JULIANA NASCIMENTO

**Perfil do RNAm da proteína transportadora de prostaglandina (PGT) no
endométrio equino *in vivo* e sobre influência embrionária *in vitro***

**São Paulo
2011**

JULIANA NASCIMENTO

**Perfil do RNAm da proteína transportadora de prostaglandina (PGT) no
endométrio equino *in vivo* e sobre influência embrionária *in vitro***

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

Departamento

Reprodução Animal

Área de Concentração

Reprodução Animal

Orientador

Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda

São Paulo

2011

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.2405
FMVZ

Nascimento, Juliana

Perfil do RNAm da proteína transportadora de prostaglandina (PGT) no endométrio equino *in vivo* e sobre influência embrionária *in vitro* / Juliana Nascimento. -- 2011.

93 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda.

1. Égua. 2. Endometrio. 3. Proteína. 4. Prostaglandina. 5. Embrião.
I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Influência de fatores embrionários na secreção de PGF2a e PGE2 e expressão de PGT no endométrio eqüino em diestro", protocolado sob o nº1296/2008, utilizando 10 (dez) cavalos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, 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 "ad referendum".

We certify that the Research "Influence of embryonic factors in PGF2a and PGE2 release and expression of PGT in equine endometrium in diestrous", protocol number 1296/2008, utilizing 10 (ten) horses, under the responsibility Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved "ad referendum" of the meeting.

São Paulo, 20 de março de 2008

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Juliana Nascimento

Título: Perfil do RNAm da proteína transportadora de prostaglandina (PGT) no endométrio equino *in vivo* e sobre influência embrionária *in vitro*.

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Dedico ao meu marido, Maurício

Dedico ao meu Tio Dé, *in memoriam*

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido, Maurício José Bittar, pelo companheirismo, paciência e amor dedicados durante meu doutorado.

À minha mãe Ana Alcina e minha tia Bia, que sempre priorizaram meus estudos e crescimento profissional.

À tia Rita e Dona Cida Bittar, sempre muito carinhosas e acolhedoras em minhas pousadas em Pirassununga.

À minha sogra, Dayse, meu sogro Assed, cunhadas Nana e Jô e cunhados Sérgio e Fábio, que torceram pelo meu sucesso e acompanharam todas as dificuldades para terminar este trabalho.

Ao companheiro de pós-graduação e amigo André Furugen Cesar de Andrade, pela amizade, risadas, pelo incentivo à pesquisa e avaliação estatística do experimento.

À companheira de pós-graduação e amiga Guta Alonso, pela paixão compartilhada por reprodução equina e cavalos em geral, pelo empréstimo das éguas e grande ajuda no meu experimento.

Aos antigos e novos colegas de pós-graduação e também grandes amigos Daniela Silva, Andres Mejia, Fabiane Zaffalon, José Rodrigo Pimentel, Patrícia Miguez, Milton Maturama, Aline Kehrle, Lindsay Gimenes, Fernando Mesquita, pela torcida ao êxito do trabalho, amizade, companheirismo e risadas.

Ao Prof. Mário Bineli, que me estimulou, nos ajudou na elaboração do projeto de pesquisa e nos deu apoio técnico em momentos de decisão.

À Prof. Cláudia Bertan Membrive, pelo apoio técnico nos trabalhos laboratoriais iniciais e finais da pesquisa e pelo carinhoso acolhimento em sua casa em Dracena, nos trabalhos iniciais. Aos seus filhos Carolina e Ângelo, sempre muito educados e carinhosos durante minha estadia em Dracena.

Aos outros professores e ao Departamento de Reprodução Animal (VRA) da FMVZ/USP, pelo voto de confiança e respeito ao meu trabalho, em especial aos professores Anneliese de Souza Traldi e Ed Hoffmann Madureira, dos quais tive o prazer de maior convivência durante o doutorado.

À secretária da pós graduação do VRA, Harumi Shiraishi, sempre solícita em me ajudar nos pontos burocráticos do doutorado.

Ao professor Heidge Fukumasu, pela essencial participação durante os trabalhos laboratoriais, pelos ensinamentos e estímulo à pesquisa molecular e pela paciência oriental.

Ao professor Flávio Meirelles e pós graduandos do Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD), pelo apoio técnico e amizade estabelecida durante minha passagem pelo laboratório.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologias em Reprodução Animal (CBRA), Clayton, Márcio, João e José Maria, sempre atenciosos e prestativos.

Aos funcionários do Setor de Equideocultura do Campus de Pirassununga, Valdir e Maico, pelo excelente convívio, ajuda e trabalho com amor aos cavalos.

À Deus, por proporcionar tamanho aprendizado e crescimentos profissional e pessoal em minha vida, durante meu doutorado.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço especialmente meu orientador de doutorado, Prof. Rubens Paes de Arruda, não somente pelos ensinamentos técnicos e de amor à medicina veterinária, mas também, e não menos importante e presente na minha vida, pelos ensinamentos de vida, de amizade, dedicação e companheirismo.

Dentre os vários ensinamentos, este inconscientemente me acompanhou até o doutorado e passou a ser consciente após uma conversa com meu orientador, que me fez o seguinte desenho para ilustrar seu ensinamento:

Obrigada, Professor!...

RESUMO

NASCIMENTO, J. **Perfil do RNAm da proteína transportadora de prostaglandina (PGT) no endométrio eqüino *in vivo* e sobre influência embrionária *in vitro***. [mRNA to PGT profile in the equine endometrium *in vivo*, and under embryonic influence *in vitro*]. 2011. 93 f. Tese. (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Nas éguas cíclicas, a luteólise ocorre entre os dias 14 e 16 após ovulação, pela ação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial. Entretanto, durante a gestação, a luteólise deve ser bloqueada, ao mesmo passo que a ação da PGE_2 deve ser estimulada. Ambos hormônios possuem baixa difusão pela membrana plasmática, sendo necessária a presença da proteína transportadora de prostaglandina (PGT) para o influxo e efluxo destes hormônios nas células. Os objetivos deste experimento foram identificar e relacionar o RNAm da PGT no endométrio de éguas cíclica e gestante aos 14 dias (experimento 1) e avaliar o perfil do RNAm para PGT no endométrio eqüino em final de diestro sob efeito de secreção embrionária (experimento 2). Para o experimento 1, um ciclo estral de 11 éguas foi acompanhado. Seis éguas não foram inseminadas e somente detectado o tempo de ovulação e cinco foram inseminadas. Biópsias endometriais foram realizadas quando detectado folículo pré-ovulatório ($\geq 35\text{mm}$ de diâmetro) e edema endometrial (E_0 ; $n=6$), sete (E_7 ; $n=6$) e quatorze (E_{14} ; $n=6$) dias após ovulação nas fêmeas cíclicas e aos quatorze dias de gestação (E_G ; $n=4$) nas fêmeas gestantes. No experimento 2, 5 embriões eqüinos de 13,5 dias de idade foram coletados, cultivados por 24 horas em ambiente com temperatura e CO_2 controlados e o meio condicionado embrionário (MCEE) gerado foi armazenado a -80°C . Em seguida, amostras endometriais de sete éguas cíclicas aos 14 dias pós ovulação foram coletadas por biópsia uterina e cultivadas por 24 horas, em ambiente com temperatura e CO_2 controlados, na presença do MCEE. O RNA total foi extraído de todas as amostras endometriais e amplificado pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), de um passo. A abundância relativa média dos transcritos foi submetida a análise de variância e as médias foram separadas pelo teste LSD ($P<0,05$). No experimento 1, o RNAm da PGT em tecido equino foi identificado, de maneira que as quantidades relativas deste gene foram similares entre E_0 , E_7 , E_{14} e E_G . No experimento 2, o MCEE não modificou a quantidade de RNAm para PGT no endométrio em fase final do diestro.

Palavras-chave: Égua. Endométrio. Proteína. Prostaglandina. Embrião.

