definida para o diestro canino. Os níveis baixos de CS e MFGs corroboram com os achados em literatura e com a queda de E2 neste mesmo período, o que sugere uma associação entre a produção de ambos os hormônios.

Palavras-chave: Estresse. Saliva. Fezes. Diestro. *Canis lupus familiaris*

Abstract

Glucocorticoids (GCs) modulate reproduction by interfering in the gonadal hormones production, estradiol (E2) and progesterone (P4). Likewise, E2 and P4 influence release of cortisol. The aims of this research were to evaluate the basal concentrations of salivary cortisol (SC) and fecal glucocorticoid metabolites (FGMs) on different days of diestrus (10, 20, 30, 40, 50 e 60) in cyclic bitches, moreover to compare E2 and P4 levels already published. As well as to correlate the values of SC and FGMs, and also to establish an interval of basal concentrations of SC and FGMs for diestrus. Saliva and fecal samples were collected from 10 bitches during diestrus phase. Enzyme immunoassay was made to measure the concentrations of SC and FGMs. The results showed lower SC and FGMs concentrations on day 10th (SC=0,0656 ± 0,0237µg/dL and FGMs=110,41 ± 46,51pg/ng) than on the other days of diestrus (SC=0,1027 ± 0,0496 µg/dL e FGMs=220,22 ± 183,74 pg/ng). Average concentrations of SC=0,0972µg/dL (0,011-0,246µg/dL) and FGMs=189,875pg/ng (9pg/ng-1067,2pg/ng) were defined for canine diestrus. Lower levels of SC and FGMs corroborate with the literature data and with the decrease in E2 production at the same period. This data suggest that the production of both hormones are associated.

Keywords: Stress. Saliva. Feces. Diestrus. *Canis lupus familiaris.*

3.1 Introdução

A reprodução animal é afetada pelo estresse e pelo cortisol circulante; altas concentrações de cortisol estão associadas a alterações reprodutivas como supressão do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG), redução da gametogênese, perda embrionária e aborto (Dobson e Smith, 2000; Whirledge e Cidlowski, 2010; Geraghty e Kaufer, 2015; Whirledge e Cidlowski, 2017). Além disso, o cortisol em concentração basal age como modulador da ação e produção de diversas citocinas e prostaglandinas necessárias para a ovulação, desenvolvimento placentário, implantação embrionária, crescimento fetal e luteólise (Hillier e Tetsuka, 1998; Andersen, 2002; Michael *et al.*, 2003; Chida *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2014; Erichsen *et al.*, 2010; Wyrwoll, 2014).

A elevação na concentração de cortisol pode estar relacionada a um estímulo estressante que induz a liberação de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico), pela ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), levando à síntese e aumento da secreção de cortisol pelo córtex da adrenal. A caracterização das concentrações plasmáticas de cortisol é amplamente utilizada como indicadora de estresse (McDonald, 1980), que pode, inclusive, refletir o bem-estar animal (Beerda *et al.*, 1997). Os métodos de mensuração de cortisol

salivar e de metabótitos fecais de glicocorticoides (MFGs) vem sendo, cada vez mais, escolhidos para a mensuração deste hormônio ou de seus metabólitos (Dreschel e Granger, 2009; Bennet e Hayssen, 2010; Glenk *et al*., 2014; Cummings *et al*., 2007; Vasconcellos *et al*., 2011), uma vez que são métodos não invasivos, de fácil coleta de amostras e confiáveis para avaliar a atividade adrenocortical (Beerda *et al.*, 1998; Obayashi, 2013; Schatz & Palme, 2001).

Fêmeas de cão doméstico (*Canis familiaris*) são consideradas monoéstricas não estacionais, porque apresentam apenas um estro a cada ciclo reprodutivo e este não possui nenhuma relação com a estação do ano. O ciclo reprodutivo apresenta uma duração de 5 a 12 meses, dividido em anestro (período de inatividade ovariana), proestro (fase folicular), estro (fase reprodutiva) e diestro (fase luteínica). O diestro possui duração média de dois meses, sendo a fase na qual há intensa produção de progesterona (P4) pelo corpo lúteo (CL) (Concannon *et al*., 1989). A P4 tem função essencial no desenvolvimento e manutenção da gestação, uma vez que as cadelas, diferente das vacas, não apresentam esteroidogênese placentária (Nishiyama *et al.*, 1999; Tait *et al.*, 2008).

No diestro, o cortisol age sobre o CL influenciando sua atividade e duração; em vacas já foi relatado que o cortisol elevado no início do diestro reduz a atividade luteolítica (Komiyama *et al.*, 2008; Duong *et al.*, 2012). Em mulheres com a doença de Addison, nas quais ocorre deficiência na função da glândula adrenal, foi relatada falência precoce dos ovários (Erichsen *et al.*, 2010). Concomitantemente, os hormônios esteroides gonadais também podem afetar a produção de cortisol interferindo diretamente no eixo HHA (Handa e Weiser, 2014; Gallelli *et al.*, 2015).

A influência dos hormônios esteroides gonadais no eixo HHA também é indicada como uma das variantes responsáveis pela variação na concentração plasmática do cortisol em diferentes fases do ciclo estral de cadelas. Ratos tratados com estradiol e ratos tratados com progesterona e estradiol secretaram mais corticosterona após um estímulo estressor (Viau e Meaney, 1991). Gallelli *et al.* (2015), em seu trabalho com cadelas, demonstrou que na fase entre proestro e estro a concentração de estrógeno (E2) plasmático sofre uma queda e é acompanhada pela queda na concentração de ACTH, reforçando a correlação destes dois hormônios, mostrando que o E2 possui ação estimulatória na produção de ACTH.

