FILIPPE FEDOZZI

**Caracterização protéica do micro-ambiente uterino durante
o período crítico em bovinos**

Pirassununga

2008

FILIPPE FEDOZZI

**Caracterização protéica do micro-ambiente uterino durante
o período crítico em bovinos**

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

DEPARTAMENTO:

Reprodução e Produção Animal

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:

Reprodução e Produção Animal

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Mário Binelli

Pirassununga

2008

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.1963
FMVZ

Fedozzi, Filipe

Caracterização protéica do micro-ambiente uterino durante o período crítico em bovinos / Filipe Fedozzi. – Pirassununga: F. Fedozzi, 2008.
113 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução e Produção Animal, 2008.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução e Produção Animal.
Área de concentração: Reprodução e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Mário Binelli.

1. Ambiente uterino. 2. Proteínas. 3. Eletroforese bidimensional.
4. Prenhez. 5. Bovino. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização do micro-ambiente uterino durante o período crítico para a manutenção da gestação em bovinos: perfil protéico de lavados uterinos", protocolado sob o nº918/2006, utilizando 30 (trinta) bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Mario Binelli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 16/08/06".

(We certify that the Research "Characterization of the uterine microenvironment during the critical period for maintenance of pregnancy in cows: protein profile of uterine washings", protocol number 918/2006, utilizing 30 (thirty) bovines, under the responsibility of Prof. Dr. Mario Binelli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 08/16/2006).

São Paulo, 17 de agosto de 2006

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FEDOZZI, Filipe

Título: Caracterização protéica do micro-ambiente uterino durante o período crítico em bovinos

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATORIA

Ao meu pai,

Modesto Fedozzi

Com todo amor e gratidão, pelo incentivo em todas as horas que precisei, pelos conselhos e carinho nos momentos de difíceis decisões em minha vida, pela participação constante em minhas alegrias e tristezas, pelo esforço e dedicação que tornou possível a realização dessa etapa e principalmente, pelo que você sempre foi e é.

A minha Família (Mãe, irmã e sobrinho),

Elisabete Mazero, Nathalia Fedozzi e João Victor.

Pela personalidade, pela sinceridade, pelo carinho e amor, pelo exemplo de serem batalhadores e conquistadores na vida e sobre tudo por depositar em mim, a confiança dessa etapa.

A minha noiva,

Marina DeNadai Bonin

Pela pureza e simplicidade, pelo amor, carinho e ternura, pela coragem e valentia que sempre demonstra nos momentos difíceis, pela vontade de vencer e viver de maneira digna, pela força e confiança que deposita em mim, por saber ser mulher e nobre em minha vida.

AMO VOCÊS,
MEU ETERNO RECONHECIMENTO
E GRATIDÃO.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Mário Binelli pela orientação, dedicação, ensinamentos e profissionalismo.

À Universidade de São Paulo e à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, especialmente ao Departamento de Reprodução Animal.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro na qual permitiu meu envolvimento de maneira integral com o trabalho na área de pesquisa.

A Prefeitura do Campus Administrativo de Pirassununga pelo apoio e cessão dos animais

A Profa. Dra. Erica Zimmerknopf pela co-orientação, amizade e oportunidade que me proporcionou e a confiança que em mim depositou.

Ao Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda pela amizade e ensinamentos, assim como a disponibilização do sêmen e materiais utilizados nos experimentos.

Ao Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira pelas longas conversas orientadoras e materiais cedidos para realização dos experimentos.

A Prof. Anneliese de Souza Traldi pela orientação e companheirismo.

Aos Professores do Departamento de Reprodução animal da FMVZ/USP pelos ensinamentos e ajuda prestada.

A Comissão de Pós-graduação pela ajuda e confiança no meu trabalho.

A Harumi, secretária da Pós-graduação do Departamento de Reprodução Animal por toda atenção oferecida.

A Isabel, secretária do VRA-USP/Pirassununga pela atenção e ajuda.

À equipe de pesquisa do LFEM Cláudia Maria Bertan Membrive, Vanessa Marques, Marcelo Cardoso de Lima, André Freire, Fabiana Bressan, Rafael S. Bisinotto, Bruna Ibiapina, Eduardo Pontes, Adriano Siqueira, Mariana Giessetti, Claudia Niemeyer por toda ajuda oferecida.

A amiga Prof.^a Cláudia Maria Bertan Membrive por toda ajuda e ensinamentos prestados.

Ao amigo Marcelo Cardoso de Lima pelo apoio e ajuda na realização do experimento

Aos meus amigos e irmãos, Silas e André Freire, por todos esses anos de amizade e companheirismo, juntos independente de tudo.

Aos amigos da pós-graduação pela amizade, carinho, incentivo e colaborações constantes e pelo convívio diário, compartilhando alegrias e tristezas, tornando a vida na pós-graduação mais familiar. André Furugem, José Rodrigo Pimentel, Fernando Pardo, Fernando Braga, Fabian, Raquel Fernandes e Cláudia Fernandes Raphael.

Aos funcionários da prefeitura do campus administrativo de Pirassununga e da FMVZ, especialmente ao Fernando Schalch.

Aos funcionários do CBRA Marcio, José Maria, João, Carlinhos, Edna e Creusa.

Aos funcionários do Abatedouro Escola da prefeitura do Campus Administrativo Élcio, Mauricio, Dito Beloni, Dito Rodrigues e Dori por toda colaboração e amizade construída durante o experimento.

Ao Centro Paulista de Desenvolvimento Farmacotécnico pela doação de hormônios e fármacos, necessários para a realização dos experimentos.

Ao Dr. Marcelo Roncoletta pelos ensinamentos e auxílio durante as análises do experimento.

Ao Prof. Greene e sua equipe pela ajuda nas análises do experimento.

Ao Prof. Paulo Sobral e sua equipe por ceder seu laboratório e seus equipamentos.

Ao Prof. Marcelo de Cerqueira César e as técnicas do laboratório Mirella e Alessandra, pela enorme ajuda e apoio na conclusão do experimento.

À Profa. Dra. Maria Angélica Miglino do Departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres FMVZ-USP pelo apoio científico.

Aos animais pelo conhecimento e desenvolvimento científico que me proporcionou.

Enfim, a todos que têm colaborado de maneira direta ou indireta para a realização deste trabalho, dedico meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

FEDOZZI, F. **Caracterização protéica do micro-ambiente uterino durante o período crítico em bovinos.** [Characterization of the protein profile of the uterine environment during the critical period in cattle]. 2007. 113 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Em bovinos, o sucesso no estabelecimento da gestação depende de interações entre o conceito e o útero. Tais interações ocorrem através de moléculas presentes no ambiente uterino. Falhas nesse processo causam 30-40% de perdas de gestação. As proteínas são constituintes desse ambiente e possuem um importante papel nesse processo. Objetivou-se na presente dissertação caracterizar o perfil protéico do ambiente uterino de fêmeas bovinas, ciclando ou prenhes, durante o período crítico, utilizando eletroforese bidimensional. O objetivo específico foi comparar a composição protéica de lavados uterinos obtidos *in vivo*, por sonda de folley ou *post-mortem* no dia 18 após o estro de vacas não inseminadas ou gestantes. Para a obtenção das amostras, 48 fêmeas bovinas tiveram seu ciclo estral sincronizado e foram alocadas aleatoriamente para receberem lavagens *in vivo* por sonda de folley (12 inseminadas e sete não inseminadas) ou para receberem lavagens *post-mortem* (12 inseminadas e cinco não inseminadas) no dia 18 após o estro. Após a coleta, os lavados foram processados e submetidos à eletroforese bidimensional. Os géis foram analisados utilizando o programa Image Master-2D ELITE V. 4.01 (GE Healthcare) para determinação do ponto isoelétrico (PI) e peso molecular relativo (PMR) das proteínas nos diferentes grupos e análise da densidade óptica. Foram selecionadas 178 proteínas presentes nos lavados. Em relação à distribuição das proteínas de acordo com o ponto isoelétrico, 74% (132/178) apresentaram PI entre 5,5 e 8, em relação ao peso molecular, 44% (79/178) das proteínas possuíam PMR menor que 50KDa enquanto 54% (95/178) entre 50 e 100KDa. Nos lavados realizados por sonda de folley (FC ou FP) foram selecionadas 151 proteínas, sendo 96 nos lavados de animais cíclicos e 86 nos prenhes. Os lavados realizados *post-mortem* (PMC ou PMP) apresentaram apenas 54 proteínas, das quais 24 estiveram presentes nos lavados PMC e 36 nos lavados PMP. Em relação ao estado reprodutivo 115 proteínas foram encontradas nos lavados dos animais cíclicos (FC ou PMC), enquanto 104 proteínas foram selecionadas nos lavados de animais prenhes (FP e PMP).

Entre os lavados realizados por sonda de folley (FC e FP) 31 proteínas foram comuns entre os estados, enquanto entre os lavados realizados *post-mortem* (PMC e PMP) apenas seis proteínas estiveram presentes em ambos os lavados. Nos lavados realizados em animais ciclando (FC e PMC) cinco proteínas estiveram presentes em ambos os tipos de lavados, enquanto nos lavados realizados em animais prenhes (FP e PMP) 18 proteínas foram comuns em ambos os tipos de lavado. Entre os lavados FC e PMP ou FP e PMC, 15 e 6 proteínas, respectivamente, foram comuns. As proteínas presentes exclusivamente nos lavados de vacas prenhes, possivelmente estão envolvidas no diálogo materno-embrionário durante o processo de estabelecimento da gestação. Proteínas detectadas exclusivamente nos lavados obtidos via sonda de folley podem ser devidas ao influxo de proteínas do soro sanguíneo em resposta à manipulação do trato reprodutivo durante a obtenção dos lavados. Esperava-se uma maior efetividade dos lavados realizados *post-mortem* em relação aos realizados por sonda de folley. Entretanto os lavados obtidos por sonda de folley foram melhores por identificar um maior número de proteínas, permitindo identificar diferenças maiores entre os lavados de animais ciclando e prenhes. Concluiu-se que a eletroforese bidimensional constitui um método adequado para avaliar quantitativamente o perfil protéico do ambiente uterino bovino e que tanto o estado reprodutivo quanto o método de obtenção de lavados uterinos modificam sua composição protéica. Novos estudos são necessários para se obter a sequência de aminoácidos das proteínas localizadas para que se conheça sua identidade e função na gestação inicial de bovinos.

Palavras-chave: Ambiente uterino. Proteínas. Eletroforese bidimensional. Prenhez. Bovino.

ABSTRACT

FEDOZZI, F. **Characterization of the protein profile of the uterine environment during the critical period in cattle.** [Caracterização protéica do micro-ambiente uterino durante o período crítico em bovinos]. 2008. 113 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

In the cattle, the outcome for the establishment of pregnancy depends on interactions between conceptus and uterus. These interactions occur through molecules presents in the uterine environment. Failure in this process causes 30-40% of loss in gestation. The proteins are component of this environment and have a important role in this process. The aim of this dissertation was to characterize the protein profile of the uterine environment in cows, cyclic or pregnant, during the critical period, using two-dimensional electrophoresis. The specific aim was to compare the protein composition of uterine washings recovered *in vivo*, through a folley catheter, with washings recovered *post-mortem* at day 18 after estrus of not inseminated or pregnant cows. To obtain the samples 48 cows had their estrous synchronized and here aleatoric put in the group to receive washings *in vivo* through the folley catheter (12 inseminated and seven not inseminated) or to be washed *post-mortem* (12 inseminated and five not inseminated) at day 18 after estrus. After the recover, the washings were proceeded and submitted to two-dimensional electrophoresis. The gels were analyzed using the software Image Master-2D ELITE V. 4.01 (GE Healthcare) to determine the isoelectric point (PI) and relative molecular weight (PMR) of the proteins presents in the different groups and analysis of the optical density. One hundred and seventy eight proteins were presents in the washings. The distribution of the proteins according to the PI, 74% (132/178) had PI between 5,5 and 8 and according to the PMR 44% (79/178) of the proteins showed PMR lower than 50KDa, while 54% (95/178) had PMR between 50 and 100KDa. In the washings recovered through the folley catheter (FC and FP) 151 proteins were selected, being 96 from the cyclic cows and 86 from the pregnant cows. The washings recovered *post-mortem* (PMC and PMP) showed only 54 proteins, from those 24 were present in the cyclic animals and 36 in the pregnant animals. According to the reproductive status 115 proteins were found in the washings from the cyclic animals (FC and

PMC), while 104 proteins were selected from the washings of the pregnant animals (FP and PMP). Among the washings recovered through the folley catheter (FC and FP) 31 proteins were the same between the reproductive status. While in the washings recovered *post-mortem* (PMC and PMP) only six proteins were present in both washings. In washings done in the cyclic animals (FC and PMC) five proteins were presents in both kind of washings, while in washings done in the pregnant animals (FP and PMP) 18 proteins were the same in both kind of washings. Among the washings FC and PMP or FP and PMC, 15 and six proteins, respectively were the same. The proteins presents exclusively in the washings of the pregnant animals are probably involved with the embryo-maternal interplay during the process of pregnancy establishment. Proteins detected exclusively in the washings recovered through the folley catheter may be inflow of proteins from the serum, in response to the uterine manipulation during the process of washing. It was expected a better effect from the washings *post-mortem* than the ones through the folley catheter. However the washings from the folley catheter had a better result, because they identified a greater number of proteins which allowed identify greater differences between the washings from cyclic and pregnant animals. In conclusion, the two-dimensional electrophoresis is a adequate method to analyze the quantitatively proteins profile of the uterine environment in the cow and that both the reproductive status and the method to obtain the uterine washings modify the proteins composition. New studies are necessary to obtain the amino acids sequence of the proteins found so that we know their identity and function in the beginning of pregnancy in the cow.

Key words: Uterine environment. Proteins. Two-dimensional electrophoresis. Pregnancy. Bovine.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fotografia dos conceptos encontrados nos lavados uterinos obtidos por sonda de folley (A) e *post-mortem* (B).....Pagina - 50
- Figura 2 - Representação esquemática dos procedimentos experimentais.....Pagina - 51
- Figura 3 - Fotografia do procedimento de infusão de ringer pelo procedimento de lavagem uterina por sonda de folley..... Pagina - 52
- Figura 4 - Fotografia do procedimento de recuperação do lavado uterino por sonda de folley.....Pagina - 52
- Figura 5 - Fotografia do aparelho reprodutivo coletado após o abate dos animais.....Pagina - 53
- Figura 6 - Útero dissecado e identificado para coleta de lavado uterino *post-mortem*.....Pagina - 54
- Figura 7 - Fotografia da infusão de ringer no corno uterino contra-lateral ao CL.....Pagina - 54
- Figura 8 - Fotografia do processo de massageamento do útero no sentido de lavagem do corno contra-lateral para o ipso-lateral ao CL.....Pagina - 55
- Figura 9 - Fotografia da colheita do lavado uterino e concepto (no caso de animais prenhes).....Pagina - 55
- Figura 10 - Fotografia do processo de liofilização das amostras.....Pagina - 56
- Figura 11 - Fotografia do processo de reidratação das fitas com as amostras liofilizadas.....Pagina - 58
- Figura 12 - Fotografia das fitas reidratadas prontas para a focalização isoeletrica no aparato Ettan IPGphor II IEF.....Pagina - 58
- Figura 13 - Fotografia da incubação das amostras sobre a plataforma agitadora com solução SDS de equilíbrio.....Pagina - 60
- Figura 14 - Fotografia do posicionamento dos géis na cuba de corrida da segunda dimensão da 2D-EF.....Pagina - 60
- Figura 15 - Fotografia do processo de coloração dos géis com Comassie Stain Solution.....Pagina - 60

Figura 16 - Gel representativo do perfil protéico bi-dimencional dos lavados uterinos coletados por sonda de folley de vacas ciclando (A) ou prenhes (B), ou *post-mortem* de animais ciclando (C) ou prenhes (D)..Pagina - 66

Figura 17 - Média aritmética ($\pm$ erro padrão da média) do volume normalizado de proteínas que apresentaram efeito de estado, tipo de lavado ou interação estado x tipo de lavado ($P < 0,05$), em lavados uterinos coletados por sonda de folley (---○---) ou *post-mortem* (—●—) de animais cíclicos (C) ou prenhes (P) no dia 18 pós-estro.....Pagina - 71

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Sumário da distribuição por ponto isoelétrico (PI) e peso molecular relativo (PMR) das proteínas identificadas por região do gel dos lavados uterinos coletados por sondas de folley ou *post-mortem* de vacas ciclando (C) ou prenhes (P) 18 dias pós-estro.....Pagina - 65
- Tabela 2 – Número de proteínas presentes concomitantemente em lavados uterinos listados nas linhas e colunas, coletados por sonda de folley (F) ou *post-mortem* (PM) de vacas ciclando (C) ou prenhes (P) 18 dias pós-estro..... Pagina - 68
- Tabela 3 - Número de proteínas presentes em lavados uterinos listados nas linhas, mas ausentes em lavados uterinos listados nas colunas, coletados por sonda de folley (F) ou *post-mortem* (PM) de vacas ciclando (C) ou prenhes (P) 18 dias pós-estro..... Pagina - 69
- Tabela 4 - Sumário da análise de variância da densidade óptica (volume normalizado) das proteínas identificadas nos lavados uterinos coletados por sonda de folley (F) ou *post-mortem* (PM) de vacas ciclando (C) ou prenhes (P) 18 dias pós-estro..... Pagina - 70

LISTA DE APÊNDICES

- Apêndice A - Peso molecular, ponto isoelétrico e frequência de ocorrência de proteínas presentes em lavados uterinos coletados por sonda de *Folley* (F) ou *post-mortem* (PM) de animais cíclicos (C) ou prenhes (P) no dia 18 pós-estro.....Pagina - 102
- Apêndice B - Média aritmética ($\pm$ erro padrão da média) do volume normalizado de proteínas presentes em lavados uterinos coletados por sonda de Folley (F) ou Post-mortem (PM) de animais cíclicos (C) ou prenhes (P) no dia 18 pós-estro.....Pagina - 106
- Apêndice C - Análise de variância do volume normalizado de proteínas presentes em lavados uterinos coletados por sonda de *Folley* ou *Post-mortem* (efeito de tipo de lavado) de animais cíclicos ou gestantes (efeito de estado) no dia 18 pós-estro.....Pagina - 110

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA	23
2. 1 Desenvolvimento embrionário	23
2. 2 Hormônios envolvidos na gestação.....	24
2. 3 Reconhecimento materno da gestação	27
2. 4 INF- τ e bloqueio da luteólise.....	29
2. 5 Mortalidade embrionária	32
2. 6 Caracterização do ambiente uterino de bovinos	35
2. 7 Métodos de estudo para caracterização protéica do ambiente uterino..	36
2.7.1 Técnicas para análise da composição protéica do ambiente uterino	37
2.7.2 Eletroforese Bidimensional.....	38
2.8 Proteínas presentes no ambiente uterino durante o ciclo estral e a prenhez em bovinos	42
3 MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1 Manejo reprodutivo e delineamento experimental	49
3.1.2 Obtenção dos lavados uterinos <i>in vivo</i> e <i>Post-mortem</i>	51
3.1.3 Preparação das amostras para Eletroforese	55
3.1.4 Eletroforese Bidimensional.....	57
3.1.5 Análise dos géis de Eletroforese Bidimensional.....	61
3.1.6 Radioimunoensaio para Progesterona.....	62
3.1.7 Análise estatística	62
4 RESULTADOS.....	64
5 DISCUSSÃO	77
6 CONCLUSÕES E IMPLICAÇÕES.....	84
REFERÊNCIAS.....	87
APÊNDICES	102

1 INTRODUÇÃO

A pecuária bovina de corte tem um importante papel sócio-econômico mundial. Foram produzidas no ano de 2006, em equivalente de carcaça, 53,5 milhões de toneladas de alimento para a população mundial (SECEX/MDIC, 2007).

O PIB do setor agropecuário brasileiro atingiu R\$ 148,31 bilhões em 2006. A balança comercial do agronegócio registrou saldo de US\$ 39,32 bilhões, de janeiro a novembro de 2006, representando 96% do saldo total da balança comercial brasileira no período (SECEX/MDIC, 2007).

O Brasil produziu em 2006 aproximadamente 8,9 milhões de toneladas de carne bovina, em equivalente de carcaça, dos quais 2,22 milhões de toneladas foram destinados à exportação. Esse valor representa 30% do comércio mundial do produto (SECEX/MDIC, 2007).

Assim como a pecuária, a agricultura teve um grande destaque no PIB e na balança comercial brasileira no ano de 2006. Aquecido pela agroenergia, o setor sucro-alcooleiro encontra uma grande oportunidade no mercado internacional com a busca por combustíveis renováveis. Este cenário gera uma competitividade dentro do próprio setor agropecuário, o que exige que a pecuária bovina de corte aumente sua produtividade e lucratividade para permanecer economicamente viável.

Um dos indicadores relacionados à produtividade da pecuária de corte é o desempenho reprodutivo, o qual tem como referência o intervalo entre partos de aproximadamente 12 meses. Embora atualmente a pecuária nacional tenha atingido um alto nível tecnológico, alguns fatores prejudicam o desempenho reprodutivo dos animais. Esses fatores mantêm a média de intervalo entre partos do rebanho brasileiro em 22 meses. Com isso, diminui a produtividade, lucratividade e consequentemente a competitividade da pecuária.

Sabe-se que fêmeas bovinas zebuínas possuem uma gestação de aproximadamente 290 dias e que após o parto as matrizes passam por um estado fisiológico conhecido como anestro pós-parto com duração de aproximadamente 45 dias. Esse período pode se estender de acordo com o escore corpóreo do animal, sistema de produção e nível nutricional. Este período permite a reestruturação do

aparelho reprodutor assim como o restabelecimento dos mecanismos endócrinos responsáveis pela ciclicidade nos animais, tendo seu final determinado pela primeira ovulação fértil (YAVAS; WALTON, 2000). Com a duração média de um ciclo estral de 21 dias, adicionado ao período de anestro pós-parto e ao da gestação, é grande o desafio de obter um intervalo entre partos de 365 dias. Por exemplo, a ocorrência de falhas no processo de estabelecimento da prenhez eleva o intervalo entre partos, prejudicando a eficiência e a lucratividade da pecuária.

Para se entender a natureza de tais falhas, é necessário recordar que a partir da ovulação do folículo dominante ocorre a formação do corpo lúteo (CL). Essa estrutura reprodutiva transitória é responsável pela secreção de progesterona, hormônio fundamental para a gestação. Para o estabelecimento da gestação é necessário que o conceitoo (embrião e membranas anexas) sinalize sua presença no útero. Esse processo é caracterizado por um diálogo molecular entre o conceitoo e a fêmea e resulta em mecanismos para a manutenção do CL e, conseqüentemente, da gestação. Esse processo é denominado reconhecimento materno-embriônico (HAFEZ, 2004).

Os dias 15 a 19 após o estro constituem um período crítico para a manutenção da gestação. Nesse período, o útero, de animais não gestantes produz e libera pulsos de prostaglandina F₂ α (PGF₂ α), molécula responsável pela luteólise, que se caracteriza pela regressão funcional e estrutural do corpo lúteo. Após a diminuição na concentração plasmática de progesterona ocorrem as etapas finais do crescimento do folículo dominante pré-ovulatório, culminando na sua ovulação e início de um novo ciclo estral. Entretanto, na ocorrência da concepção, o mecanismo luteolítico deve ser bloqueado para possibilitar o estabelecimento da gestação.

Falhas no processo de bloqueio da luteólise foram relacionadas à mortalidade embrionária precoce, responsável por 30 a 40% das perdas embrionárias nas fêmeas bovinas (DISKIN; SREENAN, 1980; HUMBLLOT 2001; SANTOS et al., 2004). Tais perdas representam grande limitação biológica para que se atinjam índices reprodutivos satisfatórios.

As causas de tais perdas são pouco conhecidas, mas têm sido associadas a um ambiente uterino inapropriado. Nos ruminantes ungulados como ovinos, caprinos e bovinos, o micro-ambiente uterino é composto por macromoléculas, secretadas pelo conceitoo e endométrio e oriundas da circulação periférica. Entende-se que

concentrações relativas ótimas dessas macromoléculas, especialmente as proteínas, são necessárias para a manutenção funcional do corpo lúteo e desenvolvimento do conceito. Desta forma torna-se evidente o interesse em desenvolver metodologias para caracterização protéica do micro-ambiente uterino durante o período crítico.