ABSTRACT

NASCIMENTO, J. **mRNA to PGT profile in the equine endometrium *in vivo*, and under embryonic influence *in vitro***. [Perfil do RNAm da proteína transportadora de prostaglandina (PGT) no endométrio eqüino *in vivo* e sobre influência embrionária *in vitro*]. 2011. 93 f. Tese. (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

In cyclic mares, luteolysis occurs between the 14th and 16th days after ovulation, due to endometrial PGF_{2α}. However, in pregnant mares luteolysis must be blocked, whereas the PGE₂ action must be stimulated. Both hormones have low diffusion through the plasma membrane, wherein the Prostaglandin Transporter Protein (PGT) is needed to influx and efflux of these hormones in the cells. The objectives of this experiment are to identify and to relate with the mRNA to PGT in the endometrium of cyclic and pregnant mares (experiment 1) and to evaluate the mRNA profile to PGT in equine endometrium at end of diestrus, under embryonic secretion effect (experiment 2). In the experiment 1, one estrous cycle of 11 mares (5 to 12 years old) was examined. Six mares were not inseminated and only the time of ovulation was recorded, and five mares were inseminated. Endometrial biopsies were performed when pre-ovulatory follicles (diameter ≥ 35 mm) and endometrial edema were detected (E₀; n=6), seven (E₇; n=6) and fourteen days (E₁₄; n=6) after ovulation in cyclic mares, and fourteen days after ovulation in pregnant mares (E_G; n=4). In the experiment 2, five embryos of 13,5 days of age were collected, cultured during 24 hours in controlled temperature and CO₂ and the embryonic conditioned medium (ECM) was stored at -80°C. After that, endometrium samples of 7 mares at fourteen days after ovulation were collected by uterine biopsy and they were cultured during 24 hours, in controlled temperature and CO₂, with ECM. Total RNA was extracted and submitted to amplification by one step real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). The abundance relative average of transcripts was submitted to variance analysis and averages were separated by LSD test (P<0,05). In the experiment 1 the mRNA to equine PGT was identified so that the relative quantities of this gene were equal among E₀, E₇, E₁₄ e E_G. In the experiment 2, the ECM did not modify the mRNA quantity to PGT in the endometrium at end of diestrus.

Keywords: Mare. Endometrium. Protein. Prostaglandin. Embryo

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Biossíntese das prostaglandinas $F_{2\alpha}$ e E_2 . COX-2: cicloxigenase 2. PGH_2 : prostaglandina H_2 . PGFS: prostaglandina F sintetase. PGES: prostaglandina E sintetase. 9K-PGR: 9-ceto-prostaglandina E_2 redutase.....30
- Figura 2 - Diluições em série de *primer* para reação em cadeia de polimerização em tempo real (RT-PCR) para a proteína transportadora de prostaglandina (PGT) equina...47
- Figura 3 - Diluições em série de amostra de RNAm de tecido equino48
- Figura 4 - Sonda endotraqueal para cavalos (diâmetro interno de 22 mm). A: formato original. B: formato adaptada para coleta de embrião equino de 13,5 dias, com diminuição do comprimento do balonete utilizando linha de pesca, retirada da ponta em bisel da extremidade traqueal e retirada da porção azul da extremidade oral.....51
- Figura 5 - Gel de agarose 1% e brometo de etídio, com amostras de tecidos eqüinos (poços 3 a 25). 2 e 15: marcador de peso molecular. 3 a 8: no período de estro. 9 a 14: sete dias após ovulação. 16 a 21: 14 dias após ovulação. 22 a 25: aos 14 dias de gestação. 26: amostra pulmonar. 27: tecido hepático. 28: tecido renal. A amostra do poço 26 possui imagem sugestiva de degradação do RNA (seta branca)..... 60
- Figura 6 - Curvas de dissociação de produtos de RNAm em endométrio eqüino. A: produtos de gene endógeno 18S. B: produtos de proteína transportadora de prostaglandina (PGT)61
- Figura 7 - Curvas de amplificação dos genes 18S (primeiro grupo de curvas) e PGT (Proteína Transportadora de Prostaglandina, segundo grupo de curvas) em tecidos endometriais, hepático e renal equinos62
- Figura 8 - Perfil de RNAm para a proteína PGT no endométrio de éguas cíclicas, na presença de folículo pré-ovulatório e edema uterino (E_0), sete dias após ovulação (E_7) e quatorze dias após ovulação (E_{14}) e no endométrio de éguas com 14 dias de gestação (E_G). Não foi observada diferença estatística entre os grupos ($P=0,36$).64
- Figura 9 - Células de tecido embrionário equino com 14,5 dias de idade, corados com HOECHST 33342 ($10\mu\text{g/mL}$) e iodeto de propídio ($125\mu\text{g/mL}$) após 24 horas de incubação a 37°C e 5% de CO_2 . Células coradas em azul apresentam membrana

plasmática intacta. Células coradas em vermelho apresentam membrana	
plasmática lesada	68

Figura 10 - Perfil do RNAm para proteína transportadora de prostaglandina (PGT) em	
endométrio de éguas aos 14 dias após ovulação, cultivado com meio condicionado	
embrionário eqüino (MCEE) ou Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM).	
Não foi observada diferença estatística entre os grupos ($P=0,44$).....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados obtidos da quantificação de RNA total em tecidos eqüinos, avaliados em espectrofotometria (NanoDrop 2000C, Thermo Scientific®)	59
Tabela 2 - Valores de CT e $2^{-\Delta\Delta CT}$ para gene codificador da proteína PGT equina, resultantes de RT-PCR de amostras teciduais endometriais, coletadas <i>in vivo</i>	63
Tabela 3 - Diâmetro (mm) de vesícula embrionária intrauterina aos 13,5 dias de idade, em éguas, medido com auxílio de ultrassonografia.....	67
Tabela 4 - Concentração de progesterona (P4) sérica em éguas cíclicas aos 14 dias após ovulação	68
Tabela 5 - Identificação por números de amostras endometriais de 6 éguas aos 14 dias após ovulação, cultivadas em duplicatas com meio <i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i> (IMDM) ou meio condicionado embrionário equino (MCEE), quantificação de RNA total e relação A_{260}/A_{280}	70
Tabela 6 - Valores de CT e $2^{-\Delta\Delta CT}$ para gene codificador da proteína PGT equina, resultantes de RT-PCR de amostras teciduais endometriais cultivadas com meio condicionado embrionário eqüino (MCEE) ou <i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i> (IMDM).....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	microgramas
µL	microlitros
°	grau
°C	grau Celsius
%	porcento
9k-PGR	enzima 9-ceto-PGE ₂ redutase
ANOVA	análise de variância
C9	carbono 9
C11	carbono 11
C.L.	corpo lúteo
cDNA	ácido desoxirribonucléico codificado
cm ²	centímetro quadrado
COX-2	cicloxigenase 2
E ₀	endométrio em estro
E ₇	endométrio 7 dias após ovulação
E ₁₄	endométrio 14 dias após ovulação
E _G	endométrio com 14 dias de gestação
END	tecido endometrial
FIG	tecido hepático
FSH	hormônio folículo estimulante
g	gravidade
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofinas
H ₂ O	água
H ₂ O _{dd}	água bidestilada e deionizada
hCG	gonadotrofinacoriônica humana

IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IFN τ	proteína interferon τ
LH	hormônio luteinizante
LSD	least square difference
mA	miliampere
MCEE	meio condicionado embrionário eqüino
MCEnd	meio condicionado endometrial
MHz	megaheartz
Mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
mm ²	milímetro quadrado
ng	nanograma
nm	nanômetro
OATP	transportadores de ânions orgânicos
P	probabilidade
Pb	pares de base
PGDH	desidrogenase de 15-hidroxi-prostaglandina
PGF _{2α}	prostaglandina F2 α
PGFS	prostaglandina F sintetase
PGE ₂	prostaglandina E2
PGES	prostaglandina E sintetase
PGH ₂	prostaglandina H2
PGHS	prostaglandina G sintetase
PGR	redutase de prostaglandina
PGT	proteína transportadora de prostaglandina
PLA ₂	fosfolipase A ₂

RNA	ácido ribonucléico
RNA _m	ácido ribonucléico mensageiro
RT-PCR	reação em cadeia de polimerização em tempo real
SAS	statistical analysis system
SLCO2A1	transportador de ânions orgânicos, membro 2A1
V	voltz
UI	unidades internacionais

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	OBJETIVOS.....	23
3	HIPÓTESES	25
4	REVISÃO DE LITERATURA	27
4.1	<i>CICLO ESTRAL E ENDOCRINOLOGIA REPRODUTIVA DA FÊMEA EQUINA</i>	27
4.2	<i>COMPOSIÇÃO, BIOSÍNTESE E METABOLIZAÇÃO DAS PROSTAGLANDINAS F E E.....</i>	29
4.3	<i>RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO</i>	30
4.4	<i>O EMBRIÃO EQUINO – DA FERTILIZAÇÃO ATÉ O RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO.....</i>	35
4.5	<i>PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE PROSTAGLANDINA (PGT).....</i>	36
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
5.1	EXPERIMENTO 1: IDENTIFICAÇÃO DO RNA _m DA PGT NO ENDOMÉTRIO EQUINO CÍCLICO E GESTANTE.....	40
5.1.1	<i>Animais, manejo alimentar e sanitário.....</i>	40
5.1.2	<i>Acompanhamento do ciclo estral e inseminação artificial.....</i>	40
5.1.3	<i>Coleta e armazenamento das amostras endometriais</i>	41
5.1.4	<i>Avaliação histopatológica endometrial.....</i>	42
5.1.5	<i>Coleta e armazenamento de tecidos pulmonar, hepático e renal equinos.....</i>	43
5.1.6	<i>Extração de RNA total dos tecidos endometriais</i>	43
5.1.7	<i>Quantificação do RNA total e armazenamento dos extratos endometriais</i>	44
5.1.8	<i>Verificação da qualidade de RNA pelo perfil de corrida em gel de agarose 1%</i>	45
5.1.9	<i>Elaboração dos primers para PGT equina.....</i>	45
5.1.10	<i>Teste da eficiência dos primers para PGT equina.....</i>	46