A P4, por outro lado, parece ter função inibitória do eixo HHA (Keller-Wood, 1998; Roy *et al.*, 1999). Existem poucos trabalhos relatando a variação dos níveis de cortisol durante o ciclo estral de cadelas (Reimers *et al.*, 1984; Gallelli *et al.*, 2015). Apenas um trabalho mensurou a concentração plasmática de cortisol durante o diestro gestacional de cadelas,

mostrando que a concentração deste hormônio oscila durante todo o período de gestação, sem diferença estatística entre os dias; apenas no final do diestro gestacional apresenta um pico de cortisol (Benetti *et al.*, 2004), porém não há nenhum relato sobre os valores basais de cortisol salivar e MFGs em cadelas durante a fase de diestro em cadelas cíclicas.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar as concentrações basais de cortisol salivar e MGFs em diferentes dias do diestro (dia 10, 20, 30, 40, 50 e 60), avaliar a correlação entre os valores obtidos nos dois métodos de mensuração e estabelecer um intervalo de confiança para os valores basais de cortisol salivar e MFGs em diestro não gestacional de cadelas.

3.2 Material e Métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso e Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil (número do protocolo 3114/2017). Foram selecionadas dez cadelas (*Canis lupus familiaris)*, de diferentes tutores, com idades entre 1 e 8 anos, clinicamente hígidas, sem padrão racial definido e que não haviam passado por gestação prévia. Todas as cadelas eram mantidas como pets e viviam com seus tutores em casa ou apartamento, com acesso livre à água e alimento fornecido pelo menos duas vezes ao dia. As amostras de saliva e fezes foram coletadas em suas residências ou durante passeio na rua, seguindo a rotina normal de cada animal, visando minimizar os estímulos estressores, para possibilitar a mensuração dos níveis basais de cortisol salivar e metabólitos fecais de glicocorticoides (MFGs) (Bennett e Hayssen, 2010).

Durante os 60 dias da fase de diestro foram coletadas amostras de fezes e saliva para avaliação dos perfis de MFGs e cortisol salivar, respectivamente. Para a definição do dia zero do diestro foi realizada citologia vaginal em dias alternados, iniciada 10 dias após os primeiros sinais de proestro (edema de vulva e presença de secreção sanguinolenta). O dia zero do diestro foi definido como o dia em que ocorreu mudança repentina no número relativo de células epiteliais superficiais para células intermediárias (parabasais) na citologia vaginal (Johnston *et al.*, 2001).

As amostras de fezes foram coletadas preferencialmente no período da manhã, imediatamente após a defecação; cada amostra foi alocada em pote coletor universal estéril e rapidamente identificada e armazenada em freezer -20°C até o momento da extração dos MFGs. O total de 149 amostras de fezes foram coletadas.

As amostras de saliva também foram coletadas no período da manhã, com o auxílio de um algodão gentilmente alocado, pelo tutor, na boca do animal, entre a bochecha e a gengiva, até o material ficar saturado de saliva (60 segundos aproximadamente). O algodão embebido

de saliva foi alocado em dentro de uma seringa estéril e prensado o êmbolo para extrair a saliva do algodão. Trinta minutos antes da coleta o animal não teve acesso à água, higiene bucal ou alimentação, para evitar contaminação das amostras (Dreschel e Granger, 2009). Cada amostra de saliva foi armazenada em tubo tipo eppendorf (1,5mL), identificada e congelada em freezer -20°C até o momento das análises, totalizando 115 amostras de saliva coletadas. Todas as coletas tiveram duração de até 4 minutos para evitar que o estímulo estressor da coleta, por menor que fosse, afetasse nos resultados (Kobelt *et al.*, 2003).

Para a extração dos MFGs cada amostra de fezes foi descongelada e homogeneizada. 0,2g de cada amostra de fezes homogeneizada foi coletada em tubo plástico individual e em seguida foram adicionados 2mL de solução de metanol 80%, a mistura foi então homogeneizada em vórtex por 30 segundos e em seguida agitada em shaker por 30 minutos à temperatura ambiente. Após os 30 minutos o tubo contendo a mistura foi centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm e o sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer -20°C, de acordo com o protocolo estabelecido por Palme *et al.* (1997).

As análises dos MFGs foram realizadas através da técnica de imunoensaio enzimático (EIA) altamente específico para cortisol, de acordo com o protocolo de Palme e Möstl (1997), já utilizado anteriormente para mensuração de MFGs em cães (Schatz e Palme, 2001). As amostras foram testadas em duplicata sendo considerado o coeficiente de variância intra e interensaio menor que 15% para ambos.

O processo de mensuração de cortisol através das amostras de saliva foi realizado no Laboratório para Estudos Morfofuncionais e Endocrinologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, utilizando o Salimetrics® EIA (imunoensaio enzimático) kit para cortisol salivar (Salimetrics cortisol assay kit, State College, PA, USA), conforme especificações do fabricante.

Este kit foi escolhido por ter sido previamente utilizado para mensurar cortisol salivar em cães (Bennett e Hayssen, 2010; Dreschel e Granger, 2009). As amostras foram testadas em duplicata sendo considerado o coeficiente de variância intra e interensaio menor que 15% para ambos. Em amostras onde o volume de saliva era insuficiente foi realizada diluição da amostra (1:2, 1:4 e 1:10) ou foram mensuradas em apenas um poço da placa.

Para as análises estatísticas, foi realizada comparação da concentração de cortisol salivar e MFGs aos 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias do diestro através do teste de Kruskal-Wallis. Em seguida foi feita a comparação da concentração de cortisol salivar e MFGs no início (dia 10) e final do diestro (dia 20 ao dia 60) utilizando o teste de Mann-Whitney. Também foi realizada correlação de Pearson entre a concentração de cortisol salivar e de MFGs. As

análises estatísticas foram realizadas no programa SAS utilizando nível de significância de 5% ($p<0,05$).