A Eletroforese Bidimensional (2D-EF), combinada com a identificação de proteínas por espectrometria de massa é atualmente a melhor ferramenta para análises proteômicas. A 2D-EF é uma tecnologia que pode ser rotineiramente aplicada para análises quantitativas do perfil de expressão de proteínas. A técnica possibilita a separação de proteínas de acordo com seu ponto isoelétrico (PI), peso molecular (PMR), solubilidade e abundância relativa (GORG et al., 2004).

Portanto, o **objetivo geral** desse estudo foi caracterizar o perfil protéico do micro-ambiente uterino de fêmeas bovinas, não inseminadas e gestantes, durante o período crítico. Foi delineado o **objetivo específico** de comparar a composição protéica de lavados uterinos obtidos *in vivo*, por sonda de folley ou *post-mortem* no dia 18 após o estro de vacas não inseminadas ou gestantes, utilizando 2D-EF.

A **hipótese** da presente tese é que ocorrem diferenças no perfil de proteínas presentes em lavados uterinos entre animais cíclicos e gestantes obtidos por sonda de folley ou *post-mortem* no período crítico em bovinos.

2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

Nessa revisão de literatura foram abordados os conceitos relacionados ao processo de reconhecimento materno da gestação. Para isso foram descritas as etapas do desenvolvimento embrionário e seu controle hormonal, foi avaliado o efeito da mortalidade embrionária nesse período e destacou-se a importância do estudo do ambiente uterino e das proteínas presentes nesse meio.

2. 1 Desenvolvimento embrionário

Para a padronização dos termos utilizados na reprodução de bovinos, o Comitê de Nomenclatura na Reprodução Bovina (1972) estabeleceu que o período embrionário da gestação se estende da concepção até o final do estágio de placentação, aproximadamente com 42 dias de gestação, e que o período fetal se estende do 42º dia até o parto.

Depois da fertilização, o embrião alcança o útero em período que varia dependendo da espécie. Passando por aproximadamente uma divisão mitótica por dia, o zigoto da vaca chega ao útero entre o 3º e 5º dia de gestação com 16 a 32 células, no estágio de mórula, mantendo ainda sua capacidade de totipotência. Nesse estágio, o embrião ainda está rodeado da zona pelúcida. No dia 6 a 7 nos bovinos, começa a diferenciação do embrião, evidenciada pela formação do trofoblasto, da massa celular interna e da blastocela. Nesse estágio, a zona pelúcida se desprende e o trofoblasto que rodeia a massa celular interna demarca os limites externos do blastocisto, nome dado ao embrião neste estágio, ficando em contato com as secreções uterinas (SPENCER et al., 2006).

O estabelecimento da gestação em ruminantes domésticos (ovinos, bovinos e caprinos) se inicia no estágio de blastocisto e envolve sinais de reconhecimento da prenhez (SPENCER et al., 2006). De acordo com Guillomot (1995), as fases do

estabelecimento da gestação são divididas em eclosão da zona pelúcida; pré-contato e orientação do blastocisto; alongamento do concepto; aposição; adesão; e implantação. Todas essas fases ocorrem nos ruminantes domésticos, a implantação nessas espécies se dá a partir 42º dia da gestação através da formação dos placentomas, que permitem um contato íntimo entre a fêmea e o feto, possibilitando as trocas entre as circulações (SPENCER et al., 2006).

Durante o período peri-implantação, as células gigantes binucleadas (CGB) do trofoblasto começam a se diferenciar a partir das células mononucleadas do trofoectoderma, migram e se fundem com o epitélio luminal do endométrio, assim como entre si, para formarem as placas sinciciais multinucleadas. As CGB do trofoblasto secretam moléculas que agem nas glândulas endometriais para estimular sua diferenciação morfológica e funcional (SPENCER et al., 2006).

A implantação do embrião nos mamíferos se inicia próximo ao seu local de contato com o útero e se estende perifericamente. Depois da aposição entre o concepto e o útero, vem a fase de adesão com intervenção de glicoproteínas de membrana, seguida da interdigitação entre o trofoblasto e o endométrio (SPENCER et al., 2006).

O ambiente uterino fornece os nutrientes e o meio físico-químico adequado para o desenvolvimento do embrião desde sua chegada no útero até a sua implantação. As mudanças que ocorrem nas secreções uterinas são hormônio-dependente e constituem a base da sincronia entre o embrião e o útero (SPENCER et al., 2006).

2.2 Hormônios envolvidos na gestação

Durante o início da prenhez, o útero dos mamíferos é exposto sequencialmente ao estrógeno, progesterona (P_4), $INF-\tau$ e ao lactogênio placentário. Resulta dessa exposição o início, manutenção e diferenciação morfológica e funcional das glândulas endometriais de forma a dar suporte à gestação (SPENCER; BAZER, 2004).

Durante a prenhez, a foliculogênese diminui, assim como se reduz a produção de estrógeno por folículo no ovário ipsolateral ao corno uterino prenhe. Isso sugere que o estrógeno desempenha um papel importante no processo de luteólise, e que a supressão dos efeitos luteolíticos do estrógeno é necessária para o estabelecimento da prenhez (THATCHER et al., 2001). Porém, Goff (2002) destaca que o estradiol e a P_4 agem no endométrio estimulando a síntese de varias proteínas e prostaglandinas importantes no período crítico.

A P_4 possui um papel fundamental no estabelecimento e na manutenção da prenhez em mamíferos. Em todo o útero dos mamíferos, os receptores de progesterona (PR) estão expressos no epitélio e estroma endometrial durante o início da fase luteal, permitindo uma regulação direta na transcrição de uma série de genes. Entretanto, a exposição continua do endométrio à P_4 diminui a expressão dos PR no epitélio endometrial (SPENCER; BAZER, 2004). A expressão dos PR é detectável no estroma e no miométrio de ovinos durante a maior parte da gestação. O paradigma da diminuição na quantidade dos PR no epitélio após a implantação ocorre na ovelha (SPENCER et al., 1995), nas vacas (KIMMINS; MACLAREN, 2001) e nas porcas (GEISERT et al., 1994). A P_4 age no útero para estimular e manter as funções uterinas que permitem o desenvolvimento embrionário inicial, a implantação, a placentação e o desenvolvimento fetal a termo. Para a manutenção da gestação são necessárias interações entre o concepto e o endométrio. Nos animais domésticos as glândulas endometriais passam por um processo de hiperplasia seguido de hipertrofia, que se mostra dependente das ações dos hormônios placentários. As alterações na morfologia das glândulas endometriais durante a prenhez possibilitam que o endométrio aumente a secreção de proteínas. A nutrição histotrófica do endométrio é responsável pelo desenvolvimento do concepto no período pré-implantação, sendo essencial para a sobrevivência e crescimento do concepto nessa fase da gestação em animais domésticos (SPENCER; BAZER et al., 2004).

Em bovinos, a concentração plasmática sistêmica de P_4 durante a fase luteal, afetou o volume das secreções uterinas (GARRET et al., 1988), a taxa de desenvolvimento do concepto (GARRET et al., 1988; MANN, et al., 1996) e a capacidade do concepto de sintetizar $INF-\tau$ (GARRET et al., 1988; KERBLER et al., 1997; MANN et al., 1999).

No endométrio, a P_4 age como um fator de diferenciação (CUMMINGS; YOCHIM, 1984). Durante a fase folicular do ciclo estral, o estrógeno induz a proliferação celular no endométrio. Porém, concentrações elevadas de P_4 , durante a fase luteal do ciclo estral, inibe a mitose no endométrio (PADYKULA et al., 1989). A P_4 também induz a diferenciação do estroma em associação com o acúmulo de vacúolos basal no epitélio glandular (MASLAR et al., 1986), e alterações no padrão de proteínas secretadas pelas células endometriais (MASLAR et al., 1986). Essas proteínas uterinas proporcionam um ambiente favorável ao desenvolvimento embrionário precoce. No miométrio, a P_4 induz a quiescência causando alterações iônicas nas células miometriais (PARKINGTON, 1983), diminuindo a passagem de cálcio do meio extracelular para o meio intracelular (TEZUKA et al., 1995). A prevenção nas contrações uterinas também ocorre pelo bloqueio na capacidade do estradiol em induzir os receptores α -adrenergicos, cuja ativação causa contrações uterinas (BOTTARI et al., 1983). Em bovinos, o embrião/feto é dependente da P_4 luteal até o 200º dia da gestação (CHEW et al., 1979). Para a manutenção da gestação no terço final (após 200 dias) é necessário que a placenta sintetize P_4 , devido ao fato da atividade do corpo lúteo decair drasticamente a partir desse período (SHEMESH, 1990). Porém, a P_4 sintetizada, presumidamente age diretamente no útero, uma vez que a placenta não contribui para a concentração plasmática periférica de P_4 , até próximo ao parto (SHEMESH, 1990).

A importância e efeitos do $INF-\tau$ sobre o processo de estabelecimento da gestação nos bovinos, serão tratados em uma seção a seguir.

A placenta de várias espécies, incluindo roedores, humanos, primatas, ovinos e bovinos, secreta hormônios, estruturalmente relacionados à prolactina pituitária e ao hormônio do crescimento (GH), chamados de lactogênio placentário (LP) (SOARES, 2004). O termo lactogênio placentário se origina do fato desses hormônios exibirem atividade similar a prolactina em vários ensaios (ANTHONY et al., 1995). O LP é produzido pelas células binucleadas do trofoblasto do conceito, mas a regulação da sua síntese e secreção não foi esclarecida. Em ovinos esse processo se inicia a partir do 16º dia da gestação, é detectado no soro materno no 50º dia e atinge um pico no sangue materno entre os dias 120 e 130 da gestação (ANTHONY et al., 1995; MARTIAL; DJIANE, 1975). O LP dos ruminantes foi purificado da placenta de ovinos (WARREN et al., 1990), caprinos (CURRIE et al., 1990), e bovinos (MURTHY et al., 1982).

O LP age ativando os receptores de prolactina e do GH, o que sugere que este seja o principal mecanismo do LP *in vivo* (GERTLER; DJIANE, 2002).

Os hormônios regulam e caracterizam o ambiente uterino de acordo com o estado fisiológico. A gestação altera a síntese e secreção hormonal, preparando o ambiente uterino para o processo de reconhecimento e manutenção da gestação.

2.3 Reconhecimento materno da gestação

Os ruminantes domésticos ovulam espontaneamente e seu ciclo estral é útero-dependente, até o estabelecimento da prenhez (MCCRACKEN et al., 1999). O estabelecimento da gestação envolve uma série de processos, entre eles o reconhecimento da gestação e a implantação (SPENCER; BAZER et al., 2004).

O reconhecimento materno da gestação pode ser definido como um processo fisiológico no qual o conceito (embrião e membranas anexas) sinaliza a sua presença para o organismo materno e prolonga o período funcional do corpo lúteo (CL) (SPENCER; BAZER et al., 2004). Esse processo envolve uma comunicação bioquímica entre o conceito e a fêmea, capaz de bloquear a produção de prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$) e assim manter a síntese e liberação de progesterona (P_4) pelo CL (SHOLL et al., 1983). O prolongamento do período funcional do CL é uma característica distinta da gestação de mamíferos, nas espécies em que o período de gestação excede a duração de um ciclo estral ou menstrual, como ocorre nos animais domésticos, roedores e humanos (SPENCER; BAZER et al., 2004).

Binelli e Thatcher (1999), afirmaram que, durante o período crítico (i.e., dias 15 a 19 pós-estro), as células epiteliais do endométrio seguem uma programação pré-estabelecida para liberar pulsos luteolíticos da $PGF2\alpha$ a menos que o conceito envie sinais anti-luteolíticos apropriados para bloquear a produção da $PGF2\alpha$. Entretanto há algumas indicações científicas de que a programação para o bloqueio da luteólise parece ser acionada antes do período crítico. De acordo com Banu et al.

(2003) o embrião bovino já produz moléculas sinalizadoras da sua presença no útero desde o 10º dia do seu desenvolvimento.

Na década de sessenta, pesquisadores apontaram para a ocorrência da inibição da luteólise a partir da liberação de substâncias blastocísticas antes do momento da implantação embrionária (MOOR; ROWSON, 1996). Posteriormente, por ter sido isolada das células trofoblásticas, essa substância foi denominada de trofoblastina ou proteína trofoblástica (MARTAL et al., 1979). Após sua purificação, realizada na espécie ovina, e por apresentar grande semelhança estrutural com algumas classes de interferons, passou a ser chamada de interferon- τ (INF- τ) (IMAKAWA et al., 1987). Seu mecanismo de ação para o bloqueio da luteólise envolve a supressão na expressão dos receptores endometriais para a ocitocina (WATHES et al., 1998; MANN et al., 1999) e também a competição pelos sítios de ligação desses mesmos receptores, culminando com a inibição da síntese de PGF2 α (DEMMERS et al., 2001).

Para o reconhecimento materno da gestação em ruminantes é necessário que o conceito se alongue de uma forma esférica, para uma forma tubular e posteriormente filamentosa para então produzir INF- τ (SPENCER et al., 1995; ROBERTS et al., 1999; SPENCER; BAZER, 2004). O INF- τ é a principal molécula sinalizadora da presença do conceito no útero materno e é secretado pelas células mononucleares do trofoblasto, no estágio precoce de desenvolvimento embrionário (THATCHER et al., 2001). Nos bovinos observa-se que a secreção de IFN- τ pelo trofoectoderma inicia-se ao redor do sétimo dia de gestação, atingindo o pico máximo entre os dias 17 e 22 (BARTOL et al., 1985; GEISERT et al., 1988).

Em mamíferos o crescimento e desenvolvimento do conceito necessita da ação da progesterona e hormônios placentários no útero para regular a diferenciação e função endometrial, a sinalização do reconhecimento da prenhez, a receptividade do útero para a implantação do blastocisto (SPENCER; BAZER et al., 2004).

Em síntese, entre os fatores que atuam no reconhecimento materno da gestação, ressalta-se a importância dos hormônios maternos envolvidos na preparação do ambiente uterino e as moléculas liberadas pelo conceito que tem ação no endométrio. A principal molécula liberada pelo conceito com ação sobre o reconhecimento materno fetal é o IFN- τ , que será abordado na seção a seguir.

2.4 INF- τ e bloqueio da luteólise

Interferons (INF) são citocinas sintetizadas e secretadas por células somáticas das espécies mamíferas. A designação coletiva de interferons surgiu com estudos de Stewart (1979) que assim as nomeou por sua capacidade de interferir na biologia das células mamíferas induzindo um estado anti-viral contra diversos tipos de vírus.

Na espécie bovina foram identificados múltiplos subtipos de INF, entre eles, observou-se a expressão de interferon-tau (INF- τ), responsável pelo reconhecimento materno nessa espécie (ROBERTS; CROSS; LEAMAN, 1992; ROBERTS et al., 1999). Genes que codificam INF- τ foram identificados apenas em ruminantes (LEAMAN; ROBERTS, 1994). Acredita-se que os genes para INF- τ tenham evoluído de um IFN- ω ancestral há aproximadamente 36 milhões de anos (ROBERTS et al., 1999). Apesar das diferenças na seqüência de aminoácidos, os interferons apresentam estrutura tridimensional semelhante, compostas basicamente por regiões α -hélices arranjadas em uma “trouxa” compacta (ROBERTS et al., 1999). Tal característica estrutural, associada às propriedades biofísicas e atividades biológicas comuns, como estabilidade de atividade em pH ácido e reconhecimento de classes comuns de receptores de superfície celular, determinaram a designação coletiva dessas moléculas como IFN tipo 1 (MOGENSEN et al., 1999).

O INF- τ apresenta diversas atividades inerentes aos interferons como atividade anti-viral, inibição na proliferação celular e efeitos regulatórios nas células do sistema imune semelhantes ao IFN- α . Sabe-se que o INF- τ é composto por 172 aminoácidos e apresenta 75% de homologia com o IFN- ω (EALY et al., 1998). Assim como todos IFN tipo I, o INF- τ se liga às subunidades de receptor para interferons 1 e 2 (IFNAR1 e IFNAR2) (LI; ROBERTS, 1994a; LI; ROBERTS, 1994b), através dos quais ativa fatores de transcrição (ALEXENKO et al., 1997; BINELLI et al., 2001) induzindo ou inibindo a expressão de diversos genes (OTT et al., 1998; SPENCER; OTT; BAZER, 1998).

Após a purificação das proteínas secretadas por conceptos, Demmers et al. (2001) observaram que as isoformas de interferon-tau bovino (bINF- τ) apresentam peso molecular entre 22 e 24KDa e glicosilações com oligossacarídeos ligados à

extremidade amino. Posteriormente descobriu-se que a transcrição do INF- τ ocorre durante o período inicial da gestação em bovinos, ovinos e caprinos e codificam proteínas que podem possuir atividades biológicas diferentes (EALY et al., 1998; WINKELMAN et al., 1999; EALY et al., 2001). Em estudos recentes foram reportadas 12 isoformas de INF- τ isolados na espécie bovina (ALEXENKO et al., 2000). A razão para a transcrição de múltiplas isoformas de INF- τ permanece desconhecida. Martal et al. (1990) e Ealy et al. (2004) sugeriram que uma tentativa de estabelecer um mecanismo que amplifique a produção dessa proteína nesse período, ou que tais isoformas diferentes desempenhem distintas atividades como hormônios da gestação na espécie. Observou-se que o INF- τ é expresso apenas pelas células do trofoectoderma extra-embriônico (BAZER; ROBERTS, 1984; FARIN; IMAKAWA; ROBERTS 1989; GODKIN; GUILLOMOT et al., 1990). Alguns autores observaram que o INF- τ já está expresso constitutivamente no trofoectoderma no estágio de blastocisto em bovinos, mas em níveis bastante inferiores aos observados nos dias seguintes (HERNANDEZ; LEDEZMA et al., 1992; KUBISCH; LARSON; ROBERTS, 1998).

A ação do INF- τ no estabelecimento da gestação não se baseia em equilibrar a expressão dos PR no epitélio endometrial durante a prenhez (SPENCER; BAZER, 1995). Demonstrou-se que o INF- τ , atua de forma paracrina no epitélio luminal (LE) e epitélio glandular (GE) endometrial, suprimindo a transcrição gênica dos receptores de estrógeno (ER) e receptores de ocitocina (OTR) (SPENCER; BAZER, 1995; FLEMING et al., 2001), prevenindo desta forma o desenvolvimento do mecanismo luteolítico endometrial. O aumento na expressão gênica dos ER e OTR no LE e no GE entre os dias 11 e 17 pós-estro, em ovelhas cíclicas, não ocorreu em ovelhas prenhes (SPENCER; BAZER, 1995), ou em ovelhas cíclicas que receberam infusão uterina de INF- τ (SPENCER et al., 1995). Pela inibição no aumento da expressão do OTR, o INF- τ previniu a produção endometrial de pulsos luteolíticos de PGF2 α . Entretanto, o INF- τ não inibiu a produção basal de PGF2 α , o qual é maior em ovelhas prenhes do que em cíclicas. O conceito e o INF- τ , não afetam a expressão da COX-2 no epitélio endometrial de ovelhas no início da gestação (CHARPIGNY et al., 1997; KIM et al., 2003). Deste modo, a ação anti-luteolítica do INF- τ se baseia em prevenir o aumento da expressão gênica de ER, PR e OTR no

epitélio, os quais são responsivos ao estrógeno, pela inibição direta na transcrição gênica dos ERs (FLEMING et al., 2001).

Alguns autores observaram o efeito de INF- τ na inibição da síntese de PGF 2α em explantes endometriais (HELMER et al., 1987; HELMER et al., 1989) e em células endometriais epiteliais (DANET-DESNOYERS et al., 1994; GODKIN et al., 1997; XIAO et al., 1998; BINELLI et al., 2000) nas fêmeas bovinas. No entanto nessa espécie a relação entre INF- τ , ER e de OTR ainda não é clara, (KIMMINS; MACLAREN, 2001; ROBINSON et al., 2001). Inicialmente observaram-se diferenças significativas na expressão de OTR endometrial entre as fêmeas bovinas prenhes e cíclicas (FUCHS et al., 1990; JENNER; PARKINSON; LAMMING, 1991), sugerindo que o INF- τ secretado pelo concepto suprime a expressão de OTR. A observação de que o interferon-tau recombinante inibe a expressão de OTR em explantes endometriais em cultivo apóia esse conceito (HORN et al., 1998; LEUNG et al., 2001). Recentemente Robinson et al. (2001) estudaram a expressão de receptores para ocitocina, estrógeno e progesterona no endométrio bovino durante o ciclo estral ou período inicial da gestação através de hibridização *in situ* e imunohistoquímica. Não detectou-se a expressão de RNA mensageiro (RNAm) para OTR entre os dias 12 e 18 pós-estro no endométrio de fêmeas bovinas gestantes. Entretanto a presença de um concepto não teve efeito na expressão de RNAm para ER no epitélio luminal uterino, glândulas superficiais ou estroma sub-epitelial entre os dias 12 e 14 pós-estro. Contudo entre os dias 16 e 18, observou-se um aumento nas concentrações de RNAm para ER no epitélio luminal de fêmeas cíclicas, enquanto nas fêmeas gestantes notou-se um declínio, tornando-se indetectável no décimo oitavo dia. Esses resultados indicam que INF- τ não inibiu os OTR indiretamente via ER nas fêmeas bovinas. Sabe-se que a região promotora do gene para OTR contém um elemento de resposta ao interferon (ISRE) onde se ligam fatores regulatórios de interferon -1 e -2 (BATHGATE; TILMANN; IVELL, 1998), portanto supõe-se que o INF- τ possa inibir diretamente a expressão de OTR. Entretanto, Goff (2002) destaca que o INF- τ pode ter outros papéis importantes no estabelecimento da gestação, além do efeito sobre a secreção de prostaglandina.

Outros autores apontam possíveis mecanismos de ação anti-luteolítica nos bovinos nos quais o bINF- τ atua modulando a expressão de genes endometriais e

conseqüentemente a síntese de proteínas que podem bloquear a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (THATCHER et al., 1997; BINELLI et al., 2000; SCHAFER-SÖMI, 2003).

Ainda especula-se que o $\text{INF-}\tau$ possa inibir a luteólise alterando a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ luteolítica para PGE_2 que é luteotrófica (ASSELIN; FORTIER, 2000). Foi observado que o $\text{INF-}\tau$ regula negativamente a expressão das enzimas prostaglandina F_2 sintase (PGF_2S) e prostaglandina ceto-redutase (9K-PGR) prevenindo a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial (ASSELIN; FORTIER, 2000). Enquanto nas células estromais, consideradas como fonte primária de PGE_2 (KIM; FORTIER, 1995; ASSELIN; DROLET; FORTIER, 1998), o $\text{INF-}\tau$ estimula a expressão de COX-2 (XIAO et al., 1998).

Os mecanismos pelos quais o $\text{INF-}\tau$ inibe a síntese endometrial de $\text{PGF}_{2\alpha}$ ainda não são completamente esclarecidos. No entanto, é esclarecido que a inibição da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ é mediada pelo $\text{INF-}\tau$, sendo um mecanismo fundamental ao sucesso da gestação.

O insucesso da ação dos hormônios e do $\text{INF-}\tau$ sobre o bloqueio da luteólise e manutenção da gestação é responsável por grande parte da mortalidade embrionária. A importância desse fato será discutida na seção seguinte.

2.5 Mortalidade embrionária

Já em 1978, experimentos realizados por Ayalon, indicavam que as taxas de fertilização em bovinos eram usualmente altas (~95%). Comparando as taxas de fertilização com as taxas de prenhez, sugere-se que a mortalidade embrionária é responsável pela maior parte das perdas reprodutivas após a inseminação nos rebanhos bovinos (ZAVY, 1994).

Estudos em vacas de corte lactantes apresentaram taxa de fertilização média de 75%, com variação de 60 to 100% (BREUEL, et al. 1993). Em vacas de corte não lactantes, a taxa de fertilização média é 98.6%, com variação de 94 a 100%, a qual é maior que em vacas de corte lactando. Dados de dois estudos em novilhas de corte em crescimento (MAURER; CHENAULT, 1993; DUNNE et al., 2000), avaliaram

entre os 2º e o 16º dia após IA e mostraram alta taxa de fertilização, com media de 88%, variando entre 75 e 100%.