5.1.11	<i>Preparação dos extratos de RNA total e RT-PCR para RNAm da PGT equina</i>	48
5.2	EXPERIMENTO 2: INFLUÊNCIA DE FATORES EMBRIONÁRIOS EQUINOS NA EXPRESSÃO DE PGT E NA SECREÇÃO DE PGF2 α DO ENDOMÉTRIO EQUINO EM FINAL DE DIESTRO	50
5.2.1	<i>Produção de meio condicionado embrionário equino (MCEE)</i>	50
5.2.1.1	<i>Acompanhamento do ciclo estral e inseminação artificial</i>	50
5.2.1.2	<i>Diagnóstico de gestação e coleta do embrião</i>	50
5.2.1.3	<i>Manipulação e cultivo do embrião equino de 13,5 dias de idade</i>	51
5.2.1.4	<i>Recuperação e armazenamento do MCEE</i>	52
5.2.1.5	<i>Avaliação da integridade das membranas plasmáticas embrionárias após cultivo de 24 horas</i>	52
5.2.2	<i>Produção de meio condicionado endometrial equino (MCEnd)</i>	53
5.2.2.1	<i>Acompanhamento do ciclo estral e coleta endometrial de éguas em final de diestro</i>	53
5.2.2.2	<i>Coleta das amostras endometriais em final de diestro</i>	53
5.2.2.3	<i>Coleta, processamento e dosagem de P4 de sangue venoso das éguas doadoras de endométrio em diestro</i>	54
5.2.2.4	<i>Processamento e cultivo endometriais</i>	54
5.2.2.5	<i>Recuperação e armazenamento do MCEnd e amostras endometriais cultivadas</i>	55
5.2.1.6	<i>Extração, quantificação e avaliação da qualidade do RNAm das amostras endometriais cultivadas em MCEE</i>	55
5.2.1.7	<i>RT-PCR para RNAm da PGT equina em endométrio equino em diestro cultivado com meio condicionado embrionário equino</i>	55
5.2.1.8	<i>Análise Estatística</i>	56
6.1	EXPERIMENTO 1: IDENTIFICAÇÃO DO RNAm DA PGT NO ENDOMÉTRIO EQUINO CÍCLICO E GESTANTE	58
6.1.1	<i>Avaliação histopatológica das amostras endometriais</i>	58

6.1.2	<i>Quantificação e verificação da qualidade de RNA total das amostras experimentais</i>	58
6.1.4	<i>Dados gerados na RT-PCR para PGT equina em tecido endometrial, hepático e renal</i>	61
6.2	EXPERIMENTO 2: INFLUÊNCIA DE FATORES EMBRIONÁRIOS	
	<i>EQUINOS NA EXPRESSÃO DE PGT E NA SECREÇÃO DE PGF2α</i>	66
6.2.1	<i>Coleta de embrião eqüino com 13,5 dias de idade</i>	66
6.2.2	<i>Avaliação da integridade das membranas plasmáticas embrionárias após 24 horas de cultivo</i>	67
6.2.3	<i>Dosagens de progesterona sérica das éguas doadoras de endométrio em luteólise</i>	68
6.2.4	<i>Quantificação e verificação da qualidade de RNA total das amostras endometriais cultivadas in vitro</i>	69
6.2.5	<i>Dados gerados na RT-PCR para PGT equina em endométrio cultivado in vitro</i>	71
7	CONCLUSÕES	88
	REFERÊNCIAS	77
	ANEXO A - PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES PARA A ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE COM BROMETO DE ETÍDIO	89
	ANEXO B - FORMULAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO ISCOVE'S MODIFIED DULBECCO'S MEDIUM (IMDM)	92

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Nos animais de produção, a presença do embrião no ambiente uterino é fator determinante para a manutenção do corpo lúteo primário funcional e, conseqüentemente, o impedimento do retorno da ciclicidade da fêmea e a manutenção da gestação. Para tanto, acredita-se que complexos mecanismos de interação materno-embrião ocorram na fêmea gestante, durante o período que corresponderia à luteólise nas fêmeas não gestantes, chamados unificadamente de “reconhecimento materno da gestação”.

Entretanto, o conhecimento dos processos fisiológicos envolvidos no reconhecimento materno na espécie equina ainda é pequeno, quando comparado ao bovino, ovino, caprino e suíno.

Tal fato prejudica a criação equina, à medida que o desconhecimento dos detalhes fisiológicos das interações materno-embriônicas, na espécie, limita as possibilidades de intervenções preventivas de possíveis perdas embriônicas, oriundas de deficiências nestas interações.

Dentre as concretas informações sobre este evento, tem-se que, em éguas, como nas outras espécies mamíferas de produção, a prostaglandina $F_{2\alpha}$, de origem endometrial, é considerada fator de determinação da regressão funcional e/ou estrutural do corpo lúteo, sendo que a luteólise nos equinos ocorre por volta de 14 dias após ovulação. Dessa forma, nas éguas gestantes, neste mesmo período, a prostaglandina $F_{2\alpha}$ deve ser impedida de induzir a luteólise, para que haja a continuidade da gestação.

Porém, enquanto que nas fêmeas ruminantes esta forma de impedimento da luteólise é realizada através do bloqueio da produção da prostaglandina $F_{2\alpha}$ endometrial pelo embrião, é possível detectar concentrações de $PGF_{2\alpha}$ no lúmen uterino de éguas gestantes aos 14 dias, inclusive sendo parte dela produzida pelo próprio embrião, mas não no plasma sanguíneo destas mesmas fêmeas.

A constatação da presença de $PGF_{2\alpha}$ no lúmen uterino gestante aos 14 dias indica que o bloqueio da luteólise durante a gestação inicial na espécie equina não é devido à cessação da produção local deste hormônio, como ocorre nas fêmeas ruminantes, e sim, possivelmente, pelo impedimento da passagem deste hormônio para o sistema circulatório, impedindo assim, o alcance do hormônio luteolítico ao corpo lúteo.

Considerando a hipótese acima, para se conhecer a dinâmica da $\text{PGF}_{2\alpha}$ na égua gestante, primeiramente é necessário entender o mecanismo de transporte da prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ uterina para a corrente circulatória na égua cíclica.

Em geral, para que as prostaglandinas possam exercer suas funções endócrinas, precisam ser liberadas do citosol de suas células produtoras; no entanto, em pH fisiológico, as prostaglandinas possuem baixo coeficiente de permeabilidade na membrana plasmática. Como consequência, os transportes celular e compartimental destas prostaglandinas são facilitados pelas proteínas transportadoras de prostaglandinas (PGT).

Além disso, outra característica peculiar da gestação inicial da égua é a necessidade de uma vesícula embrionária esférica, produtora de prostaglandina E_2 e móvel por todo o lúmen uterino, para que ocorra o reconhecimento materno da gestação. Se, por algum motivo, o embrião equino cessar a movimentação por rolamento no lúmen uterino no período do reconhecimento da gestação, ocorrerá a luteólise e conseqüente perda embrionária.

Analisando as informações acima descritas, é aparente a importância da vesícula embrionária para a manutenção da gestação equina, mas ainda não se conhece satisfatoriamente os mecanismos para tanto. É possível que existam substâncias de origem embrionária que interfiram na produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial, ou mesmo que interfiram na passagem da $\text{PGF}_{2\alpha}$ intrauterina para o sistema circulatório, pela diminuição e/ou inibição da presença de PGTs nas células endometriais.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste experimento são:

1. Identificar o RNAm para a proteína transportadora de prostaglandina – PGT em tecido eqüino,
2. Avaliar o perfil de RNAm para PGT no endométrio eqüino não gestante e gestante,
3. Avaliar o perfil do RNAm para PGT no endométrio eqüino no final do diestro, na presença de moléculas de origem embrionária (embrião de 13,5 dias de idade).

3 HIPÓTESES

3 HIPÓTESES

Considerando a literatura disponível referente ao assunto, as hipóteses para os objetivos desta pesquisa são:

1. É possível identificar o RNAm para PGT em tecido eqüino, utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase, em tempo real (RT-PCR),
2. A quantidade relativa de RNAm para PGT é maior no endométrio eqüino em diestro que em estro,
3. A quantidade relativa de RNAm para PGT é maior no endométrio cíclico, aos 14 dias após ovulação, que no endométrio gestante, no mesmo período,
4. O meio de cultivo embrionário eqüino diminui a quantidade relativa de RNAm para PGT no endométrio eqüino em final do diestro.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 CICLO ESTRAL E ENDOCRINOLOGIA REPRODUTIVA DA FÊMEA EQUINA

Durante o período reprodutivo, a duração média de um ciclo estral na égua é de 21 dias, sendo este subdividido nos períodos de estro, cuja duração média é de 7 dias, e diestro, com aproximadamente 14 dias (HUGHES et al., 1971).