3.3 Resultados

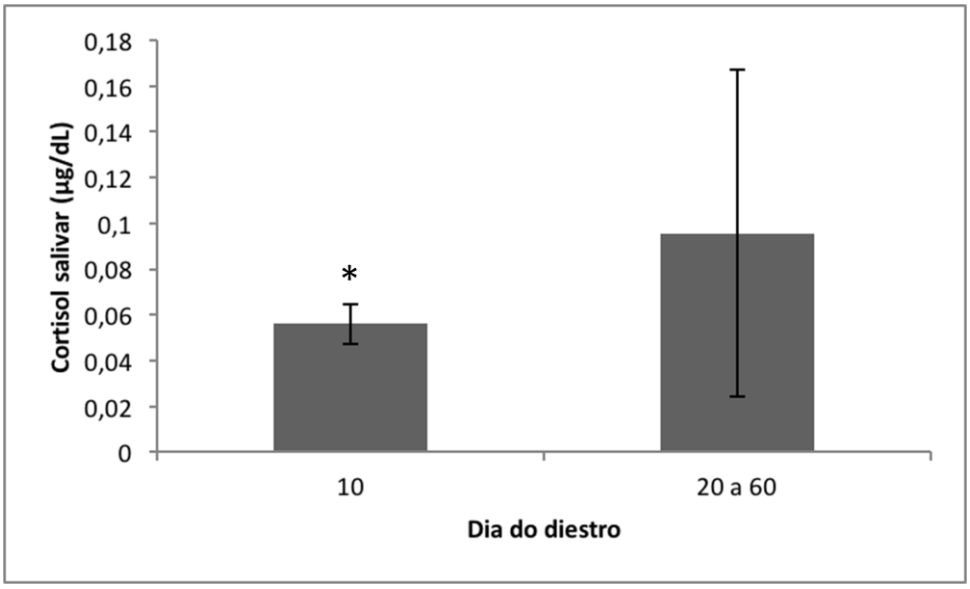
Os resultados obtidos com as análises demonstraram que há variação nas concentrações de cortisol salivar, assim como nas concentrações de MFGs, quando comparada a fase inicial do diestro (dia 10 do diestro) com as demais fases do diestro (dia 20, 30, 40, 50 e 60); tanto o cortisol salivar ($p=0,048$) quanto os MFGs ($p=0,01$) apresentaram diferença estatística entre estes períodos, sendo encontrados em menor concentração durante o início do diestro (dia 10) e em maior concentração durante os demais dias do diestro (figuras 1 e 2). Os valores médios e os desvios padrão da concentração de cortisol salivar e de MFGs encontra-se na tabela 1.

Tabela 1 – Valores médios e desvio padrão da concentração de cortisol salivar (µg/dL) e de metabólitos fecais de glicocorticoides (pg/ng) de cadelas aos 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias do diestro.

Dias	**Cortisol Salivar**	**Metabólitos fecais de glicocorticoides**
10	0,0656 ± 0,0237 (n=5)**	110,41 ± 46,51 (n=9)
20	0,1197 ± 0,0820 (n=5)	214,82 ± 104,89 (n=8)
30	0,0977 ± 0,0432 (n=6)	205,98 ± 122,21 (n=8)
40	0,1015 ± 0,0591 (n=4)	192,84 ± 171,25 (n=8)
50	0,0923 ± 0,0277 (n=7)	226,23 ± 158,25 (n=8)
60	0,1080 ± 0,0504 (n=4)	256,66 ± 309,87 (n=9)

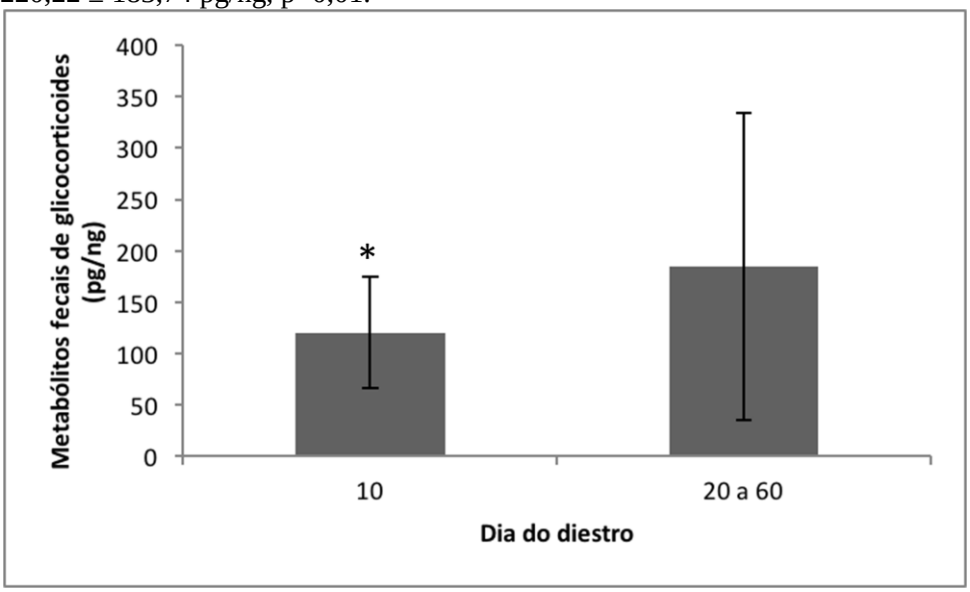
*n=tamanho da amostra
(Fonte: Maruyama, A. S., 2018)

Figura 1 – Gráfico da variação da concentração de cortisol salivar (µg/dL) no dia 10 do diestro e nos demais dias do diestro (dia 20, 30, 40, 50 e 60). No dia 10 do diestro a média do valor de cortisol salivar foi 0,0656 ± 0,0237µg/dL, nos demais dias do diestro a concentração foi 0,1027 ± 0,0496 µg/dL, $p=0,048$.



(Fonte: Maruyama, A. S., 2018)

Figura 2 – Gráfico da variação da concentração de metabólitos fecais de glicocorticoides (pg/ng) no dia 10 do diestro e nos demais dias do diestro (dia 20, 30, 40, 50 e 60). No dia 10 do diestro a média do valor de cortisol salivar foi 110,41 ± 46,51 pg/ng, nos demais dias do diestro a concentração foi de 220,22 ± 183,74 pg/ng, p=0,01.



(Fonte: Maruyama, A. S., 2018)

Não foi encontrada correlação de Pearson entre a concentração do cortisol salivar e a concentração de MFGs aos dias 10, 20, 30, 40 e 50, apenas no dia 60 do diestro foi observada correlação negativa entre as duas mensurações (tabela 2).