Em vacas leiteiras, as taxas de fertilização são similares entre vacas lactentes e não lactantes, com medias de 76.2%, variando entre 55.3 e 87.8%, e 78.1%, com variação entre 58.0 e 98.0% (HUMBLOT, 2001).

A mortalidade embrionária associada à falha na manutenção da gestação constitui um fator limitante que contribui para dilatar os intervalos entre partos (HANK, 1979). Reportaram-se em alguns estudos que em fêmeas bovinas a mortalidade embrionária é responsável em grande parte pelas baixas taxas de prenhez.

Para Binelli e Thatcher (1999) a maioria das perdas reprodutivas ocorreu na fase embrionária de gestação. Thatcher et al. (1994) realizaram estudos com rebanhos leiteiros de alta produção e estimaram que 35% dos embriões fertilizados não sobrevivem até o 18º dia de prenhez.

As taxas de sobrevivência do concepto diminuem gradualmente de 93% no dia 8 pós-inseminação, para 56%, 66% e 58% nos dias 12, 16 e 42, respectivamente, segundo Diskin e Sreenan (1980) que ainda relataram que as falhas de fertilização são responsáveis por 10% dos casos de fracasso reprodutivo, ao passo que as mortes embrionárias, correspondem a 30% dos referidos casos. (DISKIN; SREENAN, 1980).

Kunz et al. (2002) encontraram taxas de mortalidade entre 20% e 40% até os dias 21 e 22 de prenhez em vacas de corte. Em vacas leiteiras, a taxa de parição, após uma única inseminação artificial, está atualmente próxima ou até menor que 50% e vem decrescendo continuamente nos últimos 15 anos (HUMBLOT, 2001).

Para caracterizar a mortalidade embrionária, Humblot (2001), utilizou experimentos, baseando-se na mensuração da P₄ diariamente e a remoção de embriões em diferentes estágios após a inseminação artificial (IA), o que permitiu distinguir dois tipos de mortalidade embrionária (HUMBLOT; DALLA PORTA, 1984). A luteólise dentro de 24 dias após a IA, pode estar associada a falta de fertilização ou a mortalidade embrionária precoce (MEP). Enquanto, a manutenção do CL e retorno ao estro após 24 dias, pode estar associado a mortalidade embrionária tardia (MET), ocorrendo após o 16º dia da IA. Utilizando esses parâmetros foi observado que a MEP representava até 43.6% das IA, enquanto a MET representou 17.5% (HUMBLOT, 2001).

Santos et al. (2004) caracteriza a perda da prenhez antes do 24º dia como morte embrionária precoce, e entre os dias 24 e 42-50, como perda embrionária tardia. A perda da prenhez detectada após 50 dias da IA são caracterizadas como morte fetal.

A mortalidade embrionária pode ocorrer devido a causas infecciosas e não infecciosas. Em relação às causas infecciosas os agentes infecciosos específicos que mais comumente causam problemas de mortalidade embrionária em bovinos são o *Campylobacter fetus* subsp. *veneralis* (Campilobacteriose Genital Bovino), o *Trichomonas fetus* (Tricomoníase) além do vírus vulvovaginite infecciosa pustular (BHV-1) e o Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) (KUNZ et al., 2002). Além desses, há os agentes infecciosos inespecíficos encontrados principalmente nos casos de endometrites. Patógenos oportunistas da flora vaginal normal ou do ambiente podem invadir o útero, que é um ambiente estéril, ao contrário da vagina que abriga microrganismos. Às vezes, tais oportunidades ocorrem, sobretudo, mas não exclusivamente, durante o parto, inseminação artificial e transferência de embriões podendo levar á endometrite crônica ou sub aguda, afetando negativamente a fertilidade (LEBLANC et al., 2002).

A mortalidade embrionária de origem não infecciosa, para Christianson (1992), reputa em 70% da mortalidade embrionária total. O estresse térmico foi responsabilizado por mortalidade embrionária de até 42,7% (SILKE et al., 2002). A influência do estado nutricional da vaca para López-Gatius et al. (2002) e Silke et al. (2002) representaram a causa de perdas significativas de prenhez quando houve diminuição do escore de condição corporal.

Humblot et al (2001) destacaram que a freqüência da MEP e MET aumentou com o número de partos. Esses autores associaram um decréscimo na fertilidade em vacas com alto valor genético para produção de leite, com aumento na MEP. Foi observada alta variabilidade na taxa de prenhez entre rebanhos (8,2 a 56,9%). Em geral, altas taxas de prenhez foram associadas a baixas taxas de MEP, enquanto baixas taxas de prenhez foram justificadas por altas taxas de MEP. Na maioria dos casos, a taxa de MET foi de aproximadamente 15%.

O estresse calórico parece ter um grande impacto entre os vários fatores que afetam a taxa de fertilização nos rebanhos bovinos (SARTORI et al., 2002).

O pH e a concentração iônica no ambiente uterino durante a fase luteal possuem grande efeito sobre a fertilidade. O aumento nas concentrações de

nitrogênio uréico plasmático em animais consumindo dietas com alto teor protéico altera o pH uterino, podendo reduzir a fertilidade, ao interferir na concentração de progesterona e no ambiente uterino, criando assim condições sub-ótimas para o desenvolvimento do embrião (BUTLER, 2001).

Portanto, esta caracterizado que em condições normais os rebanhos possuem alta taxa de fertilidade, porém uma baixa taxa de prenhez, o que caracteriza a mortalidade embrionária como um grande entrave para o sucesso reprodutivo.

Em suma, uma vez que a taxa de mortalidade embrionária influencia negativamente a taxa de prenhez, tal mortalidade causa prejuízos econômicos na agropecuária mundial. Assim, é de suma importância que se conheçam profundamente os mecanismos que controlam o reconhecimento materno da gestação, e os fatores predisponentes à mortalidade embrionária precoce. Para isso faz-se necessário o profundo conhecimento do ambiente uterino nos bovinos durante o período crítico.

2.6 Caracterização do ambiente uterino de bovinos

Nos ruminantes o contato entre a circulação materna com a do conceito ocorre apenas quando a implantação esta estabelecida, por volta do 42º dia da gestação. Durante todo o período que antecede a implantação o conceito utiliza-se do ambiente uterino para sua nutrição e comunicação com a vaca. Portanto para o entendimento desse processo e a determinação de sua falhas é necessário que se conheça esse ambiente.

O útero de todos os mamíferos é composto por um epitélio endometrial que sintetiza, secreta ou transporta um mescla complexa de íons, carboidratos, aminoácidos, enzimas, fatores de crescimento, hormônios, proteínas transportadoras e outras substâncias. Este composto é chamado de histotrofo (BAZER, 1975).

O bom desenvolvimento do embrião no início da prenhez depende do ambiente uterino. No início da prenhez a sinalização local do conceito modifica o

ambiente uterino e induz a secreção de proteínas específicas pelo epitélio uterino (MCCRACKEN, 1984). Estudos sobre as interações materno-fetais no início da gestação são de grande importância. Moléculas de origem endometrial ou do conceito são liberadas neste ambiente e interagem paracrinamente com ambos os tecidos.

Durante o período que antecede a implantação, a nutrição do conceito depende das secreções uterinas. As células epiteliais do lúmen uterino possuem grande atividade secretora, enquanto o trofoblasto exibe uma intensa atividade pinocitótica, a qual aumenta com o desenvolvimento do conceito (GUILLMOT, 1995). Portanto, considera-se que os fatores que suportam o crescimento do conceito durante a pré e peri-implantação, sejam obtidos primariamente do histotrofo uterino (SPENCER et al., 2006).

A comunicação entre o ovário e o útero é essencial para a reprodução em bovinos. A ação dos esteróides ovarianos causam mudanças cíclicas em inúmeras respostas uterinas como no fluxo sanguíneo (FORD et al., 1979), na histologia e citologia endometrial (PRIEDKALNS, 1976; MARINOV; LOVELL, 1968) e no perfil protéico do fluido uterino (ROBERTS; PARKER, 1976). Essas alterações ocorrem devido ao requerimento biológico para estabelecer um ambiente intra-uterino capaz de sustentar o conceito bovino (SREENAN, 1978).

2.7 Métodos de estudo para caracterização protéica do ambiente uterino

Com o objetivo de se conhecer o ambiente uterino durante o processo de reconhecimento materno da gestação é necessário caracterizar e identificar as moléculas presentes nesse meio. A caracterização do ambiente uterino e a determinação do perfil das proteínas que o compõe são geralmente alcançadas pela análise do fluído uterino, obtido por técnicas *in vitro*, *in vivo* ou *post-mortem*.

Alavi-Shoushtari, Asri-Rezai e Abshenas (2006) analisaram as proteínas contidas no lúmen de úteros obtidos *post-mortem* em diferentes dias do ciclo estral através da técnica de curetagem. Para a determinação da fase do ciclo estral foram examinadas estruturas presentes no ovário e a tonicidade do útero. As proteínas

contidas nos fluidos uterinos foram analisados pela técnica de eletroforese em géis de agarose.

Freire (2006) e Lima (2006), com o intuito de monitorar as mudanças na composição do ambiente uterino de forma continua durante o período crítico em animais cíclicos e prenhes, posicionaram cirurgicamente um cateter no lúmen uterino de animais experimentais, exteriorizaram a extremidade desse cateter e coletaram amostras durante o período crítico. Porém o resultado não foi satisfatório, pois os procedimentos da técnica e a presença dos cateteres no lúmen uterino levaram ao insucesso na manutenção da gestação.

Niemeyer et al. (2007) utilizando eletroforese unidimensional analisaram lavados uterinos obtidos por sonda de folley nos dias 14, 16 ou 18 pós-estro de vacas ciclando ou prenhes e também lavados obtidos *post-mortem* 18 dias pós-estro. Entretanto, não foi possível utilizando essa técnica verificar diferenças significativas nos perfis protéicos das amostras.

Novas abordagens para a obtenção de fluidos uterinos *in vivo*, que preservem o funcionamento fisiológico do órgão são necessárias e não estão disponíveis. Após a obtenção das amostras é extremamente importante definir o processo e a técnica de análise proteômica a ser utilizada.

2.7.1 Técnicas para análise da composição protéica do ambiente uterino

Após a recuperação do conteúdo presente no ambiente uterino, são necessárias técnicas específicas de análise proteômica para separar e identificar as proteínas ali presentes.

O conjunto de proteínas presentes em um determinado meio é chamado de proteoma. O termo proteoma é oriundo da expressão Proteoma = PROTEínas expressas pelo genOMA.

Existem muitas definições sobre o termo proteômica. Yates (2001) definiu proteômica como a ciência de caracterizar e analisar as proteínas, as interações protéicas e as modificações protéicas de um organismo.

A proteômica estrutural se refere ao desenvolvimento e aplicação de meios para definir a estrutura funcional primária, secundária e terciária das proteínas. Entretanto a proteômica funcional se refere ao desenvolvimento e aplicação de experimentos para definir a função das proteínas.

Aebersold (2003) definiu a proteômica como a capacidade de sistematicamente identificar todas as proteínas expressas em uma célula, tecido ou meio, assim como determinar as diferentes propriedades de cada proteína como, por exemplo, a abundância, as modificações no estado, ligações com outras proteínas e outras. Outra definição apresenta como o estudo da expressão protéica das células, tecidos ou organismos, e a capacidade de estudar os processos celulares a nível molecular.

A proteômica tem contribuído grandemente para o entendimento da função dos genes, na era pós-genoma (LIU et al., 2006). Entretanto, a análise proteômica é tecnicamente desafiante, independente da técnica utilizada. Essa dificuldade é devida ao grande número de diferentes proteínas expressas em um determinado período, em determinadas condições biológicas. Além disso, os estudos do proteoma, mostram que a maioria das proteínas identificadas são proteínas comuns a todas as células e estão presentes em números de 10^5 a 10^6 cópias por célula, enquanto proteínas como os receptores, estão presentes em concentrações muito menores, e normalmente não são detectadas.

Consequentemente são necessários métodos aperfeiçoados para identificação de proteínas de baixa abundância, como os métodos de detecção mais sensíveis e métodos quantitativos (GORG et al., 2004).

A separação de um grande número de proteínas pode ser obtida utilizando a 2D-EF, uma técnica considerada essencial para os estudos do proteoma.

2.7.2 Eletroforese Bidimensional

A 2D-EF foi inicialmente introduzida por O'Farrel e Klose em 1975 e é atualmente uma técnica que pode ser aplicada rotineiramente para quantificação do perfil de expressão de grandes grupos de proteínas em células, tecidos e meios.

A técnica de 2D-EF permite a separação de complexos protéicos na primeira dimensão com a focalização isoeletrica (IEF) a partir do ponto isoeletrico (PI), e na segunda dimensão com gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) ocorre a separação pelo peso molecular (PMR). Dependendo do tamanho do gel e do gradiente de pH utilizado, a 2D-EF pode determinar mais de 5000 proteínas simultaneamente. As proteínas são identificadas no gel através da visualização dos *spots*, que são as manchas formadas pelas proteínas em seu respectivo ponto isoeletrico e peso molecular. A intensidade do *spot* determina a concentração da proteína presente na amostra, podendo ser detectados spots com concentrações mínimas de 1ng de proteína. Uma das maiores virtudes da técnica é a capacidade de estudar as proteínas que passaram por algum tipo de modificação pós-tradução, como a fosforilação, glicosilação ou proteólise limitada, as quais podem ser prontamente localizadas nos géis uma vez que aparecem como spots distintos. Além disso, a 2D-EF não apenas fornece informações sobre as alterações nas proteínas e no seu nível de expressão, mas também permite o isolamento das proteínas para uma posterior determinação da sua composição de aminoácidos (GORG et al., 2004).

Aebersold (2003) mostrou que com a associação da 2D-EF à espectrometria de massa, detectaram-se as proteínas mais abundantes de um grupo de células. Apesar das limitações, ainda é a técnica de multi-separação mais utilizada para o estudo do proteoma de células e tecidos. Ao mesmo tempo, é um método confiável para comparação de perfis protéicos de diferentes meios, estados ou laboratórios. Após a digitalização e processamento dos géis, é possível através de programas de computação específicos medir alterações na expressão pela comparação entre a densidade óptica dos *spots*.

A 2D-EF possui utilização prática em diversas áreas de pesquisas onde busca-se conhecer o perfil protéico das amostras.

Ueno et al. (2000) utilizou a 2D-EF para analisar as proteínas plasmáticas em pacientes com o mal de Alzheimer. Simpson et al. (2000) realizou análise proteômica das células de carcinoma de cólon de útero em humanos, utilizando 2D-EF desenvolvendo um banco de dados das proteínas. Seow et al. (2000) utilizaram 2D-EF para separar as proteínas das células de carcinoma hepatocelular em humanos. Após a separação e coloração, as proteínas foram caracterizadas por

espectrometria de massa, e identificadas pela predição da sequência do DNA ou banco de dados de proteínas (YATES, 1998).

Roncolleta (2003) utilizou a 2D-EF para determinar o perfil protéico do plasma seminal de bovinos e relacioná-lo com a fertilidade de cada animal, identificando proteínas associadas à fertilidade nos animais.

Os principais passos para realizar a 2D-EF são (1) preparação da amostra e solubilização das proteínas; (2) separação das proteínas pela 2D-EF; (3) detecção e quantificação das proteínas; (4) identificação e caracterização das proteínas; (5) formação de um banco de dados das proteínas (GORG et al., 2004).

Durante a preparação das amostras, para tirar proveito da alta resolução da 2D-EF, as proteínas da amostra devem ser desnaturadas, desagregadas, reduzidas e solubilizadas. Esses processos devem alcançar um rompimento completo das interações inter-moleculares para assegurar que cada spot represente um polipeptídeo individual (GORG et al., 2004). Recomendações gerais sobre o preparo de amostras foram descritas por Dunn (1993) e Dunn e Gorg (2001).

A separação das proteínas pela 2D-EF só é possível devido à característica das proteínas de possuírem diferentes cargas iônicas. Essa particularidade é explorada utilizando-se da IEF para realizar a primeira dimensão e pela SDS-PAGE na segunda dimensão.

A IEF é um método eletroforético que separa as proteínas de acordo com o seu PI. As proteínas são moléculas anfóteras, isso é, elas podem ter carga positiva, negativa ou neutra, dependendo do pH à sua volta. O PI é o pH específico no qual a carga da proteína é zero. As proteínas são carregadas positivamente quando o pH está abaixo do seu PI, e são carregadas negativamente quando o pH está acima do seu PI (GORG et al., 2004).

A presença de um gradiente de pH é essencial para a técnica de IEF, pois, sob a influência de um campo elétrico, cada proteína irá se mover no gradiente para onde a sua carga é zero. As proteínas com carga positiva irão se mover em direção ao cátodo, enquanto as proteínas com carga negativa irão em direção ao ânodo (GORG et al., 2004).

Muitas das dificuldades em realizar a IEF foram superadas com o desenvolvimento do gradiente de pH imobilizado em fitas denominadas IPG, disponíveis comercialmente. O protocolo original da 2D-EF com o uso das IPG foi

descrito por Gorg et al. (1988), e atualizado por Gorg et al. (2000) e Gorg et al. (2004).

As fitas de IPG podem ser lineares ou não lineares com alta (3-12), média (4-7) ou reduzida (4.9-5.3) variação de pH (GORG et al., 2004).

Após a focalização isoeletrica, a fita de IPG é posicionada sobre um gel de acrilamida para que as proteínas sejam separadas em uma segunda dimensão pela técnica SDS-PAGE.

A SDS-PAGE é um método eletroforético para separar as proteínas baseado no seu PMR. Essa técnica é realizada em gel de poliacrilamida contendo dodecil-sulfato de sódio (SDS). O gel de acrilamida é uma matriz porosa, formada após a polimerização da acrilamida que separa as proteínas de acordo com o seu PMR. O SDS é um detergente aniônico que, devido à sua composição química, se liga às proteínas tornando-as carregadas negativamente. A quantidade de cargas negativas é constante por unidade de massa da proteína. Dessa forma, a velocidade de migração das proteínas no gel depende exclusivamente do seu PMR (GORG et al., 2004).

Após completada a 2D-EF, as proteínas separadas devem ser visualizadas. Isso é possível através de métodos de coloração, que podem ser específicos ou universais. Independente do método de coloração, eles devem apresentar propriedades importantes, como ter alta sensibilidade, detecção de proteínas de baixa abundância, reprodutibilidade e ser compatível com procedimentos de sequenciamento pós-eletroforese (como a espectrometria de massa) (GORG et al., 2004).

Os métodos universais de coloração dos géis de 2D-EF incluem os corantes aniônicos (i.e. Coomassie Blue), corantes negativos com cátions metálicos (i.e. Imidazole de zinco) , o corante de prata, corantes ou marcadores fluorescentes e isótopos radioativos (GORG et al., 2004). Dentre eles, o Coomassie Blue é o método de detecção de proteínas mais difundido, por ser acessível, fácil de usar e compatível com os processos subsequentes de identificação protéica. A principal limitação do uso do Coomassie Blue é sua baixa sensibilidade, tendo sua faixa de detecção entre 200 e 500ng por spot (GORG et al., 2004).

A avaliação visual e comparação manual de géis de 2D-EF de alta resolução pode não ser possível. Em estudos em larga escala com amostras contendo milhares de proteínas, pode ser quase impossível detectar a aparição ou o

desaparecimento de alguma proteína. Dessa forma, torna-se necessária a captura e análise das imagens dos géis de 2D-EF por programas computadorizados específicos. A utilização de tal ferramenta é fundamental para detectar diferenças e obter o máximo de informações sobre os géis (GORG et al., 2004).

Após digitalizadas, as imagens passam por uma análise seqüencial que objetiva identificar e quantificar as proteínas presentes no gel. Para isso os procedimentos incluem a determinação da área individual de cada proteína; normalização do volume; determinação do ponto isoelétrico e peso molecular das proteínas; sobreposição entre géis que se queira comparar, determinando-se proteínas específicas como pontos de referência entre os géis; investigar a coincidência entre as proteínas dos géis (matching); interpretação e análise dos dados e criação de banco de dados das proteínas presentes no gel (GORG et al., 2004).

Para a criação do banco de dados sobre o proteoma de uma determinada amostra é necessária a identificação das proteínas por sequenciamento. O mapeamento dos peptídeos por espectrometria de massa (MS) é o primeiro método para triagem de proteínas, utilizado em muitos laboratórios, devida a sua inerente simplicidade, precisão na determinação da massa e sensibilidade. A 2D-EF é utilizada para primeiramente analisar, selecionar e purificar as proteínas, para então, a MS identificar rapidamente as proteínas isoladas na 2D-EF (STENSBALLE; JENSEN, 2001).

A identificação das proteínas pela MS é obtida através da digestão enzimática do *spot* que fornece a massa do peptídeo. A partir desse ponto é feita uma busca no banco de dados do proteoma da espécie, ou de outras espécies para então determinar a identidade da proteína (ISSAQ, 2001).

2.8 Proteínas presentes no ambiente uterino durante o ciclo estral e a prenhez em bovinos

O ambiente uterino é dinâmico e apresenta diferenças entre as fases do ciclo estral (BUTLER, 2000). O ambiente uterino dos bovinos é composto por moléculas

que constituem o fluido presente no lúmen uterino dos animais cíclicos ou prenhes. As moléculas ali presentes são originadas pela secreção das glândulas endometriais, reguladas pelos hormônios do ciclo estral ou pela presença do embrião ou difundidas a partir do plasma sanguíneo.

Entre as macromoléculas presentes no ambiente uterino, as proteínas possuem papel de destaque por exercerem funções importantes na preparação do ambiente uterino para o estabelecimento da prenhez ou para o início de um novo ciclo. As proteínas presentes no ambiente uterino exercem papéis específicos no processo de reconhecimento materno-embriônico, entre eles o controle do sistema imune uterino, a nutrição e o processo de implantação do concepto. A identificação dessas proteínas aumentará o conhecimento dos mecanismos que controlam a reprodução dos bovinos.

O embrião também é responsável pela liberação de moléculas no ambiente uterino. O INF- τ é a principal proteína liberada pelo concepto no ambiente uterino, sua liberação e mecanismo de ação foram apresentados nessa revisão anteriormente. O bom desenvolvimento do embrião no início da prenhez depende do ambiente uterino. A sinalização local do blastocisto modifica ainda mais o ambiente uterino e induz a secreção de proteínas específicas pelo epitélio uterino (SPENCER et al., 2006).

Godkin et al. (1988) coletou conceptos bovinos no período de peri e pós-adesão (dias 17-24 e 26-38, respectivamente) e após cultivo em meio com presença de L-[3H] leucina caracterizaram a síntese de proteínas *in vitro*. O perfil de síntese protéica foi analisado por 2D-EF seguido por fluorografia. Foram observados grupos de proteínas ácidas de baixo peso molecular (LMWAP) que apresentaram diferenças no número e na concentração relativa de proteínas. No grupo "A" as proteínas foram sintetizadas em maior quantidade entre os dias 17 e 22 da prenhez e permaneceram até o dia 38. Foram observadas proteínas com PI entre 5,8 e 6,6 e PMR entre 22 e 26 KDa. Um segundo grupo, "A₁", foi formado por duas proteínas com o mesmo peso molecular que o grupo "A", porém eram mais ácidas. Apenas uma proteína foi selecionada no grupo "B", e apresentava um PI mais ácido (5,0) e PMR menor que os grupos "A₁" e "A". A produção das proteínas dos grupos "A₁" e "B" diminuiu a níveis indetectáveis após o dia 22. As proteínas do grupo "C" se tornaram visíveis a partir dos dias 21 e 22 da prenhez e sua produção aumentou em relação as proteínas do grupo "A" entre os dias 24 e 38. Entre os dias 24 e 29, o grupo era

formado por três proteínas com PMR entre 14 e 18KDa. Uma proteína ácida (PI < 4,5) com alto peso molecular (>200kD) classificada no grupo “D” foi liberada no meio de cultivo entre os dias 17 e 29.