No estro, período em que a égua é receptiva ao garanhão, o sistema reprodutor está sob efeito do hormônio estrógeno, produzido fundamentalmente pelo folículo dominante (GINTHER et al., 2003).

O hormônio folículo estimulante (FSH) é responsável pelo recrutamento e desenvolvimento dos folículos da onda folicular, sendo que a concentração plasmática do hormônio varia dentro do ciclo estral da égua, de maneira que, com o desvio folicular e o aparecimento e desenvolvimento do folículo dominante, as concentrações diminuem progressivamente, alcançando menores valores 1 a 2 dias antes da ovulação (GINTHER et al., 2005a).

Já o perfil plasmático do hormônio luteinizante (LH) na égua cíclica difere do perfil de liberação em pico, observado em outras espécies (PETERS et al., 1994), pois na fêmea equina a concentração de LH aumenta gradualmente durante o desenvolvimento folicular (GINTHER et al., 2005a), alcançando pico 1 a 2 dias após a ovulação (GINTHER et al., 2005b). Assim, têm-se duas funções fundamentais do hormônio LH no período do estro na égua: (1) a clássica função da ovulação e também (2) o auxílio no desenvolvimento do folículo dominante, além do efeito luteotrófico (SAINT-DIZIER et al., 2003). Os eventos desencadeados pelo aumento da concentração de LH no folículo dominante, que culminam com a ruptura desta estrutura, nos mamíferos, em geral, são: ativação de enzimas proteolíticas, aumento da concentração de ocitocina, catecolaminas, histamina, noradrenalina, PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$, prostaciclina e glicosaminoglicanos (PIERSON, 1992).

Há evidências da importância e necessidade do estradiol na indução do aumento na secreção de LH durante o estro, para a ruptura do folículo e conseqüente ovulação (NETT, 1992). Esta influência estrogênica na ovulação ocorre pelo aumento da secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo (IRVINE; ALEXANDER, 1987) e pelo

aumento do número de receptores para GnRH na hipófise anterior, aumentando, assim a sensibilidade para a produção do LH pela glândula (SILVIA et al., 1986).

A ovulação na fêmea equina ocorre 24 a 48 horas antes do término do estro (HUGHES et al., 1971), sendo observado aumento considerável na concentração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e PGE_2 no fluido folicular do folículo dominante na iminência da ovulação (SIROIS; DORÉ, 1997).

Passados 24 a 48 horas da ovulação há a formação do corpo lúteo, glândula produtora de progesterona, que, já neste momento, alcança concentrações plasmáticas de 1ng/mL (GINTHER et al., 2005b). Este corpo lúteo mantém-se funcional na fêmea não gestante por volta de 14 dias, caracterizando o período de diestro do ciclo estral (DAELS; HUGHES, 1992).

Para que a fêmea não gestante possa retornar ao estro e recomeçar uma nova tentativa de fertilização é necessária a regressão funcional e/ou estrutural do corpo lúteo (BOERBOOM et al., 2004). Dessa forma, no final de diestro, em torno do 14º e 15º dia de ciclo estral, a $\text{PGF}_{2\alpha}$, de origem endometrial (IRVINE; EVANS, 1979), causa diminuição significativa na concentração de progesterona plasmática, caracterizando a regressão funcional do corpo lúteo (DOUGLAS; GINTHER, 1972; STARBUCK et al., 1998).

O mecanismo de ação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ sob a luteólise na égua cíclica ainda é pouco entendido; mas sabe-se que a liberação deste hormônio luteolítico endometrial é ocitocina-dependente (SHARP et al., 1997; STARBUCK et al., 1998) e de maneira temporal, pois a aplicação de ocitocina exógena causou maior aumento na concentração plasmática de metabólitos da $\text{PGF}_{2\alpha}$ somente aos 14 dias após ovulação (STARBUCK et al., 1998). Fortalecendo esta informação da influência temporal da ocitocina na luteólise equina, Starbuck et al. (1998) ainda encontraram maior quantidade de receptores de ocitocina no endométrio eqüino cíclico aos 14 dias após ovulação, quando comparado com o mesmo tecido aos 10 e 18 dias após ovulação.

Al-zi'abi et al. (2002) encontraram diminuição da massa (em gramas) do corpo lúteo entre os dias 14 e 17 após ovulação, enquanto que a regressão funcional, ou seja, a diminuição da concentração plasmática de progesterona foi observada entre os dias 10 e 14 após ovulação. Os autores concluem a existência do processo de apoptose do corpo lúteo como forma de regressão estrutural.

4.2 COMPOSIÇÃO, BIOSÍNTESE E METABOLIZAÇÃO DAS PROSTAGLANDINAS F E E

As prostaglandinas são ácidos graxos de 20 átomos de carbono, cuja estrutura básica contém um anel de ciclopentano e duas cadeias laterais. Todas as prostaglandinas possuem um grupo hidroxila no carbono 15 e uma ligação dupla no carbono 13. As PGEs são caracterizadas por ter um grupo hidroxila no C11 e um grupo ceto no C9, ao passo que as PGFs possuem grupos hidroxila tanto em C11 quanto em C9 (BARREIRO, 1987).

A síntese destas prostaglandinas (Figura 1) ocorre a partir da hidrólise do ácido aracdônico, presente na membrana plasmática, mediante enzima fosfolipase A₂ (BARREIRO, 1987). O ácido aracdônico é transformado em PGH₂, um endoperóxido instável, pela ação da enzima PGHS (prostaglandina G sintetase), também denominada de cicloxigenase 2 ou COX-2 (BOERBOOM et al., 2004). A PGH₂, então, é rapidamente convertida a compostos mais estáveis, as prostaglandinas, pelas PG sintetases (CROFFORD, 2001). Para a produção de PGF_{2α} tem-se PGF sintetase (PGFS); para PGE₂ tem-se PGE sintetase (PGES). Na presença da enzima 9-ceto-PGE₂ redutase (9k-PGR), a PGE₂ pode ser transformada em PGF_{2α} (ASSELIN; FOTIER, 2000).

As prostaglandinas F e E exercem funções (sinalizações moleculares) autócrina, parácrina e intrácrina através da proteína G acoplada a receptores, denominados EF e EP, respectivamente (ZHU et al., 2006).

Figura 1 - Biossíntese das prostaglandinas $F_{2\alpha}$ e E_2 . COX-2: cicloxigenase 2. PGH_2 : prostaglandina H_2 . PGFS: prostaglandina F sintetase. PGES: prostaglandina E sintetase. 9K-PGR: 9-ceto-prostaglandina E_2 redutase

O catabolismo dos prostanóides ocorre por oxidação, reduzindo significativamente sua atividade biológica. A principal via catabólica envolve um sistema enzimático, largamente distribuído, denominado desidrogenase de 15-hidroxi-prostaglandina (PGDH), e uma enzima, também solúvel, denominada redutase de prostaglandina (PGR), presentes intracelularmente (BARREIRO, 1987).

4.3 RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO

O início da gestação nas espécies domésticas é marcado por eventos neuro-endócrino-moleculares que implicam na continuação ou não da prenhez. O evento crítico para a

manutenção da gestação, conhecida como reconhecimento materno da gestação, é a prevenção da luteólise e conseqüente manutenção do corpo lúteo (McDOWELL et al., 1988). Niermeyer et al. (2007) propõem que é necessário uma relação ótima entre moléculas de origem uterina e moléculas de origem embrionária para o sucesso do estabelecimento e manutenção da gestação. O conceito deve, de alguma forma, anular o processo de luteólise (BOERBOOM et al., 2004). Nas éguas o reconhecimento materno da gestação ocorre entre os dias 14 e 16 após ovulação (SHARP et al., 1984).

Nos ruminantes, o processo de reconhecimento materno requer que moléculas secretadas pelo conceito interajam com o endométrio uterino e promovam uma reprogramação da síntese de proteínas no tecido endometrial, impedindo a secreção pulsátil de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e a luteólise. Para tanto, o conceito bovino, no início da sua fase de implantação, alonga-se por todo o lúmen uterino (SPENCER et al., 2004).

No entanto, a vesícula embrionária equina permanece esférica durante a gestação inicial e revestida por uma camada de glicocálix (cápsula embrionária), que lhe proporciona a característica anti-adesiva (ALBIHN et al., 2003). Esta cápsula é fundamental para que ocorra o deslocamento embrionário por todo o lúmen uterino, já que nesta espécie também é importante que o conceito mantenha contato com todo o endométrio. Esta mobilidade embrionária ocorre durante os dias 7 e 17 da gestação, sendo que o maior deslocamento ocorre entre os dias 12 e 14 após ovulação (GINTHER, 1985; STOUT; ALLEN, 2001), concomitantemente ao período de maior produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio de égua não gestante (STOUT; ALLEN, 2002), característica da fase luteolítica do ciclo estral.