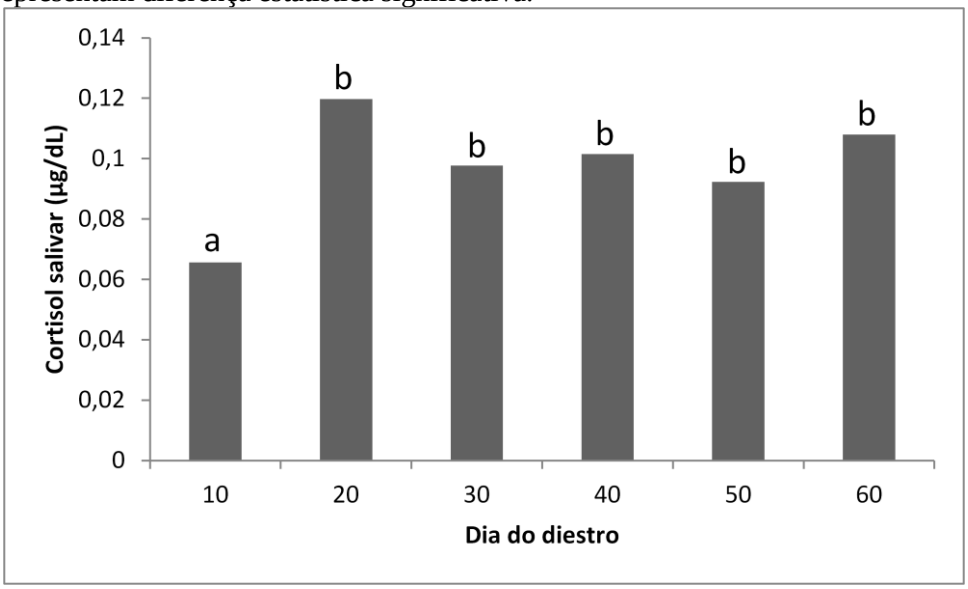
Tabela 2 – Correlação de Pearson entre a concentração do cortisol salivar (µg/dL) e a concentração de metabólitos fecais de glicocorticoides (pg/ng) aos 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias do diestro.

Dias	**n***	**R**	**IC95%**	**Valor de p***
10	4	-0,3709	-0,98 a 0,92	0,6291
20	5	-0,3899	-0,95 a 0,75	0,5164
30	5	0,7109	-0,46 a 0,98	0,1783
40	4	-0,6985	-0,99 a 0,80	0,3014
50	7	-0,4860	-0,91 a 0,42	0,2687
60	4	-0,9662	-1,00 a -0,07	0,0338

*n=número de pares
**Coeficiente de Pearson
***Intervalo de confiança de 95%
(Fonte: Maruyama, A. S., 2018)

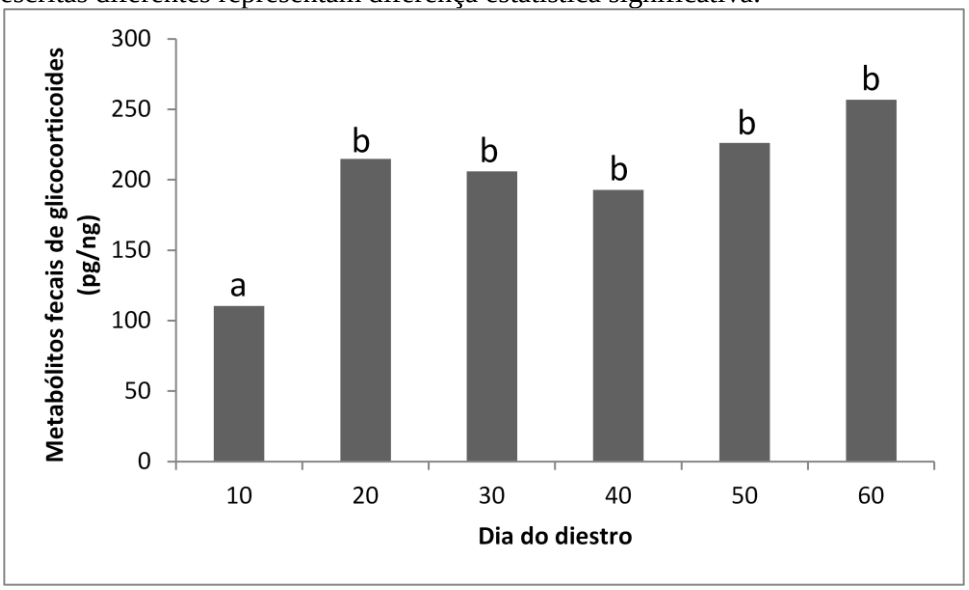
Através de uma análise descritiva das concentrações de cortisol salivar e MFGs foi possível identificar que ambos os gráficos apresentaram um padrão semelhante de variação das concentrações, com menores concentrações do hormônio e seus metabólitos no dia 10 e concentrações mais elevadas nos demais dias do diestro (figuras 3 e 4).

Figura 3 – Gráfico da concentração de cortisol salivar (µg/dL) durante os diferentes dias do diestro não gestacional de cadelas. Apresenta menor concentração do cortisol salivar no dia 10 quando comparado aos demais dias (dia 20, 30, 40, 50 e 60) do diestro, p=0,048. Letras sobre escritas diferentes representam diferença estatística significativa.



(Fonte: Maruyama, A. S., 2018)

Figura 4 – Gráfico da concentração de metabólitos fecais de glicocorticoides (pg/ng) durante os diferentes dias do diestro não gestacional de cadelas. Apresenta menor concentração dos metabólitos no dia 10 quando comparado aos demais dias (dia 20, 30, 40, 50 e 60) do diestro, p=0,01. Letras sobre escritas diferentes representam diferença estatística significativa.



(Fonte: Maruyama, A. S., 2018)

Cadelas não gestantes em fase de diestro apresentaram concentração média de cortisol salivar de 0,0972 µg/dL, variando de 0,011 µg/dL a 0,246 µg/dL. A concentração média de MFGs para as mesmas cadelas durante o mesmo período foi igual a 189,875 pg/ng de fezes, variando de 9 pg/ng a 1067,2pg/ng de fezes.