Alavi-Shoushtari et al. (2006) curetou, *post-mortem*, o lúmen uterino de vacas em diferentes fases do ciclo estral. Utilizando eletroforese as proteínas da amostra foram separadas em albumina e globulinas α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , γ_1 e γ_2 . A concentração total de proteína e o perfil protéico do fluido uterino foram avaliados e comparados com o do soro sanguíneo em cada fase do ciclo estral. O valor total de proteína e a quantidade das globulinas α_1 , α_2 , β_1 e β_2 no útero foi maior do que no soro, enquanto os valores da albumina e das globulinas γ_1 e γ_2 foram maiores no soro do que no fluido uterino em todas as fases do ciclo estral, sugerindo que a albumina não é facilmente transferida ao lúmen uterino.

Nas análises realizadas por Alavi-Shoushtari et al., (2006), foi observado que durante o pró-estro, a concentração de β_2 -globulina foi maior do que nas outras fases do ciclo. A concentração de α_1 -globulina foram maiores durante o pró-estro e estro em relação ao meta-estro e diestro. Possivelmente, essa diferença reflita numa preparação do útero para receber os espermatozóides nessa fase. Durante o meta-estro, o valor da β_1 -globulina foi o menor em relação às outras fases do ciclo estral. No diestro a γ_1 -globulina esteve menor em relação às outras fases do ciclo estral. Dos valores obtidos para γ_2 -globulina, os valores do estro foram menores que nas outras fases (ALAVI-SHOUSHTARI et al., 2006).

O estrógeno influenciou o aumento da concentração de α_1 -globulina no soro, mecanismo o qual foi explicado por Hansen et al. (1986). Deve também ser considerando o fato de que a α_1 -globulina é uma proteína presente na fase aguda da inflamação e o útero possui um mecanismo de defesa mais ativo durante a fase folicular do ciclo estral, do que durante a fase luteal (EVANS et al., 1986; LYNETTE; BANDURANT, 2001). Um aumento nas imunoglobulinas no útero durante o pro-estro e uma diminuição no estro foi observado por Lynette e Bandurant, (2001).

Considerando a γ_1 e γ_2 -globulina como as principais imunoglobulinas no organismo e seu papel na resposta imune, pode-se concluir que o seu baixo valor durante o diestro pode favorecer o desenvolvimento embrionário, reduzindo a resposta imune local e prevenindo uma possível rejeição do conceito (ALAVI-SHOUSHTARI et al., 2006). As imunoglobulinas do fluido uterino continham γ_1 e γ_2 -globulina em todas as fases do ciclo menores que no soro, o que reflete um menor

taxa de síntese ou transporte dessas proteínas para o útero. Entretanto, o aumento no pró-estro, pode ser atribuído a um aumento no fluxo sanguíneo e na permeabilidade capilar que ocorre nessa fase (WINGFIELD; RICKEITS, 1982). A diferença entre as proteínas do soro e do fluido uterino pode ser devida ao transporte, síntese e secreção seletiva dessas proteínas para o útero (BEIER, 1978).

Alavi-Shoushtari et al. (2007) realizaram um novo estudo para investigar o peso molecular do conteúdo protéico uterino, como primeiro passo para a sua identificação e variação durante o ciclo estral, como parte do ajuste uterino para preparar o ambiente uterino para os eventos fisiológicos dos bovinos. Usando a mesma metodologia do seu trabalho anterior (ALAVI-SHOUSHTARI et al., 2006) amostras de cada fase foram selecionadas aleatoriamente e submetidos a análise por eletroforese unidimensional. Foram encontrados pesos moleculares de <14.4, 20, 30, 38, 40, 46, 67, 75, 85, 90, 160, 200, 210, 270 e 330KDa. Proteínas com PMR menor que 14.4 e 46KDa foram observados apenas durante o metaestro. Proteínas com PMR de 20, 40 e 200KDa foram encontradas apenas no diestro. Proteínas de PMR de 30KDa no metaestro e diestro e proteínas de 38KDa foram observadas em valores consideravelmente altos durante o pró-estro e estro. Proteínas de 67,75 e 330KDa foram observadas em todas as fases do ciclo estral, porém apresentando diferentes concentrações. As maiores concentrações foram encontradas no diestro, pró-estro e metaestro, respectivamente. Proteínas com PMR de 85KDa foram observadas em todas as fases, menos no diestro. Proteínas de 90KDa foram observados durante o estro e diestro. Proteínas de 160KDa foram observadas no pró-estro e metaestro. Finalmente, proteínas de 210 e 270KDa foram observadas apenas no estro. Conclui-se que o perfil protéico do lúmen uterino nos bovinos altera-se durante o ciclo estral, tanto em qualidade quanto em quantidade, o qual pode ser parte da adaptação uterina para os eventos fisiológicos do ciclo estral ou da gestação.

Nos ruminantes, a continua exposição do útero à P₄ induz as glândulas uterinas a expressar proteínas e as secretá-las no lúmen uterino. As proteínas melhor caracterizadas, neste período, são as proteínas do leite uterino (UTM). A UTM são membros da família das inibidoras da protease no soro (PELTIER; HANSEN, 2001), são excelentes marcadores da capacidade secretora do endométrio durante a prenhez em ovinos (SPENCER et al., 1998) e possuem grande atividade inibitória linfocitária (SKOPETS; HANSEN, 1993). Foram

identificadas entre elas duas proteínas, com ponto isoelétrico básico e peso molecular de 55 e 57KDa respectivamente, a útero serpina (US) e a osteopontina (OPN) (SKOPETS; HANSEN, 1993). A US esta relacionada a inibição na proliferação linfocitária. A OPN se liga ao conceito, promovendo adesão, expansão e migração celular, estimulando mudanças na morfologia das membranas extra-embrionárias do conceito e induzindo a adesão entre o LE e o trofoderma, essencial para a implantação e placentação (JOHNSON et al., 2003)

O fator de prenhez inicial aparece precocemente e é altamente específico da resposta maternal a gestação em todas as espécies mamíferas examinadas, incluindo os bovinos, humanos, ratos, suínos, coelhos e ovinos (GANDOLFI et al., 1992). Bioquimicamente é uma glicoproteína de 50KDa produzida pelo conceito bovino a partir do dia 7 após a fecundação, e que se mantém até a primeira metade da gestação. É responsável pela diminuição na resposta linfocitária e regulação da resposta imune maternal durante a prenhez (GANDOLFI et al., 1992).

Weise et al. (1993) avaliou as alterações na secreção de proteínas por explantes endometriais de caprinos prenhes e cíclicos durante o período de reconhecimento materno. Utilizando 2D-EF foi observado entre os dias 18 e 21 da gestação um aumento no número e concentração de proteínas com peso molecular entre 18 e 22KDa e ponto isoelétrico entre 6,2 e 7,2, em comparação a secreção de explantes de animais no dia 18 do ciclo estral. Outras 3 proteínas foram encontradas apenas na cultura de explantes de animais prenhes no dia 18 pós-estro. Uma proteína básica (PI > 7,5) de 14KDa, outra com PI de 6,9 e outra de PI 6,0 e 15KDa. Essas proteínas reduziram sua intensidade no dia 30 da gestação, caracterizando seu envolvimento com o processo de reconhecimento materno-embrionário nos caprinos.

Os fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) representam uma grande família de moduladores autócrinos e parácrinos. Está esclarecido que a ação dos FGFs não é restrita apenas ao crescimento celular, mas também influencia outros eventos celulares, incluindo a migração, diferenciação e sobrevivência celular, angiogênese e tumorigênese. Após a secreção os FGFs se associam à heparina para estabilizarem sua estrutura e se proteger da proteólise. Essa associação também limita a difusão dos FGFs e restringe a sua ação nas proximidades de seu local de produção. Em bovinos, o RNA mensageiro para os FGFs estão presentes no endométrio durante todo o ciclo estral e no início da gestação. Proteínas

imunoreativas de FGFs também podem ser detectadas no lúmen uterino de vacas cíclicas e prenhes no dia 17 pós-estro. Recentemente, os FGFs demonstraram regular a produção de INF- τ em bovinos. A sua produção aumenta drasticamente entre os dias 14 e 15 da gestação em bovinos, coincidentemente com o início do alongamento do concepto e a rápida proliferação do trofoectoderma (OCÓN-GROVE et al., 2007).

O endométrio bovino de animais cíclicos e prenhes possui células supressoras. Essas células são capazes de liberar fator de supressão com ação direta sobre a resposta linfocitária e determina a atividade do fator de crescimento transformante- β (TGF- β). O fator de supressão está associado ao TGF- β , tendo sido encontrada uma macromolécula carreadora de > 40KDa entre as proteínas do lúmen uterino (SHIPPI; SEGERSON, 1998).

Resultados apresentados por Thomas et al. (1992) confirmaram que o lúmen uterino de vacas cíclicas e prenhes contém proteína ligante de retinol (RBP). Foram encontradas diversas isoformas, entre elas a mais abundante apresentava 22KDa (RBP22) sendo sintetizada em parte pelo endométrio e em parte oriunda do soro sanguíneo. Foram encontradas proteínas entre 25 e 30KDa (RBP25~30) e 55 e 65KDa (RBP55~65), sendo que possivelmente essa última isoforma seja a RBP22 ligada a albumina ou outra proteína carreadora.

O lúmen uterino é um ambiente complexo, composto por moléculas com ações específicas de acordo com a fase do ciclo estral ou o estado fisiológico do animal. A composição do ambiente uterino é alterada pela presença do embrião/concepto e pelas alterações hormonais que ocorrem durante o processo de estabelecimento da gestação. Foram citadas nessa revisão algumas poucas proteínas do ambiente uterino que já foram caracterizadas, assim como a função que desempenham. Entretanto a complexidade do ambiente uterino ainda requer muitos estudos visando a identificação e caracterização das funções dessas proteínas, assim como sua participação na interação materno-embionária.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido na cidade de Pirassununga, Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, nas dependências do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA) do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP e no Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados previamente pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

3.1 Manejo reprodutivo e delineamento experimental

Foram utilizadas fêmeas bovinas azebuadas ciclando (no mínimo meio sangue zebu), não lactantes cedidas pela Prefeitura do Campus administrativo de Pirassununga da Universidade de São Paulo. Os animais foram examinados quanto à sanidade reprodutiva ultrasonograficamente (aparelho ALOKA modelo SSD -500 equipado com transdutor linear de 7,5 MHz) para detecção de possíveis anormalidades anatômicas ou patologias que pudessem acometer os órgãos e estruturas reprodutivas. Os animais foram mantidos em sistema intensivo de piquetes (*Brachiaria decumbens*) recebendo suplementação de 25 Kg vaca/dia de cana de açúcar (matéria original), sal mineral e água *ad libitum*.

Para o experimento foram utilizadas 48 fêmeas bovinas, as quais tiveram as ovulações sincronizadas pela administração intramuscular de 2mg de benzoato de estradiol (Centro Paulista de Desenvolvimento Farmacotécnico) concomitante à aplicação de implante auricular contendo 3mg de norgestomet (CRESTAR®-Intervet) após oito dias foram administrados 530µg de Cloprostenol sódico (Cloprostenol Sódico® 265µg /mL Centro Paulista de Desenvolvimento Farmacotécnico) e foi retirado o implante auricular. No dia 9 os animais receberam 1mg de benzoato de estradiol e, após 30 horas, 24 animais foram

aleatoriamente selecionados e inseminados. Para a inseminação artificial foi utilizado sêmen descongelado de uma mesma partida, de um touro da raça Simental, com características seminais avaliadas previamente e considerado apto segundo a ASBIA, 2006 (motilidade 75%, vigor 02, concentração $287,5 \times 10^6$ espermatozóides/cm³ e com 20% de alterações morfológicas totais). O sêmen foi cedido pelo Laboratório de Biotecnologias do Sêmen e Andrologia (Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal da FMVZ/USP – Campus Pirassununga). A dose inseminante utilizada foi de 40×10^6 espermatozóides móveis pós-descongelamento. Os animais inseminados foram diagnosticados prenhes pela visualização do conceito ou de seus fragmentos no lavado (Figura 1). Os animais foram alocados aleatoriamente em grupos para receberem lavagens *in vivo* por sonda de folley (12 inseminadas e 7 não inseminadas) ou para receberem lavagens *post-mortem* (12 inseminadas e 5 não inseminadas) no dia 18 após o estro (Figura 1B).

Figura 1 – Fotografia dos conceitos encontrados nos lavados uterinos obtidos por sonda de folley (A) e *post-mortem* (B)

Figura 2 – Representação esquemática dos procedimentos experimentais (ver detalhes no texto)

3.1.2 Obtenção dos lavados uterinos *in vivo* e *Post-mortem*

Para a obtenção dos lavados uterinos *in vivo*, os animais receberam 2ml de anestésico epidural (Lidocaína 2%, Centro Paulista de Desenvolvimento Farmacotécnico) e no momento da lavagem a região perianal-vulvar foi higienizada com água e sabão. A seguir, os animais tiveram seus úteros lavados

por meio de uma sonda de folley siliconizada nº 24 com 8mm de diâmetro (Rush®) alojada, via transcervical, no corpo uterino. Utilizou-se um sistema de mangueira Y, para infundir um volume total de 250ml de solução de Ringer a 37°C (Figura 3). Porções de 50ml da solução de Ringer foram infundidas e recuperadas por gravidade em frascos de vidro acondicionados em gelo (Figura 4).

Figura 3 - Fotografia do procedimento de infusão de ringer pelo procedimento de lavagem uterina por sonda de folley

Figura 4 - Fotografia do procedimento de recuperação do lavado uterino por sonda de folley

Uma vez recuperados, os lavados foram mantidos em gelo até o transporte para o laboratório, onde foram centrifugados a 3000 x g por 30 minutos a 4°C para a remoção de debris celulares, aliquotados e armazenados a -20°C.

Amostras de sangue foram colhidas de todos os animais nos respectivos dias dos lavados por venopunção da veia sacral mediana e depositados em tubos de vidro 16 x 100 contendo 350µl de solução citrato de sódio a 30%. O volume obtido foi mantido em caixa térmica contendo gelo até o momento da centrifugação, realizada a 3000 x g por 30 minutos a 4 °C para hemossedimentação e obtenção do plasma que foi acondicionado em tubo plástico de 7ml identificado e armazenado em freezer a -20°C até a realização do radioimunoensaio para dosagem de progesterona plasmática.

Os animais selecionados para a realização dos lavados *post-mortem* foram abatidos por sangria da veia jugular, após insensibilização com pistola pneumática no matadouro-escola do Campus Administrativo de Pirassununga da Universidade de São Paulo. Após abertura da cavidade abdominal, coletou-se o aparelho reprodutivo, dos ovários à cérvix uterina, que foi mantida ocluída por uma pinça. O material colhido foi acondicionado em saco plástico identificado e transportado rapidamente ao laboratório acondicionado em isopor com gelo (Figura 5). As estruturas ovarianas foram observadas para identificação dos cornos uterinos ipso e contra-lateral ao CL. O útero foi dissecado, removendo-se os ovários, tubas uterinas, ligamentos e então levado ao fluxo laminar (Figura 6).

Figura 5 – Fotografia do aparelho reprodutivo coletado após o abate dos animais

Figura 6 – Útero dissecado e identificado para coleta de lavado uterino *post-mortem*

Em aparelho de fluxo laminar desinfetado com álcool 70%, foram infundidos pela extremidade cranial do corno uterino contra-lateral ao corpo lúteo 20 mL de Ringer a 37°C com o uso de uma seringa de 20 mL e agulha 40x12mm (Figura 7). O útero foi gentilmente massageado no sentido de lavagem do corno contra-lateral para o ipso-lateral ao CL (Figura 8). A extremidade cranial do corno uterino ipsolateral ao CL foi segura com duas pinças e teve sua extremidade cortada para facilitar a colheita do lavado uterino e do conceito, no caso dos animais prenhes (Figura 9). O lavado foi colhido em recipiente estéril e após a remoção do conceito, quando este estava presente, foi centrifugado a 12000 x g durante 20 minutos para remoção de debris e o sobrenadante armazenado a -20°C em alíquotas de 1mL em microtubos esterilizados e identificados.

Figura 7 - Fotografia da infusão de ringer no corno uterino contra-lateral ao CL

Figura 8 – Fotografia do processo de massageamento do útero no sentido de lavagem do corno contra-lateral para o ipso-lateral ao CL

Figura 9 – Fotografia da colheita do lavado uterino e conceito (no caso de animais prenhes)

3.1.3 Preparação das amostras para Eletroforese

Para cada tipo de lavado, no mínimo quatro lavados de vacas prenhes e quatro de vacas não inseminadas foram processados para análises posteriores.

Para a remoção de sais e troca do meio diluente, os quais poderiam alterar as análises posteriores pela eletroforese, e para concentrar as proteínas presentes nos lavados, estes foram submetidos à ultra-filtração, utilizando-se

Centricon Plus-20 (Millipore Corporation - EUA) segundo as recomendações do fabricante para a retenção de moléculas com peso molecular superior a 10kDa. A seguir, as amostras foram ressuspensas em água ultrapura (Milli-Q) e novamente ultra-filtradas. A concentração protéica do material ultra-filtrado (fração enriquecida em macromoléculas de peso molecular maior que 10 kDa) foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando-se placas de 96 cavidades (n° 353911 Falcon®- NJ, EUA) e reagente para Bradford n°500-0006N (BioRad®-UK). A seguir as amostras foram aliqüotadas em microtubos de 1,5ml (Axygen®-EUA) contendo 1000µg de proteína cada. A seguir, as amostras foram liofilizadas por 12 horas em aparelho liofilizador da marca Heto-Holten no Laboratório de Tecnologia de Alimentos FZEA-USP e armazenadas a -20°C (Figura 10).

Figura 10 – Fotografia do processo de liofilização das amostras

3.1.4 Eletroforese Bidimensional

Para a determinação do perfil protéico do ambiente uterino, as amostras de lavado uterino coletadas dos animais prenhes e não inseminados foram submetidas à técnica de Eletroforese Bidimensional em gel de poliacrilamida 10% seguida de coloração pelo método de Coomassie Blue e análise densitométrica do perfil protéico.

Amostras liofilizadas contendo 1000µg de proteína foram solubilizadas em 450µl de solução contendo 8 M uréia, 2% CHAPS, 0,002% de Bromofenol-Blue, 1,26mg DTT e 0,5% de tampão IPG (GE Healthcare) e aplicadas em um poço da bandeja de re-hidratação (GE Healthcare) nivelada sobre superfície plana. A seguir, sobre a amostra colocou-se uma fita do tipo Immobiline™ DryStrip pH 3-10, 24 cm (GE Healthcare), retiraram-se as bolhas de ar presentes entre a fita e a amostra e o respectivo poço foi selado com aproximadamente 2ml de óleo mineral (DryStrip Cover Fluid; Plusone). Fechou-se a tampa da bandeja e a re-hidratação ocorreu por 15 horas em temperatura ambiente menor que 30° C (Figura 11). Após a re-hidratação, a fita foi retirada do poço com o auxílio de uma pinça pela extremidade e colocada verticalmente sobre papel filtro para que escorresse o óleo excedente.

Para a primeira dimensão de separação das macromoléculas protéicas, na qual foi realizada a focalização isoeletrica (IEF) as fitas re-hidratadas foram colocadas individualmente em sarcófagos da bandeja ETTAN JP (GE Healthcare) posicionada sobre o aparato para IEF Ettan IPGphor II IEF (GE Healthcare) com a parte contendo o gel virada para baixo e as extremidades positiva e negativa da fita posicionadas nos pólos positivo e negativo do aparelho, respectivamente. Em cada extremidade de cada fita foi colocado um papel filtro, de 1,7 x 0,7 cm x 1mm de espessura, embebido em água ultrapura (Milli-Q), que encontrava-se em contato com o eletrodo, que foi posicionado posteriormente. Antes de iniciar a corrida as fitas foram cobertas com óleo mineral (DryStrip Cover Fluid; Plusone). Para a IEF, o aparelho foi programado em 20° C, 50µA/Strip, 1° passo: 500V – 500Vhr, 2° passo: 1000V – 1000 Vhr e 3° passo: 8000V – 62.500Vhr com tempo de focalização de aproximadamente 10 horas (Figura 12).

Figura 11 - Fotografia do processo de reidratação das fitas com as amostras liofilizadas

Figura 12 – Fotografia das fitas reidratadas prontas para a focalização isoeletrica no aparato Ettan IPGphor II IEF

Após a conclusão da primeira dimensão, as fitas foram retiradas do sarcófago com o auxílio de uma pinça e novamente colocadas verticalmente sobre papel filtro para que escorresse o óleo excedente. A seguir, as fitas foram equilibradas por 15 minutos em 10ml de solução SDS de equilíbrio, a qual continha 50 mM Tris-HCl com pH 8.8, 6 M uréia, 2% w/v SDS, 30% v/v glycerol, 0.002% w/v bromofenol blue e 100mg de DTT em um volume final de 200mL completado com água bidestilada e deionizada. Seguiu nova incubação, por 15 minutos, na mesma solução anterior, mas na qual substituíram-se 250mg de iodoacetamina pelo DTT. As incubações foram realizadas sobre plataforma

agitadora (Figura 13).

A segunda dimensão da 2D-EF tem por princípio separar as proteínas de acordo com seus respectivos pesos moleculares. Para fazer cada gel (25 x 20 cm x 15 mm) foram utilizados 100mL de solução contendo 39.5mL de água bidestilada e deionizada; 25 mL de TRIS-HCL 1.5M com pH 8,8; 33.3 mL de solução estoque de acrilamida, constituída por 10% w/v acrilamida e 0,8% N-methylenebisacrilamida; 1ml de solução de 10% w/v SDS; 1 ml de solução de 10% persulfato de amônio e 0,172 µL de TEMED. A fita foi posicionada horizontalmente na parte superior da placa contendo o gel polimerizado estando a extremidade da fita que previamente contatou o eletrodo positivo do lado esquerdo. Ao lado esquerdo do gel, acomodou-se uma tira de papel filtro de 1,7 x 0,7 cm x 1mm de espessura, contendo 20µl de Padrão de Peso Molecular Full-Range Rainbow™ (GE Healthcare). As placas (n=6) foram seladas com solução de 0,5% agarose contendo 0,002% w/v Bromofenol Blue. Seis géis correram simultaneamente na cuba Ettan DALTsix (GE Healthcare) com tampão de corrida composto de 25 mM TrisBase, 192 mM Glicina e 0,1% w/v SDS na condição de 5 Watts/gel, 600 Volts, 400 mAmperes por 30 minutos (Figura 14). A seguir, alterou-se a potência para 17 watts/gel e aguardou-se até que a linha de corrida, que se detecta visualmente, houvesse chegado ao final da placa (aproximadamente 5 horas). Toda a corrida foi realizada com circulador de água (Quimes®) conectado à cuba e regulado a 10°C para refrigerar o tampão de corrida. Os géis foram corados com Comassie Stain Solution (BioRad, Califórnia-EUA) por duas horas (Figura 15). Posteriormente foram descorados por 24 horas com solução de 10% de ácido acético glacial e 4% de metanol, escaneados pelo programa LabScan v5.0 (Labcrew™) e digitalizados pelo programa Image Scanner™II (GE Healthcare).

Figura 13 - Fotografia da incubação das amostras sobre a plataforma agitadora com solução SDS de equilíbrio

Figura 14 – Fotografia do posicionamento dos géis na cuba de corrida da segunda dimensão da 2D-EF

Figura 15 – Fotografia do processo de coloração dos géis com Comassie Stain Solution

3.1.5 Análise dos géis de Eletroforese Bidimensional

Os géis foram analisados para caracterização do perfil protéico utilizando o programa Image Master-2D ELITE V. 4.01 (GE Healthcare). Utilizando uma ferramenta do programa, posicionou-se sobre a imagem uma escala do ponto isoelétrico, baseado na faixa utilizada para a primeira dimensão, e outra do peso molecular, baseado no posicionamento de cada padrão de peso molecular adicionado no momento que se procedeu a segunda dimensão da eletroforese, como descrito anteriormente.

Os géis (n=14) foram analisados individualmente para a identificação de todas as proteínas presentes em cada um dos géis. As proteínas foram selecionadas a partir do *spot* formado pela proteína no gel de acrilamida após passar pelo processo da eletroforese. Para cada *spot* foi determinado o volume normalizado, que foi calculado a partir do produto da área de cada *spot* pela densidade óptica absoluta da proteína, após subtração do fundo (*background*), sendo considerando para esse procedimento o valor mais baixo da margem (*lowest on boundary*) de cada gel.