McDowell et al. (1988) restringiram a movimentação embrionária, em éguas, pela ligadura cirúrgica do corno uterino no qual localizava-se a vesícula embrionária e observaram que o impedimento do contato direto entre embrião e a porção remanescente do lúmen uterino resulta numa completa ou parcial luteólise. Parece, então, que a presença de um embrião móvel no lúmen uterino durante a fase crítica da gestação inicial é importante para evitar o processo de luteólise que ocorreria naturalmente.

Entre os animais domésticos, a luteólise e o reconhecimento materno são mais estudados e elucidados nas espécies bovina, ovina e suína. Nas fêmeas ruminantes domésticas a luteólise inicia-se no final do diestro, quando a ocitocina presente na glândula pituitária posterior é liberada em alta amplitude e frequência, enquanto a concentração de receptores de ocitocina no endométrio aumenta. Este hormônio pituitário, suplementado por ocitocina oriunda do corpo lúteo, estimula a liberação pulsátil de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio (WATHES;

LAMMING, 1995). Esta $\text{PGF}_{2\alpha}$, por sua vez, transportada para o ovário pela veia uterovariana (GINTHER, 1981), liga-se a seus respectivos receptores nas células luteais, iniciando o processo de luteólise. Nas fêmeas gestantes, o conceito secreta a proteína interferon τ (IFN τ), que previne o aumento na concentração dos receptores endometriais de ocitocina (SPENCER; BAZER, 1996), impedindo a luteólise.

Semelhante às fêmeas ruminantes, para a manutenção da gestação na espécie suína é fundamental a presença de C.L. funcional durante todo o período gestacional. Dessa forma, é importante o bloqueio endométrio-embrionário da luteólise para que a progesterona seja mantida em concentrações séricas entre 10 e 40ng/mL durante a gestação (CHADIO et al., 2002).

Nas porcas cíclicas, o aumento na concentração sérica da $\text{PGF}_{2\alpha}$ inicia-se 11 dias após a ovulação, resultando na completa luteólise em torno de 14 dias após a ovulação (ANTONINI et al., 1976).

O modelo de liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio em suínos também é em resposta à presença da ocitocina, como nos ruminantes, porém esta ocitocina possui origem pituitária, e não ovariana (KOTWICA et al., 1990). A capacidade do útero em secretar $\text{PGF}_{2\alpha}$ na presença de ocitocina ocorre 11 a 14 dias após o estro (EDGERTON et al., 1996), período coincidente com a luteólise nas porcas cíclicas. Este estímulo da produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pela ocitocina ocorre de maneira aguda, sendo possível detectar $\text{PGF}_{2\alpha}$ no lúmen uterino após 2 minutos da aplicação intravenosa de ocitocina em porcas cíclicas (KIEBORZ et al., 1991). No entanto esta resposta ocorre de maneira espacial, oposta ao descrito para vacas, ovelhas e cabras. Enquanto nas fêmeas ruminantes são as células endometriais epiteliais as responsáveis pela liberação da $\text{PGF}_{2\alpha}$, estimuladas pela ocitocina (ASSELIN et al., 1996), nas porcas, a ocitocina induz resposta máxima das células endometriais estromais e glandulares (ZANG et al., 1991; BLACKWELL et al., 2003), mas não estimula a secreção da $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelas células endometriais epiteliais luminais (BLACKWELL et al., 2003).

Ainda, há a produção de ocitocina pela hipófise posterior, induzida pela $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial em porcas cíclicas no período referente à luteólise (KOTWICA et al., 1990), o que leva a pensar num sistema de retro-alimentação positiva entre $\text{PGF}_{2\alpha}$ e ocitocina no período de luteólise nestas fêmeas (SILVIA; EDGERTON, 1999).

Nas porcas gestantes é necessário que este mecanismo de luteólise via $\text{PGF}_{2\alpha}$ circulante seja evitado para a manutenção do C.L. e da progesterona sérica, e conseqüente

manutenção da gestação, principalmente nas primeiras 4 a 5 semanas (HEAP; DEANESLY, 1966).

Confirmando a necessidade do bloqueio da $\text{PGF}_{2\alpha}$ circulante na porca gestante, Antonini et al. (1976) demonstraram que, diferentemente das porcas cíclicas, a concentração sérica de $\text{PGF}_{2\alpha}$ não aumenta nas fêmeas gestantes após 11 dias da ovulação.

Porém, Zavy et al. (1980) além de detectarem $\text{PGF}_{2\alpha}$ em lavados uterinos de porcas gestantes, encontraram que a concentração deste hormônio no lúmen uterino nas fêmeas gestantes é 48,8 vezes maior que nas fêmeas vazias.

Bazer e Thacther (1977) propuseram que no final do diestro, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ produzida pelo endométrio suíno não gestante é secretada e direcionada para a vasculatura uterina, enquanto que este mesmo prostanóide secretado pelo endométrio suíno gestante é direcionado para o lúmen uterino, impedindo que ocorra a luteólise.

Porém, para Poyser (1984), a $\text{PGF}_{2\alpha}$ produzida pelo endométrio gestante não atinge a corrente circulatória por ser produzida em baixas quantidades, pois o autor encontrou que na porca cíclica a concentração intrauterina de $\text{PGF}_{2\alpha}$ aumenta 28 vezes entre o sétimo e o décimo quinto dia após ovulação, enquanto que na fêmea gestante este mesmo hormônio, durante o mesmo período, aumenta somente 4 a 5 vezes.

Quanto ao embrião suíno na idade referente ao período em que ocorreria a luteólise, sabe-se que é caracterizado por intensa atividade secretória protéica (ASWORTH et al., 1996), incluindo interferon - γ (tipo I e II), distinto do produzido pelo embrião bovino (LA BONNARDIERE et al., 1991), porém Harney e Bazer (1989) afirmam não haver função antiluteolítica destas proteínas na espécie suína.

Ao passo que o hormônio 17- β estradiol, produzido pelo blastocisto (ASWORTH et al., 1996) e pelo endométrio (FRANCZAK; KOTWICA, 2008) suínos, parece participar do desenvolvimento do próprio embrião (ASWORTH et al., 1996) e da manutenção do corpo lúteo funcional (FRANCZAK; KOTWICA, 2008) durante a gestação na espécie. Interessantemente, a produção uterina deste hormônio durante a gestação é de origem endometrial, enquanto que durante luteólise na porca não gestante é de origem miometrial (FRANCZAK; KOTWICA, 2008).

Por outro lado, o embrião eqüino não secreta IFN τ como os ruminantes (SHARP et al., 1989; BAKER et al., 1991), os receptores endometriais de ocitocina não diminuem (SHARP et al., 1997), nem mesmo há estímulo de liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ com a administração exógena de ocitocina durante gestação inicial (GOFF et al., 1987; SHARP et al., 1997). Nas

éguas também há a diminuição da estimulação da produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pela ocitocina durante gestação inicial, mas diferentemente das fêmeas bovinas e ovinas, o número de receptores de ocitocina (GOFF et al., 1987) e a expressão gênica destes receptores (KLEIN et al., 2010) permanece elevado na gestação, durante o período esperado da luteólise.

No entanto, ocorre diminuição das concentrações de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no lavado uterino de éguas com 14 dias de gestação, comparado a fêmeas no mesmo período de diestro, sem fertilização (WATSON; SERTICH, 1989). Segundo Boerboom et al. (2004) e Ealy et al. (2010), tal fato pode ocorrer devido à diminuição da expressão do RNAm da COX-2 e à diminuição da quantidade da enzima encontradas pelos autores no endométrio gestante aos 14 e 15 dias, quando comparado ao mesmo tecido no diestro.

Sabe-se também que endométrio e embrião eqüino de 14 dias secretam tanto $\text{PGF}_{2\alpha}$, quanto PGE_2 *in vitro* (WATSON; SERTICH, 1989; STOUT; ALLEN, 2002); $\text{PGF}_{2\alpha}$ em maiores quantidades que PGE_2 (WATSON; SERTICH, 1989), e que há correlação positiva entre diâmetro e produção de PGE_2 embrionários entre indivíduos de 9 a 15 dias de idade (VANDERWAAL et al., 1993).

A PGE_2 é um potente estimulante da contratilidade e tônus uterino na égua (GASTAL et al., 1998), o que auxilia o deslocamento embrionário por todo o lúmen uterino (STOUT; ALLEN, 2001), desde o momento em que o embrião chega ao útero -5,5 a 6 dias (BATTUT et al., 1998), até a cessação do movimento aos 18 dias (STOUT; ALLEN, 2001). Em adição, a PGE_2 estimula o aumento do fluxo sanguíneo local (KRZYMOWSKI; STEFAŃCZYK-KRZYMOWSKA, 2002), informação esta compatível com o resultados de ecografia Doppler endometrial, encontrados por Silva et al. (2005), os quais observaram maior perfusão capilar local na presença da vesícula embrionária que no corno uterino contralateral à presença do embrião eqüino de 12 a 15 dias de idade.