3.4 Discussão

No sistema reprodutor existe uma complexa relação entre o cortisol e os hormônios gonadais; tanto o cortisol pode interferir na produção de E2 e P4 (Dobson e Smith, 2000), quanto estes hormônios gonadais podem afetar a produção de cortisol pelo córtex da adrenal (Handa e Weiser, 2014; Gallelli *et al.*, 2015). A menor concentração de cortisol salivar e de MFGs no dia 10 do diestro, quando comparado aos demais dias desta fase, condiz com o padrão de concentração plasmática de cortisol encontrado por Benetti *et al.* (2004), além disso, segundo Papa e Hoffmann (2011), no dia 10 do diestro a concentração de E2 sofre queda acentuada. O E2 estimula a produção de glicocorticoides (Viau e Meaney, 1991), sendo assim, a queda acentuada da produção de E2 deste período pode estar relacionada à queda na concentração de cortisol que demonstrada nos resultados.

Apesar das concentrações tanto do cortisol salivar quanto dos MFGs seguirem um mesmo padrão de variação, conforme demonstrado nas figuras 3 e 4, foi identificada ausência de correlação de Pearson entre as duas dosagens hormonais. A ausência da correlação de

Pearson entre as concentrações de cortisol salivar e metabólitos fecais de glicocorticoides é explicada pelo fato da concentração de cortisol salivar ser relativa a um momento específico da produção do cortisol, e reflete a concentração de cortisol de um intervalo de tempo de poucos minutos; enquanto a concentração de metabólitos fecais de glicocorticoides reflete a média de um intervalo de tempo muito maior na produção deste hormônio, para cães pode refletir a média da produção de cortisol de 24 horas (Schatz e Palme, 2001; Dreschel e Granger, 2009; Bennet e Hayssen, 2010; Glenk *et al*., 2014; Cummings *et al*., 2007; Vasconcellos *et al*., 2011)

Este é o primeiro trabalho que definiu a média e o intervalo mínimo e máximo da concentração basal, tanto de cortisol salivar, quanto de MFGs para cadelas em fase de diestro não gestacional.

3.5 Conclusão

A relação entre os efeitos do cortisol na reprodução e a influência dos hormônios reprodutivos na produção de cortisol ainda é uma área com poucos estudos, mas possui grande importância. O conhecimento da interferência do E2 e da P4 na produção de cortisol favorece o cuidado com a redução de vieses em estudos que avaliam o estresse e bem-estar animal através da dosagem de cortisol, mostrando a necessidade de relacionar os resultados obtidos com a fase do ciclo estral ou com a concentração de E2 e P4 do animal avaliado. Ainda, o cortisol em concentração basal é um modulador da reprodução, sendo assim, a definição deste valor é de grande utilidade para a realização de estudos futuros que relacionem problemas reprodutivos com a concentração de cortisol salivar ou MFGs em cadelas.

3.6 Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Demanda Social concedida de novembro de 2016 a fevereiro de 2017. Em seguida com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – São Paulo/Brasil (FAPESP) - (processo n° 2016/22589-4) concedida de março de 2017 a outubro de 2018.

Referências

ANDERSEN, C.Y. Possible new mechanism of cortisol action in female reproductive organs: physiological implications of the free hormone hypothesis. *J. Endocrinol.*, v.173, p.211–217, 2002.

BEERDA, B.; SCHILDER, M.B.H.; VAN HOOFF, J.A.R.A.M.; DE VRIES, H.W. Manifestations of chronic and acute stress in dogs. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, v.52, p.307-319, 1997.

BEERDA, B.; SCHILDER, M.B.H.; VAN HOOFF, J.A.R.A.M.; DE VRIES, H.W.; MOL, J.A. Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, v.58, n.3-4, p.365-381, 1998.

BENETTI, A.H.; TONIOLLO, G.H.; OLIVEIRA, J.A. Progesterone, estradiol 17ß and cortisol serum concentrations during late proestrus, estrus and gestacional diestrus in canine female dog. *Cienc. Rural*, v.34, n.2, p.471-478, 2004.

BENNET, A.; HAYSSEN, V. Measuring cortisol in hair and saliva from dogs: coat color and pigment differences. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v.39, p.171-180, 2010.

CHIDA, D.; MIYOSHI, K.; SATO, T.; YODA, T.; KIKUSUI, T.; IWAKURA, Y. The role of glucocorticoids in pregnancy, parturition, lactation, and nurturing in melanocortin receptor 2-deficient mice. *Endocrinology*, v.152, p.1652–1660, 2011.

CONCANNON, P.W.; MCCANN, J.P.; TEMPLE, M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, v.39 p.3–25, 1989.

CUMMINGS, D.; BROWN, J.L.; RODDEN, M.D.; SONGSASEN, N. Behavioral and physiologic responses to environmental enrichment in the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). *Zoo Biol.*, v.26, p.331-343, 2007.

DOBSON, H.; SMITH, R.F. What is stress, and how does it affect reproduction? *Anim. Reprod. Sci.*, v.60-61, p.743-752, 2000.

DRESCHEL, N.A.; GRANGER, D.A. Methods of collection for salivary cortisol measurement in dogs. *Horm. Behav.*, v.55, p.163-168, 2009.

DUONG, H.T.; PIOTROWSKA-TOMALA, K.K.; ACOSTA, T.J.; BAH, M.M.; SINDEREWICZ, E.; MAJEWSKA, M.; JANKOWSKA, K.; OKUDA, K.; SKARZYNSKI, D.J. Effects of cortisol on pregnancy rate and corpus luteum function in heifers: an in vivo study. *J. Reprod. Develop.*, v.58, n.2, p.223-230, 2012.

ERICHSEN, M.M.; HUSEBYE, E.S.; MICHELSEN, T.M.; DAHL, A.A.; LØVÅS, K. Sexuality and fertility in women with Addison's disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.95, p.4354–4360, 2010.