Após a conclusão das análises individuais, os géis foram agrupados em um experimento dentro do programa. Foi criado um gel de referência que continha todas as proteínas presentes em todos os géis. Após a criação do gel de referência os géis individuais foram separados em grupos de acordo com o estado e o tipo de lavado (*Folley* cíclico, n=4; *Folley* prenehe, n=3; *Post-mortem* cíclico, n=4; *Post-mortem* prenehe, n=3). Para cada grupo foi criado um gel médio, contendo todas as proteínas que estavam presentes em pelo menos dois géis ou ausentes em todos os géis daquele grupo. Tanto para a criação do gel de referência quanto para o gel médio, utilizou-se a ferramenta de *overwapping* do programa.

Para realizar a coincidência entre as proteínas dos géis individuais com o gel de referência e os géis médios respectivos foi realizado o "*matching*". O *matching* constitui em encontrar a proteína no gel de referência ou no gel médio que coincidissem com uma determinada proteína no gel analisado. Primeiramente, esse procedimento foi realizado entre cada um dos géis de cada grupo com seu respectivo gel médio e depois, entre cada um dos géis médios de cada grupo

com o gel de referência. A seguir, a numeração das proteínas de cada gel, fornecida automaticamente pelo programa, foi ajustada para que cada proteína nos géis individuais coincidissem com a proteína respectiva no gel de referência. Resultou desse procedimento uma tabela contendo os volumes normalizados de todas as proteínas que atenderam aos critérios supramencionados, em cada um dos géis.

3.1.6 Radioimunoensaio para Progesterona

A concentração plasmática de progesterona foi mensurada por radioimunoensaio conforme descrito por Badinga (1992) e modificado por Carrière e Lee (1994). Os coeficientes intra-ensaios para referências com baixa concentração (1,25ng/mL) foram de 4,6%, para as de média concentração (6,46ng/mL) foram de 3,05%, já para as de alta concentração (9,68ng/mL) foram 3,9%.

3.1.7 Análise estatística

Foram utilizados nas análises os animais que apresentaram concentrações séricas de progesterona indicativas da presença de um corpo lúteo funcional no momento da obtenção dos lavados uterinos (i.e., $\geq 1\text{ng/mL}$).

Foi realizada análise de variância do volume normalizado de cada proteína, considerando como variáveis independentes os efeitos de tipo de lavado (Folley ou Post-mortem), estado (cíclica ou gestante) e a interação tipo de lavado por estado. As médias foram apresentadas como média aritmética $\pm$ erro padrão da média. Para as análises utilizou-se o procedimento GLM do software SAS 9.1. (2002).

4 RESULTADOS

Nos animais sincronizados observou-se taxa de ovulação (número de animais que ovularam/número de animais submetidos ao protocolo de sincronização da ovulação) de 73%. A taxa de prenhez (presença do conceito no dia do lavado) desse experimento foi de aproximadamente 27% (número de animais que foram encontrados o conceito no lavado/número de animais inseminados). A concentração de progesterona plasmática apresentou valores superiores a 1ng/mL para todos os animais que participaram do experimento no dia do lavado.

O perfil protéico dos lavados uterinos obtidos por sonda de folley ou *post-mortem* de vacas ciclando ou prenhes, através da 2D-EF constituiu-se de 178 proteínas, cujos pesos moleculares médios variaram entre 2KDa e 110KDa; e pontos isoelétricos médios entre 3,45 e 8,52 como demonstrado no apêndice A e na figura 16.

As proteínas foram distribuídas de acordo com o ponto isoelétrico da seguinte forma: 22% (39/178) entre PI 3 e 5,5; 74% (132/178) entre PI 5,5 e 8 e 4% (7/178) com PI superior a 8. Em relação ao peso molecular, 44% (79/178) das proteínas possuíam peso molecular menor que 50KDa; 54% (95/178) entre 50 e 100KDa; 1% (2/178) acima de 100KDa e 1% (2/178) não tiveram seu peso molecular estimado. A distribuição das proteínas de acordo com seus pontos isoelétricos e pesos moleculares estão mencionados abaixo (Tabela 1).

Tabela 1 – Número de proteínas classificadas por ponto isoeletrico (PI) e peso molecular relativo (PMR) por região do gel dos lavados uterinos coletados por sondas de folley ou *post-mortem* de vacas ciclando (C) ou prenhes (P) 18 dias pós-estro.

PMR	PI			Total
	Entre 3 e 5,5	Entre 5,5 e 8	> 8	
> 100		02		2 (1%)
Entre 50 e 100	20	75		95 (54%)
< 50	19	54	7	79 (44%)
Não estimado		02		2 (1%)
Total	39 (22%)	132 (74%)	7 (4%)	178

Figura 16 – Gel representativo do perfil protéico bi-dimencional dos lavados uterinos coletados por sonda de folley de vacas ciclando (A) ou prenhes (B), ou *post-mortem* de animais ciclando (C) ou prenhes (D)

Foi sumarizada a distribuição das proteínas de acordo com a sua presença (Tabela 2) ou ausência (Tabela 3) nos lavados uterinos coletados por sonda folley (F) ou *post-mortem* (PM) de vacas ciclando (C) ou prenhes (P). Dentre o total de 178 proteínas selecionadas, os lavados realizados por sonda de folley (FC ou FP) foram os que apresentaram o maior número de proteínas, 151, sendo que os lavados de animais cíclicos apresentaram 96 proteínas e os de animais prenhes 86. Entretanto os lavados realizados *post-mortem* (PMC ou PMP) apresentaram apenas 54 proteínas, das quais 24 estiveram presentes nos lavados PMC e 36 nos lavados PMP. Em relação ao estado reprodutivo 115 proteínas foram encontradas nos lavados dos animais cíclicos (FC ou PMC), enquanto 104 proteínas foram selecionadas nos lavados de animais prenhes (FP e PMP).

Tabela 2 – Número de proteínas presentes concomitantemente em lavados uterinos listados nas linhas e colunas, coletados por sonda de folley (F) ou *post-mortem* (PM) de vacas ciclando (C) ou prenhes (P) 18 dias pós estro.

Grupos	FC	FP	PMC	PMP	FC ou FP	FC ou PMC	FP ou PMP	PMC ou PMP
FC	96	31	5	15	96	96	36	17
FP		86	6	18	86	35	86	22
PMC			24	6	7	24	10	24
PMP				36	24	20	36	36
FC ou FP					151	98	91	25
FC ou PMC						115	39	36
FP ou PMP							104	40
PMC ou PMP								54

Tabela 3 – Número de proteínas presentes em lavados uterinos listados nas linhas, mas ausentes em lavados uterinos listados nas colunas, coletados por sonda de folley (F) ou post-mortem (PM) de vacas ciclando (C) ou prenhes (P) 18 dias pós estro

Grupos	FC	FP	PMC	PMP	FC ou FP	FC ou PMC	FP ou PMP	PMC ou PMP
FC	0	55	19	19	55	19	68	37
FP		0	18	18	66	82	18	32
PMC			0	30	145	90	94	30
PMP				0	128	97	68	18
FC ou FP					0	17	13	27
FC ou PMC						0	63	18
FP ou PMP							0	14
PMC ou PMP								0

Analizando as proteínas de acordo com o tipo de lavado, 31 proteínas foram comuns entre os lavados realizados por sonda de folley (FC e FP), enquanto entre os lavados realizados *post-mortem* (PMC e PMP) apenas seis proteínas estiveram presentes em ambos os lavados.

Nos lavados realizados em animais ciclando (FC e PMC) cinco proteínas estiveram presentes em ambos os tipos de lavados, enquanto nos lavados realizados em animais prenhes (FP e PMP) 18 proteínas foram comuns em ambos os tipos de lavado. Entre os lavados FC e PMP ou FP e PMC, 15 e 6 proteínas, respectivamente, foram comuns.

A média aritmética e o erro padrão da média do volume normalizado das proteínas selecionadas presentes nos lavados uterinos coletados por sonda de folley ou *post-mortem* de animais cíclicos ou prenhes foram listadas no apêndice B.

Foi realizado análise de variância do volume normalizado das proteínas presentes nos lavados uterinos, coletados no dia 18 pós-estro, por sonda de folley ou *post-mortem* para testar o efeito do tipo de lavado, de animais cíclicos ou prenhes, para testar efeito de estado e o efeito da interação estado x lavado. Os valores estão descritos no apêndice C.

Na análise de variância 17 proteínas apresentaram efeito de estado ($P < 0,05$), sendo todas as médias do volume normalizado maiores nos animais prenhes em relação aos animais cíclicos (Tabela 4 e Figura 17). Das proteínas que apresentaram efeito de tipo de lavado ($P < 0,05$), 17 tiveram valores médios maiores nos lavados realizados por sonda de folley em relação aos *post-mortem*, e apenas 3 apresentaram valores maiores nos lavados *post-mortem* em relação aos folley. Dezesete proteínas apresentaram efeito da interação estado x lavado.

Tabela 4 - Sumário da análise de variância da densidade óptica (volume normalizado) das proteínas identificadas nos lavados uterinos coletados por sonda de folley (F) ou *post-mortem* (PM) de vacas ciclando (C) ou prenhes (P) 18 dias pós-estro

	Grupos	Número de proteínas
Efeito de estado ($P < 0,05$) ^a	P > C	17
	C > P	0
Efeito de tipo de lavado ($P < 0,05$) ^b	F > PM	17
	PM > F	3
Efeito de interação estado x lavado ($P < 0,05$) ^c		17

^a proteínas cujo volume normalizado foi afetado pelo estado reprodutivo da vaca (C: cíclica; P: prenhe).

^b proteínas cujo volume normalizado foi afetado pelo tipo de lavado realizado (F: sonda de *Folley*; PM: *Post-mortem*).

^c proteínas cujo volume normalizado foi afetado pela interação estado x lavado.

Figura 17 - Média aritmética ($\pm$ erro padrão da média) do volume normalizado de proteínas que apresentaram efeito de estado, tipo de lavado ou interação estado x tipo de lavado ($P < 0,05$), em lavados uterinos coletados por sonda de folley (---○---) ou *post-mortem* (—●—) de animais cíclicos (C) ou prenhes (P) no dia 18 pós-estro

Figura 17 – Continuação - Média aritmética ($\pm$ erro padrão da média) do volume normalizado de proteínas que apresentaram efeito de estado, tipo de lavado ou interação estado x tipo de lavado ($P < 0,05$), em lavados uterinos coletados por sonda de folley (---○---) ou *post-mortem* (—●—) de animais cíclicos (C) ou prenhes (P) no dia 18 pós-estro

Figura 17 – Continuação - Média aritmética ($\pm$ erro padrão da média) do volume normalizado de proteínas que apresentaram efeito de estado, tipo de lavado ou interação estado x tipo de lavado ($P < 0,05$), em lavados uterinos coletados por sonda de folley (---○---) ou *post-mortem* (—●—) de animais cíclicos (C) ou prenhes (P) no dia 18 pós-estro

Figura 17 – Continuação - Média aritmética ($\pm$ erro padrão da média) do volume normalizado de proteínas que apresentaram efeito de estado, tipo de lavado ou interação estado x tipo de lavado ($P < 0,05$), em lavados uterinos coletados por sonda de folley (---○---) ou *post-mortem* (—●—) de animais cíclicos (C) ou prenhes (P) no dia 18 pós-estro

Figura 17 – Continuação - Média aritmética ($\pm$ erro padrão da média) do volume normalizado de proteínas que apresentaram efeito de estado, tipo de lavado ou interação estado x tipo de lavado ($P < 0,05$), em lavados uterinos coletados por sonda de folley (---○---) ou *post-mortem* (—●—) de animais cíclicos (C) ou prenhes (P) no dia 18 pós-estro

5 DISCUSSÃO

O perfil protéico bi-dimensional dos lavados uterinos obtidos por sonda de folley ou *post-mortem* apresentou grande variabilidade entre as diferentes amostras. Para reduzir tal variabilidade, foram selecionadas apenas as proteínas presentes em pelo menos dois animais em um mesmo grupo ou ausentes em todos os animais de um determinado grupo. Dada a quantidade limitada de amostra de cada lavado, apenas foi realizada uma análise de cada lavado (i.e., não houve replicatas de cada lavado). Deste modo, a presença de uma determinada proteína em pelo menos dois lavados em um mesmo grupo diminui a probabilidade de que *spots* presentes nos géis por artefatos da técnica tenham sido considerados proteínas.

Seguindo esse critério, foram selecionadas 178 proteínas. Roncoletta (2003) analisou o plasma seminal bovino utilizando a 2D-EF. Esse fluido apresentou um perfil protéico de 225 proteínas no gel escolhido como referência para o experimento. Kayser et al. (2006) utilizando 2D-EF, analisou lavados uterinos de suínos entre os dias 10 e 13 do ciclo estral ou prenhez e obteve um perfil contendo 280 proteínas.

Em relação à distribuição das proteínas de acordo com o ponto isoelétrico, 74% (132/178) apresentaram PI entre 5,5 e 8. Esse resultado era esperado devido ao fato de Mather (1975) ter relatado que o pH fisiológico do ambiente uterino é 7,3 entre os dias 17 e 18 do ciclo estral.

Entre as 178 proteínas selecionadas para compor o perfil protéico dos lavados uterinos apenas duas estiveram presentes em todos os grupos (FP, FC, PMP e PMC). Uma dessas proteínas, a P079 apresentou PM de 79,16 KDa ($\pm 7,16$), Niemeyer et al. (2007) analisando as mesmas amostras por eletroforese unidimensional, semelhantemente encontrou um proteína com PMR de 79KDa em todas as amostras analisadas. Entretanto, esse número é menor que o valor encontrado por Roncoletta (2003) que analisou o plasma seminal bovino utilizando a 2D-EF e apresentou um perfil de 225 proteínas no gel escolhido como referência para o experimento, sendo que dessas, 40 proteínas apresentaram-se em todas as amostras.

Em relação à presença e ausência das proteínas nos diferentes grupos, foram encontradas cinco proteínas comuns entre os lavados de animais ciclando (FC e PMC). Sugere-se que tais proteínas sejam exclusivas do ambiente uterino de vacas

ciclando.

Os lavados realizados por sonda de folley (FC ou FP) apresentaram um número de proteínas bastante superior aos lavados realizados *post-mortem* (PMC ou PMP), 151 e 54 respectivamente. Concluiu-se que há evidente efeito do método utilizado para obtenção do lavado sobre a composição do perfil protéico.

A metodologia utilizada para obtenção de lavados uterinos por sonda de folley é conveniente, pois como é realizado *in vivo* preserva o animal, permitindo que futuras análises sejam realizadas utilizando o mesmo animal, descartando efeitos genéticos nos resultados obtidos. Entretanto, existe a hipótese de que a manipulação do aparelho reprodutivo necessária para a obtenção dos lavados altere a composição do meio e impeça a identificação das proteínas específicas da fase ou estado do animal.

Segundo Bartol et al. (1985) e também proposto por Niemeyer et al. (2007) a manipulação do aparelho reprodutivo pode causar inflamação, edema e influxo de proteínas séricas para o lúmen uterino. Uma possível explicação para a composição similar entre os lavados estudados, é que a maioria das proteínas encontradas são de origem plasmática, como a albumina e as globulinas (LEE et al., 1998; ALAVI-SHOUSHTARI et al., 2006). Este fator pode explicar a similaridade entre o perfil protéico de lavados obtidos por sonda de folley em vacas ciclando e prenhes.

Dezoito proteínas foram encontradas em ambos lavados de animais prenhes (FP e PMP). Supõe-se que essas sejam proteínas específicas do ambiente uterino de animais prenhes ao redor do 18º dia da gestação. Esses resultados foram obtidos devido a uma maior sensibilidade da 2D-EF na separação de proteínas em relação à eletroforese unidimensional, uma vez que Niemeyer et al. (2007) analisando as mesmas amostras não encontraram diferenças entre os perfis protéicos dos lavados uterinos de vacas ciclando ou prenhes.

Foram encontradas 31 proteínas semelhantes presentes em lavados realizados por sonda de folley (FC e FP). Supõe-se que essas proteínas sejam de origem sérica e sua presença nesse método de lavado deva-se ao extravasamento das mesmas pela manipulação dos cornos uterinos durante a obtenção do lavado. Essa suposição pode ser confirmada pela presença da proteína P223 que apresentou PMR de 60,66 ($\pm 5,65$). Esse PMR corresponde à albumina, a principal proteína sérica. Esse resultado foi semelhante ao encontrado por Niemeyer et al. (2007) que destacou uma proteína com PMR de 59KDa, sendo a proteína de maior

abundancia entre os lavados. Da mesma forma a proteína P223 apresentou uma densidade óptica média de 1,70 ($\pm 1,23$) para o grupo FC e 2,37 ($\pm 2,19$) no grupo FP. Esses resultados estão de acordo com Berendt et al. (2005) que verificou que o excesso de albumina encontrado nos lavados uterinos são de origem sérica e passaram para o lúmen pelos capilares presentes na parede do endométrio altamente vascularizado. Entretanto, segundo Alavi-Shoushtari et al. (2006) a albumina esta presente no ambiente uterino durante o ciclo estral, porém acredita-se que em concentrações menores do que as possivelmente detectáveis nos lavados post-mortem por 2D-EF.

Entre as amostras obtidas nos lavados *post-mortem* (PMC e PMP), foram selecionadas seis proteínas semelhantes neste método de lavagem. Tais proteínas devem ser constituintes do ambiente uterino de animais prenhes e cíclicos, pois sua representatividade exclusiva neste método de lavado seria devido a uma menor concentração relativa de proteínas séricas nesses lavados em comparação ao que ocorre nos lavados obtidos por sonda de folley, o que permite que as proteínas específicas do ambiente uterino tenham maior representatividade no perfil protéico uterino, em relação ao perfil dos lavados realizados por sonda de folley onde a diluição com outras proteínas é maior. Essa conclusão é confirmada por Niemeyer et al. (2007) que concluíram que as proteínas secretadas pelo útero e pelo concepto estão presentes nos lavados coletados por sonda de folley, porém em concentrações abaixo do limite de detecção da técnica utilizada por eles.

As proteínas que estiveram presentes apenas nos lavados FC e PMP ou nos lavados FP e PMC, 15 e 6 respectivamente, sugere que houve uma falha na detecção desta proteínas nos outros grupos, nos quais elas estiveram ausentes, pois não se encontrou uma explicação plausível fisiologicamente para explicar esse fenômeno.

Foram selecionadas 19 proteínas presentes nos lavados FC e 18 proteínas presentes nos lavados FP. Devido à ausência dessas proteínas nos respectivos estados nos lavados post-mortem, conclui-se que essas proteínas são de origem sérica, oriundas da manipulação do útero durante a obtenção dos lavados. Entretanto as proteínas que estavam presentes no grupo FC e não estavam presentes no grupo FP, sugere que houve uma falha na detecção destas proteínas durante as análises, assim como das proteínas presentes no grupo FP e ausentes

no grupo FC.

Destacam-se 10 proteínas selecionadas apenas entre os lavados PMP, o que as caracteriza como proteínas exclusivas do ambiente uterino de animais no dia 18 da gestação. Essas proteínas apresentaram valores da densidade óptica média baixas, com exceção da proteína P936 que apresentou densidade óptica média de 4,05 ($\pm 4,03$). Julga-se que essas proteínas, com exceção da P936, não foram encontradas nos lavados FP devido a uma maior diluição com outras proteínas provavelmente de origem séricas. Entretanto, a não identificação da proteína P936 nos lavados por sonda de folley, pode ser devido a uma falha na sua detecção no grupo FP, uma vez que seu volume nos lavados *post-mortem* foi alto.

Justificando a ausência de determinadas proteínas entre os grupos, atribui-se aos lavados FC e FP, que a presença de uma grande quantidade de proteínas de origem sérica, devido a manipulação do útero no momento da obtenção dos lavados, tenha impedido a recuperação e a identificação das mesmas proteínas selecionadas nos lavados *post-mortem*.

Entretanto obteve-se uma grande quantidade de proteínas ausentes nos lavados realizados PM, em ambos estados cíclico e prenhe. Essa ausência possivelmente é devido ao fato de a maior parte das proteínas selecionadas serem oriundas dos lavados realizados por sonda de folley, e provavelmente originadas da circulação sangüínea. Entretanto, questiona-se se os lavados *post-mortem* apresentam realmente uma menor concentração de proteínas em relação aos lavados coletados por sonda de folley, ou houve alguma falha no processamento das amostras.

Entre as proteínas que apresentaram efeito significativo ($P < 0,05$) na análise de variância das médias da densidade óptica entre os diferentes grupos, as proteínas P044, P105, P163, P253, P304, P310, P361, P369, P718, P764 apresentaram efeito de estado, tipo de lavado e interação estado x lavado. Esse efeito foi pelo fato dessas proteínas estarem presentes apenas nos lavados FP. Supõe-se que essas proteínas sejam características da gestação, porém de origem sérica, por estarem presentes nos lavados FC com densidade óptica muito baixa. A ausência dessas proteínas nos lavados PMP pode ser devido a falhas na detecção devido a sua baixa concentração.

Da mesma forma as proteínas P827 e P907 apresentaram efeito de estado, lavado e interação estado x lavado, porém essas estavam presentes apenas nos

lavados PMP. Essas proteínas também podem ser caracterizadas como exclusivas de animais prenhes, sintetizadas *in situ*. Sua ausência nos lavados FP seria devido ao efeito de diluição das proteínas séricas extravasadas no lúmen uterino no momento da coleta do lavado.

As proteínas P050, P052, P053, P054 e P168 apresentaram efeito de estado, pois estavam presentes apenas nos lavados de animais prenhes (FP e PMP). Apesar dessas proteínas não apresentarem efeito de lavado, todas apresentaram maior média do volume normalizado nos lavados *post-mortem* em relação aos lavados por sonda de folley. Supõe-se que essas proteínas estejam envolvidas com o processo de reconhecimento materno da gestação, por estarem presentes apenas nos lavados de animais prenhes. A densidade óptica média de todas essas proteínas estiveram maiores nos lavados *post-mortem* em relação aos por sonda de folley, embora a diferença não tenha sido significativa, atribui-se o menor valor da densidade óptica nos lavados por sonda de folley a uma maior diluição dessas proteínas por outras de origem sérica presentes no lavado.

As proteínas P072, P088, P128, P209 e P243 apresentaram efeito de lavado, pois estavam presentes apenas nos lavados realizados por sonda de folley. Caracterizando-as como proteínas séricas presentes no lavado devido a manipulação do aparelho reprodutivo durante a obtenção dos lavados.

As proteínas P398, P431 e P737 apresentaram apenas efeito da interação estado x lavado, pois elas estavam presentes alternadamente nos lavados folley cíclico e *post-mortem* prenhe ou folley prenhe e *post-mortem* cíclico. Essa interação é resultado da ausência dessas proteínas nos outros grupos do mesmo método de lavagem ou estado fisiológico, sugerindo que houve falha na detecção destas proteínas, pois não se encontrou outra explicação plausível fisiologicamente para esse fenômeno.

A proteína P079 foi a única que apresentou efeito de lavado e interação estado x lavado, estando presente em todos os grupos de lavados (FC, FP, PMC e PMP), apresentando média do volume normalizado maior nos lavados realizados por sonda de folley em relação as realizados *post-mortem*. Com isso concluí-se que essa proteína é integrante do ambiente uterino, e por apresentar média do volume normalizado maior nos lavados por sonda de folley sugere que seja de origem sérica.

A proteína P077 esteve presente nos lavados por sonda de folley (FC e FP) e

nos lavados *post-mortem* de vacas prenhez. Apresentou efeito de lavado por possuir densidade óptica média maior nos lavados por sonda de folley. Com isso, conclui-se que essa seja também uma proteína integrante do ambiente uterino de origem sérica, e a sua ausência nos lavados PMC seja por falhas na detecção da proteína.

A proteína P824 apresentou efeito de lavado, por que esteve presente somente nos lavados realizados *post-mortem* (PMC e PMP). Esse resultado sugere que assim como a P079, essa proteína seja integrante do ambiente uterino, porém sintetizada *in situ*, uma vez que nos lavados por sonda de folley que apresentaram uma diluição por proteínas séricas, não foi possível a sua identificação.

Foi detectado um número de proteínas bastante superior ao descrito por Niemeyer et al. (2007) que analisaram as mesmas amostras utilizando a eletroforese unidimensional. A separação das proteínas pelo ponto isoelétrico é uma ferramenta importante na separação das proteínas, o que explica a diferença no número de proteínas encontradas na 2D-EF em relação a eletroforese unidimensional.