Há também a produção de estradiol pelo embrião equino de 17 dias de idade (CHU et al., 1997)

Quanto aos estudos RNAm no endométrio eqüino, algumas diferenças foram encontradas entre amostras de fêmeas gestantes e não gestantes (KLEIN et al., 2010; MERKL et al., 2010).

Klein et al. (2010) observaram que, dentro do perfil transcripcional do endométrio gestante e cíclico aos 13,5 dias após ovulação, existem 153 genes diferentemente expressos. No endométrio gestante, há 106 genes que são expressos, sendo que destes genes, 58% estão envolvidos em processos celulares como transporte, sinalização de transdução, proteólise ou

homeostase de íons. É interessante salientar que muitos dos genes expressos no endométrio gestante são responsáveis pelo remodelamento endometrial, em resposta à presença do embrião, como a estimulação da proliferação estromal e da angiogênese local. Quanto aos genes que sofrem inibição da expressão nos tecidos gestacionais, em relação aos tecidos cíclicos, os autores encontraram 47 deles, sendo que 56% são genes relacionados com ligação protéica, processos metabólicos protéicos e lisossomos.

Já Merkl et al. (2010) observaram variação na expressão gênica entre amostras endometriais gestante e não gestantes aos 12 dias após ovulação. Dentre os genes estudados, destacam-se o fator de crescimento fibroblático – 9 (FGF-9), 7,9 vezes maior no endométrio gestante que no cíclico, a progestina (4,7 vezes maior nas amostras gestacionais), receptor para PGE₂ – EP4 (2,2 vezes maior nas amostras gestacionais), a prostaglandina redutase - 1 (3 vezes maior no endométrio gestante), o carreador de solutos da família 36 (SLC36A2), 32 vezes mais encontrado no endométrio gestante, e o transportador de ânions orgânicos, membro 2A1 (SLCO2A1), a proteína transportadora de prostaglandina (PGT), com quantidades semelhantes entre as amostras endometriais gestante e cíclicas.

4.4 O EMBRIÃO EQUINO – DA FERTILIZAÇÃO ATÉ O RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO

A fertilização na espécie equina ocorre na região do terço médio da tuba uterina, nominada de ampola da tuba uterina. Segundo Bezar et al. (1989), aproximadamente 24 horas após a fertilização ocorre a primeira clivagem, e as subseqüentes divisões acontecem em intervalos de 12 a 24 horas. Entre os estágios de 26 a 32 células, o embrião equino é denominado de mórula inicial; alcançando 32 células, o embrião passa a ser chamado de mórula compacta (BETTERRIDGE et al., 1982).

A partir de então, a quantidade de PGE₂ produzida pelo embrião equino entre 130 (mórula, com $156,7 \pm 3,1$ μ m de diâmetro) e 152 horas (blastocisto inicial; $162,5 \pm 3,7$ μ m de diâmetro) de idade (FREEMAN et al., 1991) induz relaxamento da musculatura anular lisa da tuba uterina (WEBER et al., 1995) de tal forma que propicia o deslocamento da vesícula embrionária da tuba uterina para o útero (BATTUT et al., 2000).

Freeman et al. (1991) não encontraram diferença no diâmetro dos embriões entre 120 horas de idade (classificados pelos como estruturas “pré-transporte”) e embriões de 168 horas de idade (classificados como “pós-transporte”). Porém, Freeman et al. (1992), encontraram que embriões de 6 dias de idade, transferidos em tubas uterinas após 2 dias da ovulação, possuem diâmetro inferior a embriões de mesma idade, transferidos em tubas uterinas após 5 dias da ovulação.

Coincidentemente à entrada no útero, é possível observar a presença da cápsula embrionária (BATTUT et al., 2000), camada acelular glicoprotéica (CHU et al., 1997), composta por mucina, que envolve o embrião dos 6 aos 22 dias de idade (ORIOLE et al., 1993).

A maior proporção de mucina capsular é produzida pelas células trofoblásticas embrionárias (ORIOLE et al., 1993; ALBIHN et al., 2000; ALBIHN et al., 2003), mas também há evidências de proteínas de origem endometrial (STEWART et al., 1995).

No mesmo período de cessação do movimento embrionário intrauterino (17 dias de idade) ocorre diminuição na composição de ácido siálico da cápsula em embriões íntegros e aumento deste componente em embriões danificados artificialmente pela indução de luteólise na mãe (CHU et al., 1997).

Enquanto a cápsula está presente, não há contato físico entre embrião e o endométrio materno (CHU et al., 1997). Dessa forma, durante a fase capsular, a nutrição embrionária ocorre por absorção de secreções endometriais através desta camada de glicoproteínas (CROSSETT et al., 1998).

4.5 PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE PROSTAGLANDINA (PGT)

Para que as prostaglandinas possam exercer suas funções endócrinas, precisam ser liberadas do citosol de suas células produtoras. No entanto, em pH fisiológico, as PGs possuem baixo coeficiente de permeabilidade na membrana plasmática (CHAN et al., 1998). Dessa forma, os transportes celular e compartimental destas prostaglandinas são facilitados pela proteína transportadora de prostaglandinas (PGT) (CHAN et al., 1998; AROSH et al., 2004), que atua tanto no efluxo dos prostanóides sintetizados para exercerem suas funções

biológicas, quanto no influxo e posterior metabolização e inativação hormonal (SCHUSTER, 1998).

Esta proteína pertence ao grupo dos transportadores de ânions orgânicos (OATP), classificada dentro da superfamília dos carreadores orgânicos solúveis (SLC), membro 2A1 (SLCO2A1) (HAGENBUCH; MEIER, 2003). O grupo dos OATPs, em humanos, consiste de 11 membros (MIKKAICHI et al., 2004; KÖNIG et al., 2006), incluindo 10 OATPs e a PGT, classificada como OATP2A1, com 12 domínios transmembrânicos e cinco voltas extracelulares (KÖNIG et al., 2006). Segundo Adachi et al. (2003) o décimo primeiro domínio transmembrânico possivelmente seja a região protéica que especializa a molécula no transporte somente de prostaglandinas. As terminações amina e carboxila foram encontradas intracelularmente e regiões de N-glicosilação estão presentes em quatro voltas extracelulares em tecido ovino (BANU et al., 2008) e em duas nos humanos (HAGENBUCH; MEIER, 2003). O gene para PGT bovina e ovina possui 1953 nucleotídeos, que codificam 644 aminoácidos (BANU et al., 2003; BANU et al., 2008).

A PGT já foi identificada em ratos, humanos, coelhos, suínos, bovinos e ovinos, em diferentes tecidos, como pulmão, endotélio vascular, musculatura lisa vascular, rim, cérebro, próstata, glândula vesical, placenta e endométrio (ENDO et al., 2002; BAO et al., 2002; BANU et al., 2003; KANG et al., 2005; MILNE; JABOUR, 2003; KANG et al., 2006; BANU et al., 2005; SCAFIDI et al., 2007; Van POUCKE et al., 2009), possuindo, em média, 70KDa nas espécies acima descritas. Tem-se que a PGT bovina possui 90% de similaridade com a PGT humana (BANU et al., 2003), enquanto que a PGT ovina possui 92% e 85% de similaridade com as PGTs bovina e humana, respectivamente (BANU et al., 2008).

Dentre os tecidos uterinos e adjacentes, importantes à reprodução das espécies domésticas, a PGT foi identificada em vacas cíclicas (BANU et al., 2003) e com 250 dias ou mais de gestação (BANU et al., 2005) e em ovelhas cíclicas (BANU et al., 2008), pelos métodos de *Western Blotting*, *Northern Blotting* e imunohistoquímica.

Em relação aos estudos nas fêmeas cíclicas, têm-se que Banu et al. (2003) encontraram maiores concentrações de PGT no endométrio bovino entre os dias 13 e 18 pós-ovulação e Banu et al. (2008) encontraram maiores concentrações da PGT no endométrio ovino entre os dias 14 e 16 pós-ovulação, períodos estes compatíveis com a luteólise nestas espécies (MC CRACKEN et al., 1999).

Banu et al. (2003) encontraram a proteína PGT tanto no endométrio quanto no miométrio bovino de fêmeas cíclicas, porém, enquanto que no miométrio a quantidade desta

proteína permaneceu inalterada durante o ciclo estral, no endométrio houve maior concentração da proteína durante o período de 16 a 18 dias após a ovulação. Ainda, os autores avaliaram a variação espacial da PGT no endométrio e miométrio de vacas 16 dias após ovulação, com auxílio de imunohistoquímica, e encontraram que a PGT é altamente expressa na região basal do epitélio luminal, difusa na região estromal e ausente no epitélio glandular. Na região vascular do miométrio, a quantidade da PGT foi maior na região periférica das veias que das artérias. Considerando a presença do plexo útero-ovariano nos ruminantes e o transporte da $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial na vaca cíclica durante luteólise (GINTHER, 1981), é condizente a maior quantidade de PGT encontrada na veia útero-ovárica ipsilateral ao corpo lúteo por Banu et al. (2003) em fêmeas bovinas entre os dias 13 e 18 do ciclo estral.