GALLELLI, M.F.; MONACHESI, N.; MICELI, D.D.; CABRERA BLATTER, M.F.; GOMEZ, N.V.; MEIKLE, A.; CASTILLO, V.A. Plasma ACTH, α-MSH and cortisol variations in the dog during the oestrus cycle in different photoperiods. *Vet. Med.*, v.60, n.10, p.567-577, 2015.

GERAGHTY, A.C.; KAUFER, D. Glucocorticoid regulation of reproduction. In: WANG, J.C.; HARRIS, C (Ed). Glucocorticoid Signaling: From Molecules to Mice to Man. Nova York, NY: Springer, 2015. p.253-278.

GLENK, L.M.; KOTHGASSNER, O.D.; STETINA, B.U.; PALME, R.; KEPPLINGER, B.; BARAN, H. Salivary cortisol and behavior in therapy dogs during animal-assisted interventions: a pilot study. *J. Vet. Bahav.*, v.9, n.3, p.98-106, 2014.

HANDA, R.J.; WEISER, M.J. Gonadal steroid hormones and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Front. Neuroendocrinol.*, v.35, p.197-220, 2014.

HILLER, S.G.; TETSUKA, M. An anti-inflamatory role for glucocorticoids in the ovaries? *J. Reprod. Immunol.*, v.39, p.21–27, 1998.

JOHNSTON, S.D; ROOT KUSTRITZ, M.V.; OLSON, P.N.S. (Ed). Canine and Feline Theriogenology, Philadelphia, PA: Saunders, 2001, 592p.

KELLER-WOOD, M. ACTH responses to hypotension and feedback inhibition of ACTH increased by chronic progesterone treatment. *Am. J. Physiol.*, v.274, p.81-87.

KOBELT, A.J.; HEMSWORTH, P.H.; BARNETT, J.L.; BUTLER, K.L. Sources of sampling variation in saliva cortisol in dogs. *Res. Vet. Sci.*, v.75, p.157-161, 2003.

KOMIYAMA, J.; NISHIMURA, R.; LEE, H.Y.; SAKUMOTO, R.; TETSUKA, M.; ACOSTA, T.J.; SKARZYNSKI, D.J.; OKUDA, K. Cortisol is a suppressor of apoptosis in bovine corpus luteum. *Biol. Reprod.*, v.78, p.888–895, 2008.

LI, X.Q.; ZHU, P.; MYATT, L.; SUN, K. Roles of glucocorticoids in human parturition: a controversial fact? *Placenta*, v.35, p.291–296, 2014.

MCDONALD, L. E (Ed). Veterinary Endocrinology and Reproduction. Philadelphia, PA: Lea and Febinger, 1980, 560p.

MICHAEL, A.E.; THURSTON, L.M.; RAE, M.T. Glucocorticoid metabolism and reproduction: a tale of two enzymes. *Reproduction*, v.126, n.4, p.425–41, 2003.

NISHIYAMA, T.; TSUMAGARI, S.; ITO, M.; KIMURA, J.; WATANABE, G.; TAYA, K.; TAKESHI, M. Immunohistochemical study of steroidogenic enzymes in the ovary and placenta during pregnancy in the dog. *Anat. Histol. Embryol.*, v.28, p.125–129, 1999.

OBAYASHI, K. Salivary mental stress proteins. *Clin. Chim. Acta*, v.425, p.196-201, 2013.

PALME, R.; MÖSTLl, E.; BREM, G.; SCHELLANDER, K.; BAMBERG, E. Faecal metabolites of infused ^{14}C-progesterone in domestic livestock. *Reprod. Domest. Anim.*, v.32, n.4, p.199-206, 1997.

PALME, R.; MÖSTL, E. Measurement of cortisol metabolites in faeces of sheep as a parameter of cortisol concentration in blood. *Int. J. Mammal. Biol.*, v.62, n.2, p.192-197, 1997.

PAPA, P.C.; HOFFMANN, B. The corpus luteum of the dog: source and target of steroid hormones? *Reprod. Domest. Anim.*, v.46, n.4, p.750-756, 2011.

REIMS, T.J.; MUMMERY, L.K.; MCCANN, J.P.; COWAN, R.G.; CONCANNON, P.W. Effects of reproductive state on concentrations of thyroxine, 3,5,3'-triiodothyronine and cortisol in serum of dogs. *Biol. Reprod.*, v.31, p.148-154, 1984.

ROY, B.N.; REID, R.L.; VAN VUGT, D.A. The effects of estrogen and progesterone on corticotrophin-releasing hormone and arginine vasopressin messenger ribonucleic acid levels in the paraventricular nucleus and supratoptic nucleus of the rhesus monkey. *Endocrinology*, v.140, p.2191-2198, 1999.

SCHATZ, S.; PALME, R. Measurement of faecal cortisol metabolites in cats and dogs: A non-invasive method for evaluating adrenocortical function. *Vet. Res. Commun.*, v.25, p.271-287, 2001.

TAIT, A.S.; BUTTS, C.L.; STERNBERG, E.M. The role of glucocorticoid and progestins in inflammatory, autoimmune, and infectious disease. *J. Leukoc. Biol.*, v.84, n.4, p.924-931, 2008.

VASCONCELLOS, A.S.; CHELINI, M.O.M.; PALME, R.; GUIMARÃES, M.A.B. V.; OLIVEIRA, C.A.; ADES, C. Comparison of two methods for glucocorticoid evaluation in maned wolves. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.31, n.1, p.79-83, 2011.

VIAU, V.; MEANEY, M.J. Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. *Endocrinology*, v.129, p.2503-2511, 1991.

WHIRLEDGE, S.; CIDLOWSKI, J.A. Glucocorticoid, stress and fertility. *Minerva Endocrinol.*, v.35, n.2, p.109-125, 2010.

WHIRLEDGE, S.; CIDLOWSKI, J.A. Glucocorticoids and Reproduction: Traffic Control on the Road to Reproduction. *Trends Endocrinol. Metab.*, v.28n n.6, p.399-415, 2017.