Entretanto obteve-se um número de proteínas abaixo do esperado nos lavados realizados *post-mortem*. Possivelmente houve menor infiltração de proteínas do soro no momento da realização do lavado. Outra explicação seria por uma falha no processamento das amostras ou durante a 2D-EF.

Houve a detecção de proteínas presentes apenas nos lavados de vacas prenhes, que podem estar envolvidas no diálogo materno-embrionário durante o processo de estabelecimento da gestação. Após seqüenciamento e identificação, a presença das mesmas deve ser confirmada e sua função testada em experimento delineados especificamente para esse fim.

6 CONCLUSÕES E IMPLICAÇÕES

O lúmen uterino é um ambiente distinto, que possui função específica, e a determinação de seus componentes, assim como a sua função depende da coleta, processamento e análise desse meio.

Na presente dissertação, confirmou-se a hipótese postulada inicialmente, uma vez que de fato ocorreram diferenças no perfil de proteínas presentes em lavados uterinos de vacas ciclando ou gestantes no período crítico.

Embora o perfil protéico dos lavados uterinos realizados por sonda de folley seja influenciado por proteínas do soro sanguíneo, devido à manipulação do aparelho reprodutivo durante a obtenção dos lavados, existem varias proteínas específicas capazes de serem detectadas nesse método de lavado.

Esperava-se uma maior efetividade dos lavados realizados *post-mortem* em relação aos realizados por sonda de folley. Entretanto os lavados obtidos por sonda de folley foi melhor por identificar um maior numero de proteínas, o que permitiu identificarmos diferenças maiores entre os lavados de animais ciclando e prenhes.

Devido a baixa concentração de proteínas presentes nos lavados *post-mortem*, são necessários ajustes na sensibilidade durante a análises dos resultados.

A 2D-EF é uma técnica capaz de caracterizar o perfil protéico do ambiente uterino de fêmeas bovinas, assim como identificar alterações nesse perfil de acordo com a fase ou estado fisiológico do animal. Entretanto são necessários ajustes para uma maior sensibilidade na identificação e quantificação das proteínas. A análise dos lavados, embora que computadorizada, ainda é muito subjetiva, sendo importante a repetibilidade das análises para fundamentar os resultados. Isso explica o maior numero de proteínas com frequência diferente em relação ao numero de proteínas com diferença estatística.

Uma vez definido o perfil protéico e a origem das proteínas presentes no ambiente uterino, é necessário relaciona-las à fertilidade do animal, sendo a melhora deste índice o objetivo final desse estudo. Para tanto, faz-se extremamente necessária o sequenciamento das proteínas e estudos específicos sobre as mesmas.

Contudo conclui-se que o perfil protéico do ambiente uterino pode ser influenciado pelo método utilizado para obtenção dos lavados, alterando a composição, predominantemente por proteínas não específicas da fase ou do estado reprodutivo do animal, entretanto comparações entre diferentes métodos pode selecionar proteínas específicas do ambiente uterino.

REFERÊNCIAS

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Protein identification by mass spectrometry, **Nature**, v. 422, p. 198–207, 2003.

ALAVI-SHOUSHTARI, S. M.; ASRI-REZAI, S.; ABSHENAS, J. A study of the uterine protein variations during the estrus cycle in the cow: A comparison with the serum proteins. **Animal Reproduction Science**, v. 96, n. 1-2, p. 10-20, 2006.

ALAVI-SHOUSHTARI, S. M.; ASRI-REZAI, S.; ABSHENAS, J. A study of the uterine protein variations during the estrus cycle in the cow: Molecular weights determination. **Animal Reproduction Science**, In Press, Corrected Proof, Available online 27 March 2007. Disponivel em: doi:10.1016/j.anireprosci.2007.03.018. Acesso em: 17/08/2007.

ALEXENKO A.P.; EALY A.D.; BIXBY J.A.; ROBERTS R.M. A classification of interferon- τ . **Journal Interferon Research**, v. 20, p. 817-822, 2000.

ALEXENKO A.P.; LEAMAN D.W.; LI L.; ROBERTS R.M. The antiproliferative and antiviral activities of IFN- τ variants in human cells. **Journal Interferon Research**, v. 17, p. 769-779, 1997.

ANTHONY, R. V.; LIANG, R.; KAYL, E. P.; PRATT S. L. The growth hormone/prolactin gene family in ruminant placentae. **Journal Reproduction Fertility(Suppl)**, v. 49, p. 83–95, 1995.

ASSELIN, E.; DROLET, P.; FORTIER, M.A. In vitro response to oxytocin and interferon-tau in bovine endometrial cells from caruncular and inter-caruncular areas. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 241-247, 1998.

ASSELIN, E.; FORTIER, M. A. Detection and regulation of the messenger for a putative bovine endometrial 9-keto-prostaglandin E2 reductase: effect of oxytocin and interferon-tau. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 125-131, 2000.

BADINGA, L.; DRIANCOURT, M. A.; SAVIO, J. D.; WOLFENSON, D.; DROST, M.; DE LA COSTA, R. L.; THATCHER, W. W. Endocrine and ovarian responses associated with the first-wave dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 47, p. 871-883. 1992.

BANU, S. K.; AROSH, J. A.; CHAPDELAINE, P.; FORTIER, M. A. Molecular cloning and spatio-temporal expression of the prostaglandin transporter: A basis for the action of prostaglandins in the bovine reproductive system. **PNSA**, v. 30, n. 20, p. 11747-11752, 2003.

BARTOL, F. F.; ROBERTS, R. M.; BAZER, F. W.; THATCHER, W. W. Characterization of proteins produced in vitro by bovine endometrial explants. **Biology of Reproduction**, v. 33, p. 745-759, 1985.

BATHGATE R. A. D.; TILLMANN G.; IVELL R. Molecular mechanism of the bovine oxytocin receptor gene regulation. **Biology of Reproduction**, v. 58, 1998. Supplement, 160,

BAZER, F. W.; ROBERTS, R. M.; ZAVY, M. T; CATON, D.; BARRON, D. H. Method for obtaining ovine uterine secretions from unilaterally pregnant ewes. **Journal of Animal Science**, v. 49, n. 6, p. 1522- 1527, 1975.

BEIER, H. M. Physiology of uteroglobulins. In: SPILMAN, C. H.; WILKS, J. W. (Ed.). **Novel aspects of reproductive physiology**. New York: Spectrum Pub. Inc., 1978. p. 220-248.

BINELLI, M.; THATCHER, W. W. Conceptus stimulated signal transduction pathway in the endometrium to maintain pregnancy. **Annual Review of Biomedical Sciences**. v. 1, p. 59- 85. 1999.

BINELLI, M.; GUZELOGLU A.; BADINGA L.; ARNOLD, D. R.; SIROIS, J.; HANSEN, T. R.; THATCHER, W. W. Interferon- τ modulates phorbol ester-induced production of prostaglandin and expression of cyclooxygenase-2 and phospholipase $\alpha 2$ from bovine endometrial cells. **Biology Reproduction**, v. 63, p. 417-424, 2000.

BINELLI, M.; SUBRAMANIAM, P.; DIAZ, T.; JOHNSON, G. A.; HANSEN, T. R.; BADINGA, L.; THATCHER, W. W. Bovine interferon-tau stimulates the janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway in bovine endometrial epithelial cells. **Biology Reproduction**, v. 64, p. 654-665, 2001.

BOTTARI, S. P.; VOKAER, A.; KAIVEZ, E.; LESCRAINER, J. P.; VAUQUELIN, G. P. Differential regulation of alpha-adrenergic receptor subclasses by gonadal steroids in human myometrium. **Journal Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 57, p. 937-941, 1983.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BREUEL, K. F.; LEWIS, P. E.; SCHRICK, F. N.; LISHMAN, A. W.; INSKEEP, E. K.; BUTCHER, R. L. Factors affecting fertility in the postpartum cow: role of the oocyte and follicle in conception rate. **Biology Reproduction**, v. 48, p. 655-661, 1993.

BUTLER, W. R. Nutritional interactions with reproductive performance in dairv cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 449-457, 2000.

BUTLER, W. R. Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 9, p. 2533-2539, 2001.

CARRIÈRE, P.D.; LEE, B. Direct Radioimmunoassay of Progesterone in Bovine Plasma using Danazol (17- α -2,4-pregnadien-20-yno(2,3-d)isoxazol-17-ol) as a Displacing Agent. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 58, p. 230-233, 1994.

CHARPIGNY, G.; REINAUD, P.; TAMBY, J. P.; CREMINON, C.; MARTAL, J.; MACLOUF, J.; GUILLMOT, M. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in ovine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. **Endocrinology**, v. 138, p. 2163-2171, 1997.

CHEW, B. P.; ERB, R. E.; FESSLER, J. F.; CALLAHAN, C. J.; MALVEN, P. V. Effects of ovariectomy and of prematurely induced parturition on progesterone, estrogens, and calving traits. **Journal of Dairy Science**, v. 62, p. 557-566, 1979.

COMMITTEE ON BOVINE REPRODUCTIVE NOMENCLATURE. Recommendations for standardizing bovine reproductive terms. **Cornell Veterinary**, v. 62, p. 216-237, 1972.

CRISTIANSON, W. T. Stillbirths mummies, abortions and early embryonic death. **The Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice**, v. 8, p. 623-639, 1992.

CUMMINGS, A. M.; YOCHIM, J. M. Differentiation of the uterus in preparation for gestation: a model for the action of progesterone. **Journal of theriogenology and biology**, v. 106, p. 353-374, 1984.

CURRIE, W. B.; CARD, C. E.; MICHEL, F. J.; IGNOTZ, G. Purification, partial characterization, and development of a specific radioimmunoassay for goat placental lactogen. **Reproduction Fertility**, v. 90, p. 25-26, 1990.

DANET-DESNOYERS, C.; WETZELS, C.; THATCHER, W. W. Natural and recombinant bovine interferon-tau regulate basal and oxytocin-induced secretion of prostaglandins F2 α and E2 by epithelial and stromal cells in the endometrium. **Reproduction Fertility Development**, v. 6, p. 193-202, 1994.

DARNELL, J.E. STATs and gene regulation. **Science**, v. 277, p. 1630-1635, 1997.

DEMMERS, K. J.; DERECKA, K.; FLINT, A. Trophoblast interferon and pregnancy. **Reproduction**, v. 121, p. 41-49, 2001.

DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. **Journal of reproduction and fertility**, v. 59, p. 463-468, 1980.

DUNN, M. J. **Gel electrophoresis: proteins**. Oxford: England: BIOS, 1993. p. 41-127.

DUNN, M. J.; GÖRG, A. In: PENNINGTON, S. R.; DUNN, M. J. (Ed.). **Proteomics – from protein sequence to function**. Oxford; England: BIOS, 2001. p. 43-63.

- DUNNE, L. D.; DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M. Embryo and fetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. **Animal Reproduction Science**, v. 58, p. 39-44, 2000.
- EALY, A. D.; GREEN, J. A.; ALEXENKO, A. P.; KEISLER, D. H.; ROBERTS, R. M. Different ovine interferon-tau genes are not expressed identically and their protein products display different activities. **Biology Reproduction**, v. 58, p. 566-573, 1998.
- EALY, A. D.; LARSON, S. F.; LIU, L.; WILKELMANN, G. L.; KUBISH, H. M.; BIXBY, J. A.; ROBERTS, R. M. Polymorphic forms of expressed bovine interferon- τ genes: relative transcript abundance during early placental development, promoter sequences of genes and biological activity of protein products. **Endocrinology**, v. 142, p. 2906-2915, 2001.
- EALY, A. D.; WAGNER, S. K.; SHEILS, A. E.; WHITLEY, N. C.; KIESLING, D. O.; JOHNSON, S. E.; BARBATO, G. F. Identification of interferon- τ isoforms expressed by the peri-implantation goat (*Capra hircus*) conceptus. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 27, p. 39-49, 2004.
- EVANS, M. J.; HAMER, J. M.; GASON, L. M.; GRAHAM, C. S.; ASBURY, A. C.; IRVINE, C. H. G. Clearance of bacteria and non-antigenic markers following intra-uterine inoculation into maiden mares: effects of steroid hormone environment. **Theriogenology**, v. 26, n. 1, p. 37-50, 1986.
- FARIN, C. E.; IMAKAWA, K.; ROBERTS, R. M. *In situ* localization of mRNA for the interferon, ovine trophoblast protein-1, during embryonic development of the sheep. **Molecular Endocrinology**, v. 3, p. 1099-1107, 1989.
- FLEMING, J. A.; CHOI, Y.; JOHNSON, G. A.; SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Cloning of the ovine estrogen receptor-alpha promoter and functional regulation by ovine interferon-tau. **Endocrinology**, v. 142, p. 2879-2887, 2001.
- FORD, S. P.; CHRISTENSON, R.K; CHENAULT, J. R. Pattern of blood flow to the uterus and ovaries of ewes during the period of luteal regression. **Journal of Animal Science**, v. 49, p. 1510-1516, 1979.
- FREIRE, A. F. Desenvolvimento de um método de microlavagem para estudo do microambiente uterino em bovinos: efeitos na função luteínica, crescimento folicular e manutenção da prenhez inicial. 123 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- FUCHS, A. R.; BEHRENS, O.; HELMER, H.; LIU, C-H.; BARROS, C. M.; FIELDS, L. J. Oxytocin and vasopressin receptor in bovine endometrium and myometrium during the oestrous cycle and early pregnancy. **Endocrinology**, v. 12, p. 629-636, 1990.

GANDOLFI, F.; BREVINI, S.; MODINA, S.; PASSONI, L. Early embryonic signals: embryo-maternal interactions before implantation. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 269–276. 1992.

GARRETT, J. E.; GEISERT, R. D.; ZAVY, M. T.; MORGAN, G. L. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. **Journal Reproduction Fertility**, v. 84, p. 437–46, 1988.

GEISERT, R. D.; ZAVY, M. T.; BIGGERS, B. G. Effect of heat stress on conceptus and uterine secretion in the bovine. **Theriogenology**, v. 10, p. 82–75, 1988.

GEISERT, R. D.; PRATT, T. N.; BAZER, F. W.; MAYES, J. S.; WATSON, G. H. Immunocytochemical localization and changes in endometrial progesterin receptor protein during the porcine oestrous cycle and early pregnancy. **Reproduction Fertility Development**, v. 6, p. 749-760, 1994.

GERTLER, A.; DJIANE, J. Mechanism of ruminant placental lactogen action: molecular and *in Vivo* studies. **Molecular genetics and metabolism**, v. 63, p. 189–201, 2002.

GUILLOMOT, M.; MICHEL, C.; GAYE, P.; CHARLIER, M.; TROJAN, J.; MARTAL, J. Cellular localization of an embryonic interferon, ovine trophoblastin and its mRNA in sheep embryos during early pregnancy. **Biology Cellular**, v. 68, p. 205-211, 1990.

GUILLOMOT, M. Cellular interactions during implantation in domestic ruminants. **Journal Reproduction Fertility Suppl**, v. 49, p. 39–51. 1995.

GODKIN, J.D.; BAZER, F.W.; ROBERTS, R.M. Ovine trophoblast protein 1, an early secreted blastocyst protein, binds specifically to uterine endometrium and affects protein synthesis. **Endocrinology**, v. 114, p. 120-130, 1984.

GODKIN, K. D.; LIFSEY, B. J.; GILLESPIE, B. E. Characterization of bovine conceptus proteins produced during the peri- and postattachment periods of early pregnancy. **Biology of reproduction**, v. 38, p. 703-711, 1988.

GODKIN, J. D.; SMITH, S. E.; JOHNSON R. D.; DORE, J. J. E. The role of trophoblast interferons in the maintenance of early pregnancy in ruminants. **American Journal Reproduction Immunology**, v. 37, p. 137-143, 1997.

GOOF, A.K. Embryonic signals and survival. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 37, p. 133-139, 2002.

GÖRG, A.; POSTEL, W.; GÜNTHER, S. Electrophoresis. **Proteomics**, v. 9, p. 531–546. 1988.

GÖRG, A.; WEISS, W.; Two-Dimensional Electrophoresis and Identification Methods, em: RABILLOUD, T. (Ed.). **Proteome research**: Berlin, Germany: Springer, 2000. p. 57–106.

GORG, A.; WEISS, W.; DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v. 4, p. 3665-3685, 2004.

HAFEZ, E. S. E. Fisiologia da reprodução. In: HAFEZ, E. S. E.(Ed.). **Reprodução animal**. 7th ed. São Paulo: Ed. Manole, 2004.

HANK, H.W. Infertility in dairy cattle. **Animal Reproduction**, v. 3, p. 19-29, 1979.

HANSEN, P. J.; BAZER, F. W.; SEGERSON, E. C. Skin graft survival in the uterine lumen of ewes treated with progesterone. **American Journal Reproduction Immunology Microbiology**, v. 12, p. 48-54. 1986.

HARDA H.; FUJITA T.; MYIAMOTO M.; KIMURA Y.; MARUYAMA M.; FURIA A.; MIYATA T.; TANIGUCHI T. Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. **Cell**, v. 58, p. 729-739, 1989.

HELMER, S. D.; HANSEN, P. J.; ANTHONY, R. V.; THATCHER, W. W.; BAZER, F. W.; ROBERTS, R. M. Identification of bovine trophoblast protein-1, a secretory protein immunologically related to ovine trophoblast protein-1. **Journal Reproduction Fertility**, v. 79, n. 1, p. 83-91, 1987.

HELMER, S. D.; HANSEN, P. J.; THATCHER, W. W.; JOHNSON, J. W.; BAZER, F. W. Intrauterine infusion of highly enriched bovine trophoblast protein-1 complex exerts an antiluteolytic effect to extend corpus luteum lifespan in cyclic cattle. **Journal Reproduction Fertility**, v. 87, p. 89-101, 1989.

HERNANDEZ-LEDEZMA, J. J.; SIKES, J. D.; MURPHY, C. N.; WATSON, A. J.; SCHULTZ, G. A.; ROBERTS, R. M. Expression of bovine trophoblast interferon in conceptuses derived by in vitro techniques. **Biology Reproduction**, v. 47, p. 374-380, 1992.

HORN, S.; BATHGATE, R.; LIOUTAS, C.; BRACKEN, K.; IVELL, R. Bovine endometrial epithelial cells as a model system to study oxytocin receptor regulation. **Human Reproduction Update**, v. 4, p. 605-614, 1998.

HUMBLLOT, P. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p. 1413-1433, 2001.

HUMBLLOT, P.; DALLA PORTA, M. A. Effect of conceptus removal and intra-uterine administration of conceptus tissue on luteal function in the cow. **Reproduction Nutrition Development**, v. 24, p. 529-541. 1984.

IMAKAWA, K.; ANTHONY, R. V.; KAZEMI, M.; MAROTTI, K. R.; POLITES, H. G.; ROBERTS, R. M. Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophectoderm. **Nature** (London), v. 330, p. 377-379, 1987.

- ISSAQ, H. J. The role of separation science in proteomics research. **Electrophoresis**, v. 22, p. 3629-3638, 2001.
- JENNER, L. J.; PARKINSON, T. J.; LAMMING, G. E. Uterine oxytocin receptors in cyclic and pregnant cows. **Journal Reproduction Fertility**, v. 91, p. 49-58, 1991.
- JOHNSON, G. A.; BURGHARDT, R. C.; BAZER, F. W.; SPENCER, T. E. Osteopontin: roles in implantation and placentation. **Biology Reproduction**, v. 69, p. 1458-1471, 2003
- KALUZ, S.; FISHER, P. A.; KALUZOVA, M.; SHELDRIK, E. L.; FLINT, A. P. F. Structure of an ovine interferon receptor and its expression in endometrium. **Journal Molecular Endocrinology**, v. 17, p. 207-215, 1996.
- KAYSER, J. R.; KIM, J. G.; CERNY, R. L.; VALLET, J. L. Global characterization of porcine intrauterine proteins during early pregnancy. **Reproduction**, v. 132, p. 379-388, 2006.
- KERBLER, T. L.; BUHR, M. M.; JORDAN, L. T.; LESLIE, K. E.; WALTON, J. S. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by conceptus in cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 703-714, 1997.
- KIM, J. J.; FORTIER, M. A. A cell type specificity and protein kinase C dependency on the stimulation of prostaglandin E2 and prostaglandin F2 α production by oxytocin and platelet-activating factor in bovine endometrial cells. **Journal Reproduction Fertility**, v. 103, p. 239-247, 1995.
- KIM, S.; CHOI, Y.; SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Effects of the estrous cycle, pregnancy and interferon t on expression of cyclooxygenase two (COX-2) in ovine endometrium. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 58, p. 1, 2003.
- KIMMINS, S.; MACLAREN, L. A. Oestrous cycle and pregnancy effects on the distribution of estrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. **Placenta**, v. 22, p. 742-748, 2001.
- KUBISCH, H. M.; LARSON, M. A.; ROBERTS, R. M. Relationship between age of blastocyst formation and interferon-tau secretion by in vitro-derived bovine embryos. **Molecular Reproduction Development**, v. 49, p. 254-260, 1998.
- KUNZ, T. L.; GAMBARINI, M. L.; OLIVEIRA FILHO, B. D.; GALINDO, A. D. S. Mortalidade embrionária em bovinos: inter-relações embrião patógeno. **Revista CFMV**, v. 8, p. 26, 27-36, 2002.
- LAFRANCE, M.; GOFF A. K. Control of bovine uterine prostaglandin F2 alpha release *in vitro*. **Biology Reproduction**, v. 42, p.188-193, 1990.

LEAMAN, D. W.; ROBERTS, R. M. Genes for the trophoblast interferons in sheep, goat and musk ox, and distribution of related genes among mammals. **Journal Interferon Research**, v. 12, p. 1-11, 1994.

LEBLANC, S. P.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E.; BATEMAN, K. G.; KEEFE, G. P.; WALTON, J. S.; JOHNSON, W. H. Defining and Diagnosing Postpartum Clinical Endometritis and its Impact on Reproductive Performance in Dairy Cows. **American Dairy Science Association**, v. 85, p. 2223 – 2236, 2002.

LEE, R. S. F.; WHEELER, T. T.; PETERSON, A. J. Large-format, two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis of ovine periimplantation uterine luminal proteins: Identification of aldose reductase, cytoplasmic actin and transferrin as conceptus-synthesized proteins. **Biology Reproduction**, v. 59, p. 743-752, 1998.

LEUNG, S. T.; CHENG, Z.; SHELDRIK, E. L.; DERECKA, K.; FLINT, A. P. F.; WHATES, D. C. The effects of lipopolysaccharide and interleukins -1 α -2 and -6 on oxytocin receptor expression and prostaglandin production in bovine endometrium. **Journal Endocrinology**, v. 168, p. 497-508, 2001.

LI, J.; ROBERTS, R. M. Structure-function relationships in the interferon- τ (IFN- τ) Changes in receptor binding and in antiviral and antiproliferative activities resulting from site-directed mutagenesis performed near the carboxyl terminus. **Journal Biology Chemistry**, v. 269, p. 24826-24833, 1994.

LI, J.; ROBERTS, R. M. Interferon- τ and interferon- α interact with the same receptors in uterine endometrium: use of readily iodinated form of recombinant interferon- τ for binding studies. **Journal Biology Chemistry**, v. 269, p. 13544-13550, 1994.

LIMA, M. C. **Desenvolvimento de uma técnica cirúrgica para o monitoramento do microambiente uterino em bovinos**. 2006. 153 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

LYNETTE, B. C.; BANDURANT, R. H. Immunity to bovine reproductive infections. **Veterinary. Clinical. American. Food Animal. Practice**, v. 17, n. 3, p. 504–583, 2001.

LIU, A; JIN, F.; ZHANG, W.; ZHOU, T.; ZHOU, C.; YAO, W.; QIAN, Y.; HUANG, A. Proteomics Analysis on the alteration of protein expression in the placental villous tissue of early pregnancy loss. **Biology of reproduction**, v. 75. p. 414-420, 2006.

LÓPEZ-GATIUS, F.; SANTOLARIA, P.; YÁÑIZ, J.; RUTTLANT, J.; LÓPEZ-BÉJAR, M. Persistent Ovarian follicles in dairy cows: a therapeutic approach. **Theriogenology**, v. 56, p. 649-659, 2002.