Entretanto, a dinâmica da localização imunohistoquímica da PGT no endométrio ovino difere da bovina, pois em ovinos a PGT é encontrada em similar quantidade no epitélio luminal e glandular (BANU et al., 2008).

Quanto a fêmea bovina gestante, Banu et al. (2005) encontraram maior expressão relativa de RNAm para PGT nas carúnculas de gestações acima de 151 dias, enquanto que a quantidade da proteína em si foi maior nas carúnculas das gestações acima de 201 dias. Já na localização imunohistoquímica da PGT foi observada maior concentração da proteína nas células epiteliais que nas estromais carunculares e trofoblásticas fetais. Os autores ainda encontraram somente valores detectáveis de RNAm para PGT nos plexos útero-ovarianos contralateral e ipsilateral ao corpo lúteo, propondo a existência de um mecanismo para proteção do corpo lútero da gestação contra regressões prematuras.

Em equinos somente há a recente citação da identificação do RNAm da PGT no endométrio eqüino gestante e não gestante aos 12 dias após ovulação (MERKL et al., 2010), sendo que os pesquisadores não encontraram diferença na quantidade do material ribonucléico entre as amostras estudadas.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 EXPERIMENTO 1: IDENTIFICAÇÃO DO RNAm DA PGT NO ENDOMÉTRIO EQUINO CÍCLICO E GESTANTE

5.1.1 Animais, manejo alimentar e sanitário

Foram utilizadas dez éguas da raça Mangalarga, entre 4 e 12 anos de idade, comprovadamente férteis.

As fêmeas foram submetidas ao mesmo manejo sanitário e nutricional, sendo alojadas no mesmo pasto de *coast cross* sombreado, com disponibilidade de água e suplementadas com sal mineral *ad libitum*. Todas as éguas foram vermifugadas a cada três meses, com rotação de diferentes vermícidias e vacinadas contra raiva, tétano, influenza e encefalomelite.

5.1.2 Acompanhamento do ciclo estral e inseminação artificial.

Para a detecção do folículo pré-ovulatório e determinação do dia da ovulação, um ciclo estral anterior ao utilizado no experimento foi acompanhado por palpação transretal e ultrassonografia (SIUI[®], modelo CTS5500V, China, transdutor linear de 5MHz). Após a observação da ovulação natural, foram administrados 7,5 mg de Tremitamina de Dinoprost (Lutalyse, Pfizer[®]), pela via intramuscular, cinco dias após a ovulação, em todas as éguas.

Quatro dias após a administração da prostaglandina sintética, um novo ciclo estral de cada égua foi acompanhado diariamente, utilizando palpação transretal e exame ultrassonográfico. Foram considerados folículos ovarianos pré-ovulatórios aqueles com diâmetro médio $\geq 35\text{mm}$, na presença de edema endometrial. Assim, quando detectado folículo pré-ovulatório, foram aplicados pela via endovenosa 2.500UI de hCG (Vetecor[®],

Hertape Calier) para indução da ovulação. Para confirmação e maior precisão do momento da ovulação, após aplicação da hCG, as éguas foram examinadas duas vezes ao dia, até a detecção da ovulação.

Das dez éguas utilizadas neste experimento, seis foram destinadas a doadoras de endométrio cíclico e quatro foram utilizadas como doadoras de endométrio gestante. Nas éguas doadoras de endométrio cíclico somente foram realizados os exames reprodutivos descritos acima, enquanto que as éguas doadoras de endométrio gestante foram inseminadas com sêmen descongelado, imediatamente após detecção da ovulação, cuja dose inseminante utilizada foi de 500x10⁶ espermatozóides móveis, depositados no corpo do útero.

A partida do sêmen congelado utilizado nas inseminações artificiais foi previamente avaliada no Laboratório de Biotecnologias do Sêmen e Andrologia (LBSA), localizado no Centro de Biotecnologia da Reprodução Animal (CBRA), do Departamento de Reprodução Animal (VRA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), no Campus de Pirassununga. As características seminais após descongelação encontradas foram: motilidade progressiva visual = 55%, vigor = 3 e alterações morfológicas = 13%, células com membranas plasmática e acrossomal intactas, com alto potencial de membrana mitocondrial = 50%.

Treze dias após inseminação artificial, foram realizados exames ultrassonográficos, para diagnóstico da gestação.

5.1.3 Coleta e armazenamento das amostras endometriais

As amostras endometriais foram coletadas por biópsia uterina (pinça de biópsia uterina – Biotech Botucatu Comércio de Produtos Veterinários Ltda. – ME), utilizando técnica modificada de Kenney e Doig (1986), na qual a pinça para biópsia foi introduzida no lúmen uterino através da cérvix e a região de coleta de endométrio foi localizada transretalmente.

Nas fêmeas doadoras de endométrio cíclico, foram coletadas amostras endometriais em três momentos do ciclo estral: na presença de folículo pré-ovulatório, ou seja, em estro (E₀), sete (E₇) e quatorze dias (E₁₄) após ovulação, sendo uma amostra representativa de cada momento do ciclo. Para que as três amostras endometriais de mesma égua não fossem coletadas no mesmo local, foram padronizadas três diferentes posições intrauterinas da pinça

de biópsia, nos três diferentes momentos do ciclo estral: (1) desvio da pinça para o corno esquerdo num ângulo de 30°, (2) desvio da pinça para o corno direito num ângulo de 30° e (3) direcionamento da pinça num ângulo de 0° para coleta na região do corpo uterino. Os posicionamentos intrauterinos da pinça de biópsia foram direcionados transretalmente, de maneira aleatória entre os períodos do ciclo estral e égua, tendo sempre o cuidado de utilizar os três posicionamentos de pinça em todas as éguas.

Já nas fêmeas doadoras de endométrio gestante, foi coletada uma amostra de cada égua no dia posterior ao diagnóstico de gestação positiva, ou seja, as amostras endometriais foram coletadas aos 14 dias de gestação (E_G). Para a coleta do tecido, a localização da vesícula embrionária foi determinada ultrassonograficamente, e a pinça de biópsia desviada transretalmente para o corno contralateral ao corno onde se localizava a vesícula, no momento. Após o procedimento de coleta, novo exame ultrassonográfico foi realizado para observação da integridade embrionária, avaliando o formato da vesícula. Nas quatro éguas gestantes, a vesícula embrionária não foi lesada pelo procedimento de biópsia endometrial.

Imediatamente após coleta, cada amostra endometrial (1,5 cm², em média) foi fracionada em porções menores (em torno de 12 mm² cada porção), com auxílio de lâmina de bisturi e armazenada em criotubo de 2 mL a -196°C, em botijão criogênico. Uma fração de E_{14} e E_G foi armazenada em formol a 10%, a 5°C, para futura avaliação histopatológica.

O local de apoio para a manipulação das amostras endometriais foi devidamente desinfetado com álcool 70% antes de cada procedimento.

5.1.4 Avaliação histopatológica endometrial

Uma porção (em torno de 10mm²) de cada amostra E_{14} e E_G foi direcionada para avaliação histopatológica. Estas avaliações foram realizadas no Laboratório de Histologia da FZEA-USP, segundo técnicas rotineiras de inclusão em parafina. Cortes de 4 micrômetros de espessura foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE), segundo Prophet et al. (1992). As amostras foram classificadas em categorias I, IIa, IIb ou III, segundo Kenney e Doig (1986).

5.1.5 Coleta e armazenamento de tecidos pulmonar, hepático e renal equinos

Foram coletadas amostras teciduais de em torno de 3 cm² de área de pulmão, fígado e rim de um cavalo castrado, de 18 anos de idade, que veio a óbito no Hospital Veterinário da FMVZ/USP, no Campus de Pirassununga, devido a abdome agudo por deslocamento de ceco, segundo laudo de necrópsia. Cada amostra foi imediatamente armazenada em criotubo de 2 mL a -196°C. Estes tecidos foram coletados para serem utilizados como controle positivo nos PCRs dos endométrios eqüinos, pois, apesar de não identificada a proteína PGT, tão pouco o RNAm desta proteína na espécie, os resultados encontrados em outros animais (KANAI et al., 1995; PUCCI et al., 1999), inclusive no homem (LU et al., 1996) foram utilizados como base para este experimento.