WYRWOLL, C.S. Developmental programming and the placenta: focusing in on glucocorticoids. In: SECKL, J.R.; CHRISTEN, Y (Ed). Hormones, Intrauterine Health and Programming, Switzerland: Springer, 2014, p.17–26.

6 CONCLUSÕES

Estes dados sugerem que o CL canino também pode ser influenciado pelo cortisol circulante, assim como pela insulina, de forma similar a outros tecidos nos quais o cortisol interfere na via de sinalização da insulina, podendo causar redução da sensibilidade à insulina e prejuízo na função do tecido ou órgão. Sendo assim, o cortisol pode ter papel fundamental na função luteínica, favorecendo a ocorrência de falhas reprodutivas. Ainda, o conhecimento da interferência do E2 e da P4 na produção de cortisol favorece o cuidado com a redução de vieses em estudos que avaliam o estresse e bem-estar animal através da dosagem de cortisol, mostrando a necessidade de relacionar os resultados obtidos com a fase do ciclo estral ou com a concentração de E2 e P4 do animal avaliado. Como cortisol, em concentração basal, é um modulador da reprodução, a definição deste valor é de grande utilidade para a realização de estudos futuros que relacionem problemas reprodutivos com a concentração de cortisol salivar ou MFGs em cadelas. O melhor entendimento tanto das ações moleculares dos GCs, como das interferências fisiológicas dos hormônios gonadais na produção do cortisol ajudam a entender a complexidade da atuação dos GCs no organismo e especificamente na reprodução animal, servindo como base para futuras pesquisas que visam o estudo do estresse e das falhas reprodutivas.

REFERÊNCIAS

ANDERSEN, C. Y. Possible new mechanism of cortisol action in female reproductive organs: physiological implications of the free hormone hypothesis. **J. Endocrinol.**, v. 173, p. 211–217, 2002.

BEERDA, B.; SCHILDER, M. B. H.; VAN HOOFF, J. A. R. A. M.; DE VRIES, H. W. Manifestations of chronic and acute stress in dogs. **Appl. Anim. Behav. Sci.**, v. 52, p. 307-319, 1997.

BEERDA, B.; SCHILDER, M. B. H.; VAN HOOFF, J. A. R. A. M.; DE VRIES, H. W.; MOL, J. A. Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. **Appl. Anim. Behav. Sci.**, v. 58, n. 3-4, p. 365-381, 1998.

BENEDIKTSSON, R.; YAU, J. L. W.; BRETT, L.P.; COOKE, B.E.; EDWARDS, C. R. W.; SECKL, J.R. 11β-Hydroxysteroid dehydrogenase in the rat ovary: high expression in the oocyte. **J. Endocrinol.**, v. 135, n. 1, p. 53–58, 1992.

BENNET, A.; HAYSSEN, V. Measuring cortisol in hair and saliva from dogs: coat color and pigment differences. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 39, p. 171-180, 2010.

CHIDA, D.; MIYOSHI, K.; SATO, T.; YODA, T.; KIKUSUI, T.; IWAKURA, Y. The role of glucocorticoids in pregnancy, parturition, lactation, and nurturing in melanocortin receptor 2-deficient mice. **Endocrinology**, v. 152, p. 1652–1660, 2011.

CUMMINGS, D.; BROWN, J. L.; RODDEN, M. D.; SONGSASEN, N. Behavioral and physiologic responses to environmental enrichment in the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). **Zoo Biol.**, v. 26, p. 331-343, 2007.

DOBSON, H.; SMITH, R. F. What is stress, and how does it affect reproduction? **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60-61, p. 743-752, 2000.

DRESCHEL, N. A.; GRANGER, D. A. Methods of collection for salivary cortisol measurement in dogs. **Horm. Behav.**, v. 55, p. 163-168, 2009.

DUONG, H. T.; PIOTROWSKA-TOMALA, K. K.; ACOSTA, T. J.; BAH, M. M.; SINDEREWICZ, E.; MAJEWSKA, M.; JANKOWSKA, K.; OKUDA, K.; SKARZYNSKI, D. J. Effects of cortisol on pregnancy rate and corpus luteum function in heifers: an in vivo study. **J. Reprod. Develop.**, v. 58, n. 2, p. 223-230, 2012.

ERICHSEN, M. M.; HUSEBYE, E. S.; MICHELSEN, T. M.; DAHL, A. A.; LØVÅS, K. Sexuality and fertility in women with Addison's disease. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 95, p. 4354–4360, 2010.

FEDORCSÁK, P.; STORENG, G.; DALE, P. O.; TANBO, T.; ABYHOLM, T. Impaired insulin action on granulose-lutein cells in women with polycystic ovary syndrome and insulin resistance. **Gynecol. Endocrinol.**, v. 14, n. 5, p. 327-336, 2000.

GALLELLI, M. F.; MONACHESI, N.; MICELI, D. D.; CABRERA BLATTER, M. F.; GOMEZ, N. V.; MEIKLE, A.; CASTILLO, V. A. Plasma ACTH, α-MSH and cortisol

variations in the dog during the oestrus cycle in different photoperiods. **Vet. Med.**, v. 60, n. 10, p. 567-577, 2015.

GEER, E. B.; ISLAM, J.; BUETTNER, C. Mechanism of glucocorticoid-induced insulin resistance: focus on adipose tissue function and lipid metabolism. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.**, v. 43, n. 1, p. 75-102, 2014.

GERAGHTY, A. C.; KAUFER, D. Glucocorticoid regulation of reproduction. In: WANG, J. C.; HARRIS, C (Ed). **Glucocorticoid Signaling: From Molecules to Mice to Man**. Nova York, NY: Springer, 2015. p.253-278.

GLENK, L. M.; KOTHGASSNER, O. D.; STETINA, B. U.; PALME, R.; KEPPLINGER, B.; BARAN, H. Salivary cortisol and behavior in therapy dogs during animal-assisted interventions: a pilot study. **J. Vet. Bahav.**, v. 9, n. 3, p. 98-106, 2014.

HANDA, R. J.; WEISER, M. J. Gonadal steroid hormones and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **Front. Neuroendocrinol.**, v. 35, p. 197-220, 2014.