MANN, G. E.; ROBISON, R. S.; WHATES, D. C. The regulation of interferon γ . Production and uterine receptors during early pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, p. 317-328. 1999.

MARINOV, U.; LOVELL, J. E. Cytology of the bovine uterine epithelium during the estrous cycle. **American Journal Veterinary Research**, v. 19, p. 13-29. 1968.

MARTAL, J.; LACROIX, M. C.; LOUDES, C. Trophoblastin, an antiluteolytic protein present in early pregnancy in sheep. **Journal Reproduction Fertility**, v. 56, p. 63-73, 1979.

MARTAL, J.; DEGRYSE, E.; CHARPIGNY, G.; ASSAL, N.; REINAULD, P.; CHARLIER, M.; GAYE, P.; LECOCQ, J. P. Evidence for extended maintenance of the corpus luteum by uterine infusion of a recombinant trophoblast α -interferon (trophoblastin) in sheep. **Journal Endocrinology**, v. 127, p. 5-8, 1990.

MARTIAL, J.; DJIANE, J. The production of chorionic somatomammotrophin in sheep placenta. **Biochemistry Biophysics Research Community**, v. 65, p. 770-778, 1975.

MASLAR, I. A.; POWERS-CRADDOCK P.; ANSBACHER, R. Decidual prolactin production by organ cultures of human endometrium: effects of continuous and intermittent progesterone treatment. **Biology Reproduction**, v. 34, p. 741-750, 1986.

MATHER, E. C. "In vivo" uterine lumen pH values of the bovine. **Theriogenology**, v. 3, p. 113-119, 1975.

MAURER, R.R.; CHENAULT, J.R. Fertilization failure and embryonic mortality in parous and nonparous beef cattle. **Journal Animal Science**, v. 56, p. 1186-1189. 1993.

MCCRACKEN, J. A.; SCHRAMM, W.; OKULICZ, W. C. Hormone receptor control of secretion of PGF $_{2\alpha}$ from ovine uterus during luteolysis and its abrogation in early pregnancy. **Animal Reproduction**, v. 7, p. 31-55, 1984.

MCCRACKEN, J. A.; CUSTER, E. E.; LAMSA, J. C. Luteolysis: a neuroendocrine mediated event. **Physiology Review**, v. 79, n. 2, p. 263-323, 1999.

MEYER, M. D.; HANSEN, P. J.; THATCHER, W. W.; DROST, M.; BADINGA, L.; ROBERTS, R. M.; LI, J.; OTT, T. L.; BAZER, F. W. Extension of corpus luteum lifespan and reduction of uterine secretion of prostaglandin F $_{2\alpha}$ of cows in response to recombinant interferon γ . **Journal Dairy Science**, v. 78, p. 1921-1931, 1995.

MOGENSEN, K. E.; LEWERENZ, M.; REBOUL, J.; LUTFALLA, G.; UZÉ, G. The type I interferon receptor: structure, function and evolution of a family business. **Journal Interferon Cytokine Research**, v. 19, p. 1069, 1999.

MOOR, R. M.; ROWSON, L. E. A. The corpus luteum of the sheep: functional relationship between the embryo and the corpus luteum. **Journal of Endocrinology**, v. 34, p. 233–239, 1996.

MURTHY, G. S.; SCHELLENBERG, C.; FRIESEN, H. G. Purification and characterization of bovine placental lactogen. **Endocrinology**, v. 111, p. 2117–2124, 1982.

NIEMEYER, C.; SIQUEIRA, A. F. P.; GIASSETTI, M. I.; PONTES, E. O.; FEDOZZI, F.; LIMA, M. C.; BERTAN, C. M.; ARRUDA, R. P.; MIGLINO, M. A.; BINELLI, M. Protein profile of uterine washings of cyclic and pregnant cows from Days 14 to 18 post-estrus. **Animal. Reproduction**, v.4, n. 3/4, Jul./Dec, 2007.

OCNO-GROVE, O.M.; COOKE, F. N. T.; ALVAREZ, I. M.; JOHNSON, S. E.; OTT, T. L.; EALY, A. D. Ovine endometrial expression of fibroblast growth factor (FGF) 2 and conceptus expression of FGF receptors during early pregnancy. **Domestic animal endocrinology**, v. 34, p.135-145, 2008.

OTT, T. L.; YIN, J.; WILLEY, A. A.; KIM, H. T.; GERAMI-NAINI, B.; SPENCER, T. E.; BARTOL, F. F.; BURGHARDT, R. C.; BAZER, F. W. Effects of the estrous cycle and early pregnancy on the uterine expression of Mx protein in sheep (*Ovis aries*). **Biology Reproduction**, v. 59, p. 784-794, 1998.

PARKINGTON, H. C. Electrical properties of the costo-uterine muscle of the guinea-pig. **Journal Physiology**, v. 335, p. 15–27, 1983.

PELTIER, M. R.; HANSEN, P. J. Immunoregulatory activity, biochemistry, and phylogeny of ovine uterine serpin. **American Journal Reproduction Immunology**, v. 45, p. 266-272. 2001.

PRIEDKALNS, B. Female reproductive system. In: DELLMANN H. D.; BROWN, E. M. (Ed.). **Textbook of veterinary histology**. Philadelphia: Lea and Febiger, 1976. p. 319-349.

REID, L. E.; BRASNETT, A. H.; GILBERT, C. S.; PORTER, A. C. G.; GEWERT, D. R.; STARK, G. R.; KERR, I. M. A single DNA response element can confer inducibility by both α - and γ -interferons. **Proceeding National Academic Science**, v. 84, p. 840-844, 1989.

ROBERTS, G. P.; PARKER, J. M. Fractionation and comparison of proteins from bovine uterine fluid and bovine allantoic fluid. **Biochemistry. Biophysics. Acta**, v. 446, p. 69-76, 1976

ROBERTS, R. M.; CROSS, J. C.; LEAMAN, D. W. Interferons as hormones of pregnancy. **Endocrinology Review**, v. 13, p. 432-452, 1992.

ROBERTS, R. M.; EALY, A. D.; ALEXENKO, A. P.; HAN, C. S.; EZASHI, T. Trophoblast interferons. **Placenta**, v. 20, p. 259-264, 1999.

- ROBINSON, R. S.; MANN, G. E.; LAMMING, G. E.; WHATES, D. C. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. **Reproduction**, v. 122, p. 965-979, 2001.
- RONCOLLETA, M.; MORANI, E. S. C.; ESPER, C. R.; BARNABE, V. H.; FRANCESCHINI, P. H. Fertility-associated proteins in nelore bull sperm membranes. **Animal Reproduction Science**, v. 91, p. 77-87, 2006.
- SANTOS, J. E. P.; CERRI, R. L. A.; BALLOU, M. A.; HIGGINBOTHAM, G. E.; KIRK, J. H. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of holstein dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 80, p. 31-45, 2004.
- SARTORI, R.; SARTOR-BERGFELT, R.; MERTENS, S. A.; GUENTHER, J. N.; PARRISH, J. J.; WILTBANK, M. C. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal Dairy Science**, v. 85, p. 2803–2812, 2002.
- SAS. SAS/STAT user's guide (release 9.1). Cary, NC: SAS Institute Inc; 2002.
- SCHÄFER-SOMI, S. Cytokines during early pregnancy of mammals: a review. **Animal Reproduction Science**, v. 75, p. 73-94, 2003.
- SEN, G. C.; LENGYEL, P. The interferon system: a bird's eye view of the biochemistry. **Journal Biologic Chemistry**, v. 267, p. 5017, 1992.
- SEOW, G. E.; ONG, S. E.; LIANG, R. C. M.; REN, E. C.; CHAN, L.; OU, K.; CHUNG, M.C.M. Electrophoresis. **Proteomics**, v. 21, p. 1787–1813, 2000.
- SHEMESH M. Production and regulation of progesterone in bovine corpus luteum and placenta in mid and late gestation: a personal review. **Reproduction Fertility Development**, v. 2, p. 129-135. 1990.
- SHOLL, S. A.; ORSINI, M. W.; HITHINS D. J. Estrogen synthesis and metabolism in the hamster blastocyst, uterus, and liver near the time of implantation. **Journal. Steroid Biochemistry**, v. 19, p. 1153, 1983.
- SHIPP, S. A.; SEGERSON, E. C. Endometrial suppressor cells in beef cattle. **Theriogenology**, v. 50, p. 779-791, 1998.
- SILKE, V.; DISKIN, M. G.; KENNY; BOLAND, M. P.; DILLON, P. M. E. E. J. F.; SREENAN, J. M. Extent, pattern and factors associated with late embryonic losses in dairy cows. **Animal reproduction Science**, v. 71, p. 1-12, 2002.
- SIMPSON, R. J.; CONNOLLY, L. M.; EDDER, J. S.; PEREIRA, J. J.; MORITZ, R. L.; REID, G. E. Electrophoresis. **Proteomics**, v. 21, p. 1707–1732, 2000.

SKOPETS, B.; HANSEN, P. J. Identification of predominant proteins in uterine fluids of unilaterally pregnant ewes that inhibit lymphocyte proliferation. **Biology of Reproduction**, v. 49. p. 997-1007, 1993.

SOARES M. The prolactin and growth hormone families: pregnancy-specific hormones/cytokines at the maternal-fetal interface. **Reproduction Biology Endocrinology**, v. 2, p. 51. 2004.

SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BAZER, F. W.; BURGHARDT, R. C. Fetal-maternal interactions during the establishment of pregnancy in ruminants. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON REPRODUCTION IN DOMESTIC RUMINANTS, 7. 2006, Wellington, New Zealand. **Proceedings of the Seventh International Symposium on Reproduction in Domestic Ruminants**, 2006, p. 379-396.

SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. **Reproduction Biology Endocrinology**, v. 2, p. 49, 2004.

SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Temporal and spacial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. **Biology Reproduction**, v. 53, p.1527-1543, 1995.

SPENCER, T. E.; BECKER, W. C.; GEORGE, P.; MIRANDO, M. A.; OGLE, T. F.; BAZER, F. W. Ovine interferon- τ inhibits estrogen receptor up-regulation and estrogen-induced luteolysis in cyclic ewes. **Endocrinology**, v. 136, p. 4932-4944, 1995.

SPENCER, T. E.; OTT, T. L.; BAZER, F.W. Expression of interferon regulatory factors one and two in the ovine endometrium: effects of pregnancy and ovine interferon tau. **Biology Reproduction**, v. 58, p. 1154-1162, 1998.

SREENAN, J. M. Non-surgical embryo transfer in cattle. **Theriogenology**, v. 9, p. 69-83. 1978.

STARK, G. R.; KERR, I. M.; WILLIAMS, B. R.; SILVERMAN, R. H.; SCHREIBER, R. D. How cells respond to interferons. **Annual Review Biochemistry**, v. 67, p. 227, 1998.

STENSBALLE, A.; JENSEN, O. N. Simplified sample preparation method for protein identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry:In-gel digestion on the probe surface. **Proteomics**, v. 1, p. 955-966, 2001.

STEWART, W. E. **The interferon system**. Vienna. New York: Springer-Verlag, 1979.

TEZUKA, N.; ALI, M.; CHWALISZ, K.; GARFIELD, R. E. Changes in the transcripts encoding calcium channel subunits of rat myometrium during pregnancy. **American Journal Physiology**, v. 269, p. C1008—C1017, 1995. (Cell Physiol. 38)

THATCHER, W. W.; BINELLI, M.; BURKE, J.; STAPLES, C.; AMBROSE, J. D.; COELHO, S. Antiluteolytic signals between the conceptus and endometrium. **Theriogenology**, v. 47, p. 131-140, 1997.

THATCHER, W. W.; MACMILLAN, K. L.; HANSEN, P. J. Embryonic losses: cause and prevention. In: FIELDS, M. J.; SANDS, R. S. (Eds.) **Factors affecting calf crop**, Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 135–153.

THATCHER, W. W.; GUZELOGLU, A.; MATTOS, R.; BINELLI, M.; HANSEN, T. R.; PRU, J. K. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 1435-1450, 2001.

THOMAS, P. G. A.; LESLIE, M. V.; HANSEN, P. J. Retinol binding protein is produced by the bovine endometrium and accumulates in uterine secretions in a progesterone-dependent manner. **Animal Reproduction Science**, v. 27, p. 55-66. 1992.

UENO, I.; SAKAL, T.; YAMAOKA, M.; YOSHIDA, R.; TSUGITA, A. Electrophoresis. **Proteomics**, v. 21, p. 1832–1845. 2000.

WARREN, W. C.; LIANG, R.; KRIVI, G. G.; SIEGEL, N. R.; ANTHONY, R. V. Purification and structural characterization of ovine placental lactogen. **Journal Endocrinology**, v. 126, p. 141–149, 1990.

WEISE, D. W.; NEWTON, G. R.; EMESIH, G. C. Effects of day of the estrous cycle or pregnancy on protein secretion by caprine endometrial tissues. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 522-527, 1993.

WHATHES, D. C.; ROBINSON, R. S.; MANN, G. E.; LAMMING, G. E. The establishment of early pregnancy in cows. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 33, p. 279-284, 1998.

WINGFIELD, D. N. S.; RICKEITS, S. W. Results of concurrent bacteriological and cytological examination of the endometrium of the mare. **Journal Reproduction Fertility Suppl**, v. 32, p. 181–185. 1982.

WINKELMANN, G. L.; ROBERTS, R. M.; JAMES PETERSON, A.; ALEXENKO, A. P.; EALY, A. D. Identification of the expressed forms of ovine interferon-tau in the perimplantation conceptus: sequence relationships and comparative biological activities. **Biology Reproduction**, v. 61, p. 1592-1600, 1999.

XIAO, C.; LIU, W. J. M.; SIROIS, J.; GOFF, A. K. Regulation of cyclooxygenase-2 and prostaglandin F synthase gene expression by steroid hormones and interferon- τ in

endometrium of postpartum cows expected to have a short or normal oestrus cycle. **Journal Reproduction Fertility**, v. 97, p. 329-337, 1993.

YATES, J. Eletrophoresis and Proteomics. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 33, p. 1–19. 1998.

YATES, J. Bovine epithelial cells. **Endocrinology**, v. 139, p. 2293-2299, 2001.

YAVAS, Y.; WALTON, J. S. Induction of ovulation in postpartum suckled beef cows: a review. **Theriogenology**, v. 54, p. 1-23, 2000.

ZAVY, M. T. Embryonic mortality in cattle. In: ZAVY, M. T.; GEISERT, R. D. (Ed.). Embryonic mortality in domestic species. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 99–140.

APÊNDICES

Apêndice A - Peso molecular, ponto isoelétrico e frequência de ocorrência de proteínas identificadas em lavados uterinos coletados por sonda de folley (F) ou *post-mortem* (PM) de vacas ciclando (C) ou prenhes (P) 18 dias pós-estro.

ID ^a Proteína	Peso Molecular ^b (kD)	Ponto ^c isoelétrico	FC (n=4)	FP (n=3)	PMC (n=4)	PMP (n=3)
P003	95,80 ±16,70	6,75 ±0,24	0	2	3	0
P015	98,31 ±18,15	6,25 ±0,08	2	2	0	0
P021	97,30 ±18,35	6,01 ±0,07	2	3	0	0
P029	108,32 ±34,63	6,14 ±0,11	0	2	0	0
P044	95,21 ±28,10	7,90 ±0,34	0	2	0	0
P045	94,80 ±27,44	7,22 ±0,25	0	2	0	0
P046	94,75 ±27,50	7,54 ±0,33	0	2	0	0
P049	94,38 ±26,97	7,05 ±0,25	0	2	0	0
P050	95,10 ±15,07	6,57 ±0,11	0	2	0	2
P052	84,25 ±15,74	6,70 ±0,09	0	2	0	3
P053	75,11 ±16,53	6,95 ±0,10	0	2	0	2
P054	88,86 ±12,99	6,76 ±0,08	0	3	0	2
P067	73,18 ± 9,21	6,44 ±0,12	3	3	0	0
P072	82,95 ±10,35	5,83 ±0,06	4	2	0	0
P073	81,14 ±10,18	6,29 ±0,08	2	3	0	2
P076	86,00 ± 8,80	5,87 ±0,06	3	3	0	2
P077	82,18 ± 8,48	5,92 ±0,06	4	3	0	2
P079	79,16 ± 7,16	6,07 ±0,07	4	3	2	2
P084	81,26 ± 8,59	6,23 ±0,07	2	3	0	2
P087	86,76 ±13,81	6,64 ±0,16	2	2	0	0
P088	73,67 ±12,74	3,59 ±0,12	2	2	0	0
P089	72,07 ± 7,42	6,19 ±0,09	3	3	2	2
P091	86,45 ±24,41	3,71 ±0,14	0	2	0	0
P093	85,62 ±24,65	4,42 ±0,38	0	2	0	0
P095	72,59 ±12,22	3,48 ±0,11	2	2	0	0
P101	83,83 ±23,93	6,99 ±0,27	0	2	0	0
P103	83,71 ±23,60	3,77 ±0,36	0	2	0	0
P105	84,65 ±22,65	7,18 ±0,34	0	2	0	0
P111	84,55 ±12,07	5,31 ±0,10	0	2	0	2
P128	71,58 ±10,80	3,50 ±0,09	2	2	0	0
P133	67,85 ± 8,42	3,51 ±0,09	3	2	0	0
P134	70,71 ±10,13	3,84 ±0,10	2	2	0	0
P146	77,93 ±20,36	6,24 ±0,35	0	2	0	0
P151	76,62 ± 7,25	6,22 ±0,12	2	2	2	0
P153	74,19 ± 9,32	6,67 ±0,14	3	2	0	0
P161	78,86 ±10,30	6,07 ±0,15	0	2	0	2
P163	75,26 ±17,56	3,51 ±0,20	0	2	0	0
P168	74,47 ± 9,14	6,05 ±0,10	0	2	0	2
P176	71,33 ± 6,73	6,46 ±0,08	3	2	0	2
P180	66,98 ±11,59	6,65 ±0,21	0	3	0	0

^a identificação da proteína

^b média aritmética ±erro padrão da média do peso molecular relativo de cada proteína

^c média aritmética ±erro padrão da média do ponto isoelétrico de cada proteína

ID ^a Proteína	Peso Molecular ^b (kD)	Ponto ^c isoeletrico	FC (n=4)	FP (n=3)	PMC (n=4)	PMP (n=3)
P181	62,21 ± 9,50	5,65 ± 0,09	2	2	0	0
P186	71,00 ± 16,79	6,47 ± 0,36	0	2	0	0
P209	65,92 ± 7,03	6,14 ± 0,11	3	2	0	0
P213	64,39 ± 14,23	6,31 ± 0,34	0	2	0	0
P223	60,66 ± 5,65	5,72 ± 0,06	3	3	0	0
P231	56,66 ± 5,93	6,22 ± 0,15	2	2	0	0
P232	61,09 ± 12,94	6,31 ± 0,34	0	2	0	0
P234	62,22 ± 6,04	5,78 ± 0,05	2	2	0	2
P240	57,60 ± 6,01	6,08 ± 0,09	2	2	2	0
P243	60,84 ± 7,39	6,15 ± 0,16	2	2	0	0
P250	58,49 ± 11,70	6,24 ± 0,36	0	2	0	0
P253	58,09 ± 10,32	5,75 ± 0,07	0	2	0	0
P257	58,90 ± 8,18	6,41 ± 0,25	0	2	0	0
P270	53,12 ± 3,44	5,88 ± 0,08	4	2	0	2
P288	48,04 ± 6,33	5,27 ± 0,12	0	2	0	0
P297	43,02 ± 3,95	7,27 ± 0,33	0	2	0	0
P302	38,81 ± 6,38	7,77 ± 0,13	0	2	0	0
P304	41,95 ± 3,10	6,67 ± 0,06	0	2	0	0
P306	41,51 ± 3,39	6,47 ± 0,13	0	2	0	0
P307	42,25 ± 1,62	5,13 ± 0,06	0	2	0	0
P310	38,74 ± 0,49	5,65 ± 0,11	0	2	0	0
P317	34,82 ± 1,75	5,63 ± 0,10	0	2	0	0
P322	30,42 ± 1,34	6,11 ± 0,35	0	2	0	0
P326	31,89 ± 1,85	6,54 ± 0,19	0	2	0	2
P328	27,80 ± 4,21	6,48 ± 0,12	0	2	0	0
P329	25,70 ± 7,85	6,86 ± 0,16	0	2	0	0
P330	25,59 ± 2,96	5,47 ± 0,07	2	2	0	0
P335	22,35 ± 8,95	6,10 ± 0,14	0	2	0	0
P347	29,10 ± 0	5,41 ± 0,21	0	2	0	0
P353	24,22 ± 0	8,15 ± 0,23	0	2	0	0
P361	15,25 ± 3,29	5,45 ± 0,21	0	2	0	0
P368	8,66 ± 0	6,58 ± 0,12	0	2	0	0
P369	10,49 ± 0	5,86 ± 0,14	0	2	0	0
P372	8,23 ± 0	5,60 ± 0,18	0	2	0	0
P375	2,12 ± 0	5,37 ± 0,14	0	2	0	0
P380	83,61 ± 2,30	6,26 ± 0,10	2	0	0	0
P388	89,95 ± 20,29	7,01 ± 0,15	2	0	0	0
P389	87,47 ± 20,83	5,11 ± 0,09	2	0	0	0
P390	87,20 ± 20,55	5,18 ± 0,09	2	0	0	0
P391	74,76 ± 12,82	3,77 ± 0,05	3	0	0	0
P398	63,24 ± 14,13	7,67 ± 0,10	3	0	0	2
P400	80,36 ± 18,67	3,58 ± 0,11	2	0	0	0
P405	63,34 ± 9,24	5,44 ± 0,03	3	0	0	0
P406	64,58 ± 6,63	6,30 ± 0,07	2	0	0	2
P408	54,51 ± 6,16	6,47 ± 0,08	2	0	0	0
P411	30,54 ± 4,93	6,46 ± 0,08	2	0	3	2
P412	35,93 ± 2,51	5,16 ± 0,07	2	0	0	0
P413	36,45 ± 1,13	5,54 ± 0,11	2	0	0	0

^a identificação da proteína

^b média aritmética ± erro padrão da média do peso molecular relativo de cada proteína

^c média aritmética ± erro padrão da média do ponto isoeletrico de cada proteína

ID ^a Proteína	Peso Molecular ^b (kD)	Ponto ^c isoeletrico	FC (n=4)	FP (n=3)	PMC (n=4)	PMP (n=3)
P415	33,45 ± 2,68	5,87 ±0,06	2	0	0	0
P418	32,04 ± 2,37	5,18 ±0,07	2	0	0	0
P420	32,10 ± 2,09	8,01 ±0,07	2	0	0	0
P422	27,33 ± 2,61	5,56 ±0,04	3	2	0	0
P426	22,30 ± 4,47	5,59 ±0,07	3	0	0	0
P428	5,038 ± 2,58	8,35 ±0,04	2	0	0	0
P429	4,68 ± 2,19	8,49 ±0,06	2	0	0	0
P430	6,58 ± 0	8,43 ±0,14	2	0	0	0
P431	82,11 ±10,83	6,25 ±0,08	2	0	0	2
P433	19,77 ± 5,21	5,56 ±0,07	2	0	0	0
P435	82,69 ± 2,36	5,99 ±0,09	2	0	0	0
P437	77,54 ± 6,98	6,37 ±0,13	2	0	0	2
P445	110,39 ±35,03	6,58 ±0,18	2	0	0	0
P451	90,39 ±21,58	6,03 ±0,12	2	0	0	0
P452	97,89 ±30,36	6,27 ±0,01	2	0	0	0
P453	97,65 ±30,18	7,05 ±0,17	2	0	0	0
P454	96,16 ±31,53	6,56 ±0,17	2	0	0	0
P456	93,43 ±23,88	7,19 ±0,16	2	0	0	0
P457	84,56 ±24,85	3,45 ±0,04	2	0	0	0
P465	75,24 ±20,74	5,62 ±0,22	2	0	0	0
P466	70,44 ±13,49	6,73 ±0,10	2	0	0	0
P479	37,53 ±2,92	5,49 ±0,21	2	0	0	0
P480	35,93 ±1,85	5,70 ±0,11	3	0	0	0
P481	31,31 ±6,93	5,94 ±0,16	2	0	0	0
P482	34,62 ±2,23	6,21 ±0,20	2	0	0	0
P483	33,69 ± 0,11	7,72 ±0,01	2	0	0	0
P484	31,21 ± 0,41	6,24 ±0,04	2	0	0	0
P486	29,87 ± 0,34	5,09 ±0,26	2	0	0	0
P488	31,13 ± 3,28	5,51 ±0,13	2	0	0	0
P495	11,69 ± 0,32	7,23 ±0,33	2	0	0	0
P500	18,04 ± 1,21	5,59 ±0,12	3	0	0	0
P504	12,44 ± 9,48	5,37 ±0,18	3	0	0	0
P506	12,72 ± 0,87	5,11 ±0,10	3	0	0	0
P507	12,08 ± 1,04	5,28 ±0,10	3	0	0	0
P510		5,76 ±0,45	2	0	0	0
P529	82,26 ±21,61	5,63 ±0,02	2	0	0	0
P532	51,69 ± 1,40	5,68 ±0,05	2	0	0	0
P535	42,70 ± 0,23	5,40 ±0,15	2	0	0	0
P549	31,90 ± 0,17	5,70 ±0,13	2	0	0	0
P561	18,07 ± 1,02	7,20 ±0,17	2	0	0	0
P564	14,13 ± 4,28	5,35 ±0,04	2	0	0	0
P566	11,57 ± 1,12	7,00 ±0,13	2	0	0	0
P570	8,04 ± 0	5,98 ±0,00	2	0	0	0
P573	4,90 ± 0,48	8,14 ±0,08	2	2	0	0
P591	82,69 ± 2,30	6,14 ±0,08	2	0	0	0
P609	85,71 ±15,70	6,99 ±0,11	3	0	0	0

^a identificação da proteína

^b média aritmética ±erro padrão da media do peso molecular relativo de cada proteína

^c média aritmética ±erro padrão da media do ponto isoeletrico de cada proteína

ID ^a Proteína	Peso Molecular ^b (kD)	Ponto ^c isoeletrico	FC (n=4)	FP (n=3)	PMC (n=4)	PMP (n=3)
P614	68,18 ± 2,33	4,99 ±0,02	2	0	0	0
P616	68,34 ± 2,60	4,75 ±0,07	2	0	0	0
P626	63,17 ± 1,54	5,04 ±0,00	2	0	0	0
P627	63,09 ± 1,46	5,12 ±0,00	2	0	0	0
P630	71,29 ± 6,94	6,36 ±0,10	3	2	0	2
P648	47,16 ± 6,17	4,04 ±0,33	2	0	0	0
P658	32,56 ± 2,11	6,79 ±0,15	2	0	0	0
P659	35,47 ± 3,06	5,45 ±0,08	3	0	0	0
P683	59,68 ± 0,26	6,38 ±0,24	0	2	0	0
P697	34,09 ± 0,22	6,79 ±0,21	0	2	0	0
P705	30,51 ± 1,95	5,51 ±0,05	0	2	0	0
P712	20,09 ± 1,34	5,35 ±0,11	0	2	0	0
P718	5,58 ± 0,88	7,39 ±0,10	0	2	0	0
P737	43,49 ± 3,02	6,64 ±0,24	0	2	2	0
P764	14,92 ± 4,20	6,22 ±0,11	0	2	0	0
P769	4,42 ± 0	8,52 ±0,11	0	2	0	0
P774	77,53 ±12,75	6,28 ±0,08	0	0	2	2
P778		6,95 ±0,11	0	0	2	0
P780	64,23 ±11,45	6,02 ±0,03	0	0	2	2
P782	31,34 ± 4,08	5,68 ±0,26	0	0	2	0
P785	7,60 ± 0,22	6,62 ±0,01	0	0	2	0
P795	94,91 ±24,23	5,79 ±0,05	0	0	0	2
P806	70,93 ±12,99	6,07 ±0,17	0	0	2	0
P810	49,00 ± 0,88	5,56 ±0,17	2	0	0	0
P812	45,87 ±15,60	5,27 ±0,07	0	0	2	0
P815	19,24 ± 0,70	7,89 ±0,17	0	0	2	0
P820	6,57 ± 2,75	5,79 ±0,09	0	0	2	0
P823	71,94 ± 1,36	7,59 ±0,14	0	0	2	0
P824	81,03 ±14,79	7,29 ±0,08	0	0	2	2
P826	50,40 ± 7,65	6,00 ±0,13	0	0	2	0
P827	76,54 ±16,21	6,36 ±0,03	0	0	0	2
P834	35,51 ± 8,74	5,53 ±0,27	0	0	2	0
P838	31,20 ± 8,64	5,74 ±0,17	0	0	2	0
P841	30,35 ± 0	5,21 ±0,17	0	0	2	0
P855	18,04 ± 0	5,37 ±0,19	0	0	2	0
P876	4,08 ± 0	7,22 ±0,23	0	0	2	0
P890	58,04 ±14,95	7,90 ±0,11	0	0	0	2
P907	72,23 ±14,56	6,20 ±0,00	0	0	0	2
P925	28,58 ±14,29	7,20 ±0,04	0	0	0	2
P932	25,42 ±13,64	7,05 ±0,05	0	0	0	2
P936	21,02 ±13,94	6,55 ±0,09	0	0	0	2
P942	17,35 ±14,31	6,45 ±0,07	0	0	0	2
P969	98,69 ±25,87	7,40 ±0,02	0	0	0	2
P977	19, 80 ±5,57	7,24 ±0,03	0	0	0	3

^a identificação da proteína

^b média aritmética ±erro padrão da media do peso molecular relativo de cada proteína

^c média aritmética ±erro padrão da media do ponto isoeletrico de cada proteína

Apêndice B - Média aritmética ($\pm$ erro padrão da média) do volume normalizado de proteínas presentes em lavados uterinos coletados por sonda de Folley (F) ou Post-mortem (PM) de animais cíclicos (C) ou prenhes (P) no dia 18 pós-estro.

ID Proteína ^a	Média ($\pm$ EPM) do volume normalizado			
	FC	FP	PMC	PMP
P003	0,00 $\pm$ 0,00	0,21 $\pm$ 0,11	0,32 $\pm$ 0,15	0,00 $\pm$ 0,00
P015	0,01 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,07	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
P021	0,05 $\pm$ 0,04	0,02 $\pm$ 0,01	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
P029	0,00 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,01	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
P044	0,00 $\pm$ 0,00	0,30 $\pm$ 0,15	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
P045	0,00 $\pm$ 0,00	0,28 $\pm$ 0,16	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
P046	0,00 $\pm$ 0,00	0,26 $\pm$ 0,20	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
P049	0,00 $\pm$ 0,00	0,42 $\pm$ 0,25	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
P050	0,00 $\pm$ 0,00	0,29 $\pm$ 0,20	0,00 $\pm$ 0,00	0,62 $\pm$ 0,34
P052	0,00 $\pm$ 0,00	0,36 $\pm$ 0,20	0,00 $\pm$ 0,00	0,87 $\pm$ 0,32
P053	0,00 $\pm$ 0,00	0,41 $\pm$ 0,23	0,00 $\pm$ 0,00	0,82 $\pm$ 0,55
P054	0,00 $\pm$ 0,00	0,47 $\pm$ 0,26	0,00 $\pm$ 0,00	1,06 $\pm$ 0,54
P067	6,32 $\pm$ 5,67	1,25 $\pm$ 0,96	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
P072	0,60 $\pm$ 0,21	0,77 $\pm$ 0,49	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
P073	2,95 $\pm$ 1,83	2,90 $\pm$ 0,80	0,00 $\pm$ 0,00	0,86 $\pm$ 0,85
P076	0,67 $\pm$ 0,46	1,17 $\pm$ 0,62	0,00 $\pm$ 0,00	0,61 $\pm$ 0,37
P077	1,44 $\pm$ 0,34	1,35 $\pm$ 0,47	0,00 $\pm$ 0,00	0,76 $\pm$ 0,39
P079	3,97 $\pm$ 0,31	2,41 $\pm$ 0,77	0,42 $\pm$ 0,34	1,47 $\pm$ 0,88
P084	3,75 $\pm$ 2,91	4,29 $\pm$ 1,41	0,00 $\pm$ 0,00	6,86 $\pm$ 3,68
P087	0,36 $\pm$ 0,35	0,02 $\pm$ 0,01	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
P088	0,06 $\pm$ 0,04	0,10 $\pm$ 0,05	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
P089	4,77 $\pm$ 1,98	4,85 $\pm$ 1,52	0,17 $\pm$ 0,10	3,96 $\pm$ 2,20
P091	0,00 $\pm$ 0,00	0,07 $\pm$ 0,04	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
P093	0,00 $\pm$ 0,00	0,12 $\pm$ 0,12	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
P095	0,07 $\pm$ 0,04	0,08 $\pm$ 0,06	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
P101	0,00 $\pm$ 0,00	0,04 $\pm$ 0,04	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
P103	0,00 $\pm$ 0,00	0,25 $\pm$ 0,17	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
P105	0,00 $\pm$ 0,00	0,16 $\pm$ 0,09	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
P111	0,00 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,11	0,00 $\pm$ 0,00	0,20 $\pm$ 0,16
P128	0,11 $\pm$ 0,06	0,15 $\pm$ 0,10	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
P133	0,08 $\pm$ 0,05	0,10 $\pm$ 0,07	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
P134	0,15 $\pm$ 0,09	0,08 $\pm$ 0,07	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
P146	0,00 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,02	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
P151	0,29 $\pm$ 0,18	0,07 $\pm$ 0,04	0,11 $\pm$ 0,08	0,00 $\pm$ 0,00
P153	0,17 $\pm$ 0,12	0,05 $\pm$ 0,04	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
P161	0,00 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,01	0,00 $\pm$ 0,00	0,09 $\pm$ 0,08
P163	0,00 $\pm$ 0,00	0,07 $\pm$ 0,04	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
P168	0,00 $\pm$ 0,00	0,30 $\pm$ 0,16	0,00 $\pm$ 0,00	0,41 $\pm$ 0,32
P176	0,79 $\pm$ 0,43	0,29 $\pm$ 0,21	0,00 $\pm$ 0,00	0,13 $\pm$ 0,08
P180	0,00 $\pm$ 0,00	0,33 $\pm$ 0,28	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
P181	0,05 $\pm$ 0,04	0,08 $\pm$ 0,06	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
P186	0,00 $\pm$ 0,00	1,28 $\pm$ 1,25	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
P209	1,51 $\pm$ 0,90	3,73 $\pm$ 2,24	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
P213	0,00 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,04	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
P223	1,70 $\pm$ 1,23	2,37 $\pm$ 2,19	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00

^a identificação da proteína

ID Proteína ^a	Média (±EPM) do volume normalizado			
	FC	FP	PMC	PMP
P231	0,03 ±0,02	0,33 ±0,31	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P232	0,00 ±0,00	0,18 ±0,15	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P234	0,30 ±0,17	0,08 ±0,05	0,00 ±0,00	0,21 ±0,19
P240	0,32 ±0,31	0,06 ±0,03	0,14 ±0,10	0,00 ±0,00
P243	0,03 ±0,02	0,30 ±0,15	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P250	0,00 ±0,00	0,27 ±0,26	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P253	0,00 ±0,00	0,06 ±0,03	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P257	0,00 ±0,00	0,08 ±0,06	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P270	0,23 ±0,08	0,17 ±0,08	0,00 ±0,00	0,44 ±0,36
P288	0,00 ±0,00	0,02 ±0,01	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P297	0,00 ±0,00	0,07 ±0,05	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P302	0,00 ±0,00	0,08 ±0,05	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P304	0,00 ±0,00	0,06 ±0,03	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P306	0,00 ±0,00	0,07 ±0,04	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P307	0,00 ±0,00	0,16 ±0,15	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P310	0,00 ±0,00	0,06 ±0,03	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P317	0,00 ±0,00	0,14 ±0,10	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P322	0,00 ±0,00	0,31 ±0,26	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P326	0,00 ±0,00	1,56 ±1,26	0,00 ±0,00	0,31 ±0,16
P328	0,00 ±0,00	0,31 ±0,26	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P329	0,00 ±0,00	0,30 ±0,26	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P330	0,84 ±0,72	0,41 ±0,41	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P335	0,00 ±0,00	2,28 ±2,04	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P347	0,00 ±0,00	0,45 ±0,31	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P353	0,00 ±0,00	0,08 ±0,05	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P361	0,00 ±0,00	0,06 ±0,01	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P368	0,00 ±0,00	0,15 ±0,09	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P369	0,00 ±0,00	0,03 ±0,02	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P372	0,00 ±0,00	0,05 ±0,03	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P375	0,00 ±0,00	0,05 ±0,03	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P380	0,02 ±0,01	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P388	0,61 ±0,36	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P389	0,06 ±0,04	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P390	0,06 ±0,04	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P391	0,09 ±0,04	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P398	0,10 ±0,06	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,13 ±0,08
P400	0,02 ±0,01	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P405	0,07 ±0,04	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P406	0,03 ±0,02	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,24 ±0,16
P408	0,07 ±0,06	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P411	0,03 ±0,02	0,00 ±0,00	1,67 ±1,46	0,91 ±0,48
P412	0,04 ±0,04	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P413	0,05 ±0,03	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P415	0,31 ±0,24	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P418	0,06 ±0,05	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P420	0,49 ±0,30	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00

^a identificação da proteína

ID Proteína ^a	Média (±EPM) do volume normalizado			
	FC	FP	PMC	PMP
P422	0,34 ±0,22	0,02 ±0,01	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P426	0,10 ±0,05	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P428	0,34 ±0,21	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P429	0,41 ±0,36	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P430	0,18 ±0,16	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P431	0,05 ±0,03	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,44 ±0,22
P433	0,02 ±0,02	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P435	0,01 ±0,01	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P437	0,01 ±0,01	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,47 ±0,38
P445	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P451	0,08 ±0,03	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P452	0,07 ±0,04	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P453	0,19 ±0,18	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P454	0,01 ±0,01	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P456	0,09 ±0,09	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P457	0,13 ±0,10	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P465	0,08 ±0,08	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P466	0,03 ±0,02	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P479	0,04 ±0,03	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P480	0,11 ±0,06	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P481	0,15 ±0,09	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P482	0,38 ±0,37	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P483	0,06 ±0,05	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P484	2,36 ±2,34	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P486	0,08 ±0,07	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P488	0,14 ±0,14	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P495	0,10 ±0,07	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P500	0,27 ±0,15	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P504	0,13 ±0,06	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P506	0,16 ±0,11	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P507	0,50 ±0,26	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P510	0,30 ±0,20	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P529	0,15 ±0,11	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P532	0,09 ±0,06	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P535	0,06 ±0,04	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P549	0,07 ±0,05	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P561	0,05 ±0,03	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P564	0,26 ±0,21	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P566	0,03 ±0,02	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P570	0,02 ±0,01	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P573	1,36 ±1,20	0,98 ±0,92	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P591	0,01 ±0,01	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P609	0,26 ±0,14	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P614	0,04 ±0,04	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P616	0,16 ±0,10	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P626	0,18 ±0,12	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P627	0,06 ±0,05	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00

^a identificação da proteína

ID Proteína ^a	Média (±EPM) do volume normalizado			
	FC	FP	PMC	PMP
P630	0,27 ±0,21	0,05 ±0,03	0,00 ±0,00	0,31 ±0,30
P648	0,03 ±0,02	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P658	0,49 ±0,30	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P659	0,24 ±0,13	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P683	0,00 ±0,00	0,06 ±0,05	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P697	0,00 ±0,00	0,44 ±0,43	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P705	0,00 ±0,00	0,38 ±0,32	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P712	0,00 ±0,00	0,12 ±0,08	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P718	0,00 ±0,00	0,09 ±0,05	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P737	0,00 ±0,00	0,22 ±0,13	1,08 ±0,41	0,00 ±0,00
P764	0,00 ±0,00	0,10 ±0,05	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P769	0,00 ±0,00	0,12 ±0,07	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P774	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,29 ±0,17	0,27 ±0,26
P778	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,23 ±0,17	0,00 ±0,00
P780	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,46 ±0,35	0,06 ±0,04
P782	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,33 ±0,31	0,00 ±0,00
P785	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	3,08 ±1,78	0,00 ±0,00
P795	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,48 ±0,40
P806	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,11 ±0,06	0,00 ±0,00
P810	0,10 ±0,06	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
P812	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,15 ±0,13	0,00 ±0,00
P815	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,40 ±0,35	0,00 ±0,00
P820	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,07 ±0,04	0,00 ±0,00
P823	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,22 ±0,14	0,00 ±0,00
P824	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,24 ±0,16	1,03 ±0,56
P826	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,23 ±0,19	0,00 ±0,00
P827	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,12 ±0,06
P834	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,26 ±0,22	0,00 ±0,00
P838	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,42 ±0,39	0,00 ±0,00
P841	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,09 ±0,08	0,00 ±0,00
P855	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,04 ±0,02	0,00 ±0,00
P876	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,26 ±0,19	0,00 ±0,00
P890	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,16 ±0,09
P907	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,38 ±0,19
P925	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,19 ±0,13
P932	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,12 ±0,09
P936	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	4,05 ±4,03
P942	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,51 ±0,40
P969	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,56 ±0,40
P977	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	0,43 ±0,25

^a identificação da proteína

Apêndice C - Análise de variância do volume normalizado de proteínas presentes em lavados uterinos coletados por sonda de *Folley* ou *Post-mortem* (efeito de tipo de lavado) de animais cíclicos ou gestantes (efeito de estado) no dia 18 pós-estro.

ID Proteína ^a	P < F		
	Estado	Lavado	Lavado x Estado
P003	0,60	0,60	0,02
P015	0,10	0,06	0,10
P021	0,60	0,20	0,60
P029	0,10	0,10	0,10
P044	0,04	0,04	0,04
P045	0,07	0,07	0,07
P046	0,15	0,15	0,15
P049	0,08	0,08	0,08
P050	0,02	0,3	0,30
P052	0,01	0,14	0,14
P053	0,03	0,4	0,40
P054	0,01	0,3	0,30
P067	0,47	0,29	0,47
P072	0,73	0,02	0,73
P073	0,74	0,06	0,71
P076	0,20	0,16	0,90
P077	0,33	0,01	0,22
P079	0,66	0,01	0,04
P084	0,15	0,81	0,21
P087	0,43	0,38	0,43
P088	0,49	0,03	0,49
P089	0,26	0,12	0,28
P091	0,07	0,07	0,07
P093	0,23	0,23	0,23
P095	0,83	0,06	0,83
P101	0,17	0,17	0,17
P103	0,11	0,11	0,11
P105	0,05	0,05	0,05
P111	0,07	0,68	0,68
P128	0,67	0,04	0,67
P133	0,82	0,06	0,82
P134	0,57	0,08	0,57
P146	0,18	0,18	0,18
P151	0,20	0,33	0,68
P153	0,41	0,15	0,41
P161	0,15	0,3	0,30
P163	0,04	0,04	0,04
P168	0,04	0,7	0,70
P176	0,51	0,11	0,28
P180	0,19	0,19	0,19
P181	0,57	0,07	0,57
P186	0,25	0,25	0,25
P209	0,33	0,04	0,33
P213	0,06	0,06	0,06

^a Identificação da proteína

ID Proteína ^a	P < F		
	Estado	Lavado	Lavado x Estado
P223	0,78	0,11	0,78
P231	0,27	0,19	0,27
P232	0,19	0,19	0,19
P234	0,97	0,53	0,14
P240	0,32	0,55	0,75
P243	0,06	0,03	0,06
P250	0,24	0,24	0,24
P253	0,05	0,05	0,05
P257	0,13	0,13	0,13
P270	0,26	0,89	0,16
P288	0,07	0,07	0,07
P297	0,16	0,16	0,16
P302	0,12	0,12	0,12
P304	0,05	0,05	0,05
P306	0,07	0,07	0,07
P307	0,25	0,25	0,25
P310	0,04	0,04	0,04
P317	0,15	0,15	0,15
P322	0,18	0,18	0,18
P326	0,11	0,27	0,27
P328	0,18	0,18	0,18
P329	0,21	0,21	0,21
P330	0,65	0,2	0,65
P335	0,21	0,21	0,21
P347	0,11	0,11	0,11
P353	0,07	0,07	0,07
P361	0,01	0,01	0,01
P368	0,07	0,07	0,07
P369	0,05	0,05	0,05
P372	0,12	0,12	0,12
P375	0,11	0,11	0,11
P380	0,27	0,27	0,27
P388	0,18	0,18	0,18
P389	0,29	0,29	0,29
P390	0,22	0,22	0,22
P391	0,12	0,12	0,12
P398	0,72	0,72	0,04
P400	0,19	0,19	0,19
P405	0,19	0,19	0,19
P406	0,16	0,16	0,08
P408	0,38	0,38	0,38
P411	0,66	0,18	0,69
P412	0,41	0,41	0,41
P413	0,18	0,18	0,18
P415	0,31	0,31	0,31
P418	0,33	0,33	0,33
P420	0,20	0,20	0,20

^a Identificação da proteína

ID Proteína ^a	P < F		
	Estado	Lavado	Lavado x Estado
P422	0,24	0,19	0,24
P426	0,16	0,16	0,16
P428	0,19	0,19	0,19
P429	0,36	0,36	0,36
P430	0,36	0,36	0,36
P431	0,07	0,07	0,03
P433	0,22	0,22	0,22
P435	0,24	0,24	0,24
P437	0,19	0,19	0,16
P445	0,38	0,38	0,38
P451	0,07	0,07	0,07
P452	0,21	0,21	0,21
P453	0,39	0,39	0,39
P454	0,21	0,21	0,21
P456	0,38	0,38	0,38
P457	0,27	0,27	0,27
P465	0,40	0,40	0,40
P466	0,27	0,27	0,27
P479	0,23	0,23	0,23
P480	0,15	0,15	0,15
P481	0,18	0,18	0,18
P482	0,41	0,41	0,41
P483	0,38	0,38	0,38
P484	0,41	0,41	0,41
P486	0,36	0,36	0,36
P488	0,39	0,39	0,39
P495	0,27	0,27	0,27
P500	0,17	0,17	0,17
P504	0,09	0,09	0,09
P506	0,23	0,23	0,23
P507	0,14	0,14	0,14
P510	0,23	0,23	0,23
P529	0,27	0,27	0,27
P532	0,22	0,22	0,22
P535	0,31	0,31	0,31
P549	0,28	0,28	0,28
P561	0,19	0,19	0,19
P564	0,32	0,32	0,32
P566	0,22	0,22	0,22
P570	0,21	0,21	0,21
P573	0,82	0,18	0,82
P591	0,23	0,23	0,23
P609	0,15	0,15	0,15
P614	0,36	0,36	0,36
P616	0,19	0,19	0,19
P626	0,23	0,23	0,23

^a Identificação da proteína

ID Proteína ^a	P < F		
	Estado	Lavado	Lavado x Estado
P627	0,28	0,28	0,28
P630	0,82	0,96	0,17
P648	0,25	0,25	0,25
P658	0,19	0,19	0,19
P659	0,16	0,16	0,16
P683	0,16	0,16	0,16
P697	0,25	0,25	0,25
P705	0,19	0,19	0,19
P712	0,12	0,12	0,12
P718	0,04	0,04	0,04
P737	0,11	0,11	0,03
P764	0,04	0,04	0,04
P769	0,06	0,06	0,06
P774	0,95	0,08	0,95
P778	0,28	0,28	0,28
P780	0,35	0,24	0,35
P782	0,39	0,39	0,39
P785	0,17	0,17	0,17
P795	0,18	0,18	0,18
P806	0,17	0,17	0,17
P810	0,19	0,19	0,19
P812	0,35	0,35	0,35
P815	0,35	0,35	0,35
P820	0,18	0,18	0,18
P823	0,24	0,24	0,24
P824	0,15	0,03	0,15
P826	0,34	0,34	0,34
P827	0,05	0,05	0,05
P834	0,35	0,35	0,35
P838	0,38	0,38	0,38
P841	0,35	0,35	0,35
P855	0,18	0,18	0,18
P876	0,28	0,28	0,28
P890	0,07	0,07	0,07
P907	0,04	0,04	0,04
P925	0,10	0,10	0,10
P932	0,14	0,14	0,14
P936	0,26	0,26	0,26
P942	0,16	0,16	0,16
P969	0,12	0,12	0,12
P977	0,07	0,07	0,07

^a Identificação da proteína