HILLER, S. G.; TETSUKA, M. An anti-inflamatory role for glucocorticoids in the ovaries? **J. Reprod. Immunol.**, v. 39, p. 21–27, 1998.

HOFFMANN, B.; HOVELER, R.; NOHR, B.; HASAN, S. H. Investigations on hormonal changes around parturition in the dog and the occurrence of pregnancy specific non conjugated oestrogens. **Exp. Clin. Endocrinol.**, v. 102, n. 3, p. 185–9, 1994.

KOMIYAMA, J.; NISHIMURA, R.; LEE, H. Y.; SAKUMOTO, R.; TETSUKA, M.; ACOSTA, T. J.; SKARZYNSKI, D. J.; OKUDA, K. Cortisol is a suppressor of apoptosis in bovine corpus luteum. **Biol. Reprod.**, v. 78, p. 888–895, 2008.

LI, X. Q.; ZHU, P.; MYATT, L.; SUN, K. Roles of glucocorticoids in human parturition: a controversial fact? **Placenta**, v. 35, p. 291–296, 2014.

LING, Y. H.; XIANG, H.; LI, Y. S.; LIU, Y.; ZHANG, Y. H.; ZHANG, Z. J.; DING, J. P.; ZHANG, X. R. Exploring differentially expressed genes in the ovaries of uniparous and multiparous goats using the RNA-Seq (Quantification) method. **Gene**, v. 15, n. 1, p. 148-153, 2014.

MCDONALD, L. E (Ed). **Veterinary Endocrinology and Reproduction**. Philadelphia, PA: Lea and Febinger, 1980, 560p.

MCDONALD, S. E.; HENDERSON, T. A.; GOMEZ-SANCHEZ, C. E.; CRITCHLEY, H. O. D.; MASON, J. I. 11Betahydroxysteroid dehydrogenases in human endometrium. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 248, n. 1–2, p. 72–8, 2006.

MICHAEL, A. E.; EVANGELATOU, M.; NORGATE, D. P. et al. Isoforms of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase in human granulosa-lutein cells. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 132, n. 1–2, p. 43–52, 1997.

MICHAEL, A. E.; THURSTON, L. M.; RAE, M. T. Glucocorticoid metabolism and reproduction: a tale of two enzymes. **Reproduction**, v. 126, n. 4, p. 425–41, 2003.

NANDI, A.; WANG, X.; ACCILLI, D.; WOLGEMUTH, D. J. The effect of insulin signaling on female function independent of adiposity and hyperglycemia. **Endocrinology**, v. 151, p. 1863-1871, 2010.

NISHIYAMA, T.; TSUMAGARI, S.; ITO, M.; KIMURA, J.; WATANABE, G.; TAYA, K.; TAKESHI, M. Immunohistochemical study of steroidogenic enzymes in the ovary and placenta during pregnancy in the dog. **Anat. Histol. Embryol.**, v. 28, p. 125–129, 1999.

OBAYASHI, K. Salivary mental stress proteins. **Clin. Chim. Acta**, v. 425, p. 196-201, 2013.

QI, J.; WANG, W.; ZHU, Q.; HE, Y.; LU, Y.; WANG, Y.; LI, X.; CHEN, Z.; SUN, Y. Local cortisol elevation contributes to endometrial insulin resistance in polycystic ovary syndrome. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 103, n. 7, p. 2457-2467, 2018.

SCHATZ, S.; PALME, R. Measurement of faecal cortisol metabolites in cats and dogs: A non-invasive method for evaluating adrenocortical function. **Vet. Res. Commun.**, v. 25, p. 271-287, 2001.

SOUSA, L. M. M. C.; SILVA, R. S.; FONSECA, V. U.; LEANDRO, R. M.; DI VINCENZO, T. S.; ALVES-WAGNER, A. B.; MACHADO, U. F.; PAPA, P. C. Is the canine corpus luteum an insulin-sensitive tissue? **J. Endocrinol.**, v. 231, p. 223-233, 2016.

TAIT, A. S.; BUTTS, C. L.; STERNBERG, E. M. The role of glucocorticoid and progestins in inflammatory, autoimmune, and infectious disease. **J. Leukoc. Biol.**, v. 84, n. 4, p. 924-931, 2008.

TETSUKA, M. Expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, glucocorticoid receptor, and mineralocorticoid receptor genes in rat ovary. **Biol. Reprod.**, v. 60, n. 2, p. 330–335, 1999.

TETSUKA, M.; YAMAMOTO S.; HAYASHIDA, N.; HAYASHI, K. G.; HAYASHI, M.; ACOSTA, T. J.; MIYAMOTO, A. Expression of 11β-hudroxysteroid dehydrogenases in bovine follicle and corpus luteum. **J. Endocrinol.**, v. 177, p. 445-452, 2003.

VASCONCELLOS, A. S.; CHELINI, M. O. M.; PALME, R.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; OLIVEIRA, C. A.; ADES, C. Comparison of two methods for glucocorticoid evaluation in maned wolves. **Pesqui. Vet. Bras.**, v. 31, n. 1, p. 79-83, 2011.

WADDELL, B. J.; BENEDIKTSSON, R.; SECKL, J. R. 11-Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in the rat corpus luteum: induction of messenger ribonucleic acid expression and bioactivity coincident with luteal regression. **Endocrinology**, v. 137, n. 12, p. 5386–5391, 1996.

WHIRLEDGE, S.; CIDLOWSKI, J. A. Glucocorticoid, stress and fertility. **Minerva Endocrinol.**, v. 35, n. 2, p. 109-125, 2010.

WHIRLEDGE, S.; CIDLOWSKI, J. A. Glucocorticoids and Reproduction: Traffic Control on the Road to Reproduction. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 28, n. 6, p. 399-415, 2017.

WYRWOLL, C. S. Developmental programming and the placenta: focusing in on glucocorticoids. In: SECKL, J. R.; CHRISTEN, Y. (Ed). **Hormones, Intrauterine Health and Programming**, Switzerland: Springer, 2014, p.17–26.