5.1.6 Extração de RNA total dos tecidos endometriais

Os procedimentos laboratoriais envolvidos na avaliação do RNAm para PGT equina, desde a extração do material ribonucleico, até a densitometria das bandas de DNA em gel de agarose, foram realizadas no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP), no Campus de Pirassununga. Anteriormente aos procedimentos laboratoriais, toda a bancada de manipulação foi higienizada com álcool 70% para evitar contaminações com RNAses e RNAs externos. Em adição, todas as amostras de RNA e todos os produtos utilizados foram mantidos sob gelo picado durante os procedimentos laboratoriais, para manutenção da integridade dos mesmos.

O RNA total dos tecidos endometriais foi extraído com TRIzol[®] Plus RNA Purification Kit (Invitrogen Life Technologies Inc, Carsbad, CA), segundo instruções do fabricante. Para tanto, em torno de 50 mg de cada tecido foi homogeneizado com 500 µL de TRIzol[®], com auxílio de pistilo livre de RNase, em tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, sob gelo picado. Quando formada solução homogênea, esta foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente.

Em seguida, 100 μ L de clorofórmio foram acrescentados, e esta solução então, incubada por 2 minutos, em temperatura ambiente, seguida de centrifugação a 12.000xg, durante 15 minutos, a 5°C.

Após centrifugação, foi possível observar a formação de três fases; a fase vermelha, que contém DNA e proteínas, a interfase, de coloração branca, e a fase aquosa transparente, na qual há exclusivamente RNA. Assim, a fase transparente foi recuperada em outro tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e as restantes fases foram descartadas.

A fração transparente recuperada foi adicionada de 250 μ L de álcool isopropílico, para causar precipitação dos RNAs. Para isto, a solução foi incubada em temperatura ambiente, por 10 minutos, seguida de centrifugação a 12.000xg, durante 10 minutos, a 5°C. O precipitado de RNA, geralmente invisível antes da centrifugação, apareceu como um sedimento no fundo e/ou lateral do tubo.

O sobrenadante resultante foi descartado e o sedimento acrescido de 1000 μ L de etanol 75%, vigorosamente misturado e, em seguida, centrifugado a 7.500xg, durante 10 minutos, a 5°C, para lavagem do material ribonucléico.

Novamente o sobrenadante resultante da centrifugação foi descartado e o sedimento eluído em água bidestilada, deionizada e livre de RNase. Após homogenização, esta solução foi incubada a 55°C, durante 10 minutos, para completa dissolução do sedimento. Esta solução final foi mantida sob gelo picado, até a quantificação de RNA total em cada amostra.

5.1.7 Quantificação do RNA total e armazenamento dos extratos endometriais

Para a quantificação do RNA total dos extratos endometriais, foi utilizado espectrofotômetro (NanoDrop 2000C, Thermo Scientific®, Inglaterra) que possui um programa computacional acoplado para visualização e armazenamento dos dados. Este equipamento possui faixa de leitura de 190 a 840 nm, segundo fabricante. Foi utilizado 1 μ L de cada amostra para leitura no aparelho de espectrofotometria em 269 nm, que gerou dados de concentração de RNA por μ L (ng/ μ L).

O equipamento gera alguns números racionais para verificação de pureza das amostras. A pureza das amostras de RNA é feita baseada no cálculo das razões das medições realizadas em 260 e 280 nm. A razão A_{260}/A_{280} é utilizada para estimar a pureza dos ácidos

nucléicos, já que as proteínas possuem absorção em 280nm. Assim, as leituras das amostras de RNA devem possuir razão A_{260}/A_{280} maior ou igual a 1.9 (KLEIN et al., 2010).

Após quantificação, uma alíquota de 4 μ L de cada extrato de RNA foi destinada para corrida eletroforética e o restante dos extratos foram armazenados a - 80°C.

5.1.8 Verificação da qualidade de RNA pelo perfil de corrida em gel de agarose 1%

Apesar da razão A_{260}/A_{280} ser um indicador de pureza dos extratos, é importante também submeter as amostras à corrida eletroforética em gel de agarose para avaliar, além da presença ou ausência de contaminantes, como material desoxiribonucléico (DNA), a integridade do RNA de cada amostra. Dessa forma, todas as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1%.

Para tanto, 1L de solução TBE 1X e 200 mL de gel de agarose 1% foram preparados (Anexo A). Observada solidificação do gel, este foi encaixado em cuba horizontal de corrida eletroforética e recoberto com 800 mL de TBE 1X (Anexo A).

Após a alocação cuidadosa de cada amostra no respectivo poço, a condição de corrida eletroforética imposta foi de 60V, 500mA e 1hora e 20 minutos.

Para observação do perfil das bandas de RNA, o gel foi submetido à luz ultravioleta após término da corrida eletroforética.

5.1.9 Elaboração dos primers para PGT equina

Baseado no seqüenciamento do gene que codifica a proteína PGT, homologado no site GeneBank, ainda sem publicação apresentada, foi possível realizar análises do material genético eqüino, com auxílio do software Primer3 (ROZEN; SKALETSKY, 2000) para elaboração dos *primers* (*primer F* e *primer R*) específicos para PGT equina. Nestas análises foram verificados possíveis dímeros e *hairpins* (Autodimer V1) e analisados para presença de alta homologia com outras seqüências do genoma humano, bovino, ovino e suíno, com auxílio do programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1990)

Frente ao estudo BLAST da PGT equina, as seqüências 5' - GCGGATCTTTGTGGACTACG - 3' , componente do exon 6 (*primer* F, 767 – 787 pb) e 5'- CACTCCTCTGGCCATTGTTC - 3', componente do exon 7 (*primer* R, 916 – 936 pb) foram escolhidas como *primers* para a amplificação do RNAm da PGT equina, em RT-PCR, para gerar produtos com 169 pares de base. O *primer* de gene de expressão constitutiva escolhido para normalização foi o 18S eqüino (com 65 pares de base), um RNA ribossômico (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; BÄR et al., 2009).

Estes oligonucleotídeos foram formulados pela Eurofins MWG/Operon, Armersham Bioscience®. Ambos os produtos (*primer* F e *primer* R) foram ressuspensos de acordo com indicações do fabricante, ou seja, 348 µL de TBE 1X (Anexo A) para *primer* F e 327 µL de TBE 1X para o *primer* R, resultando em produtos (solução estoque) de 100 µM. Em seguida, 1 µL da solução estoque foi diluído em 24 µL de água destilada e deionizada autoclavada e adicionada de inibidor de RNase, resultando em soluções trabalho (*primer* F e *primer* R) de 400ng/µL. Após ressuspensão e diluição, ambas soluções estoque e solução trabalho foram armazenados a -20°C, de acordo com indicação do fabricante.

5.1.10 Teste da eficiência dos primers para PGT equina

Anteriormente ao teste da eficiência dos *primers* para PGT equina, foi necessária a avaliação da melhor diluição destes oligonucleotídeos para reação em cadeia de polimerização em tempo real (RT-PCR). Assim sendo, ambos os *primers* R e F (solução trabalho a 400ng/µL) foram preparados a 50, 100 e 200 ng/µL (Figura 2).

Figura 2 - Diluições em série de *primer* para reação em cadeia de polimerização em tempo real (RT-PCR) para a proteína transportadora de prostaglandina (PGT) equina

Em seguida, um extrato endometrial de RNAm foi submetido a RT-PCR, utilizando as quatro concentrações de *primers* preparadas. Paralelamente, o volúmen de RNAm utilizado foi substituído por água, com as mesmas quatro diluições de *primers*, no intuito de controle negativo. Assim, a amostra de RNA e as diluições de *primers* foram misturadas em duplicata ao kit para RT-PCR Verso 1-Step QRT-PCT ROX Kit (Thermo Scientific), segundo indicações do fabricante. Este kit realiza conjuntamente a transcrição e a amplificação gênica.

Segundo manual do produto, este kit comercial é composto por enzimas (inclusive a transcriptase reversa e inibidor de RNase), “RT Enhancer”, que remove conteúdos de DNA da amostra e o “1-Step QPCR ROX Mix, um tampão que proporciona alta sensibilidade, especificidade e consistência na leitura de fluorescência durante tempo real e ponto final da análise, além de otimizar a técnica, permitindo a transcrição reversa e a amplificação da reação em cadeia (PCR) na mesma reação.

Em seguida, 1,25 µL de corante fluorescente (EvaGreen[®], Uniscience), um corante verde de ácidos nucleicos, que fluoresce quando ligado ao DNA, foi adicionado a cada solução, seguida da adição de 1 µL de *primer* F e 1 µL de *primer* R.

Cada solução, contendo 25 µL da mistura final, foi alocada nos poços da placa óptica de reação para 96 amostras (MicroAmp Optical 96-Well ReactionPlates with Barcodes[®], Applied Biosystems) e os poços vedados com adesivos ópticos (MicroAmp[®] Optical Adhesive Covers, Applied Biosystems).

Para a RT-PCR (A&B Applied Biosystems[®], modelo 7500 Real Time PCR System), foram utilizados 45 ciclos. Inicialmente o sistema era aquecido a 50°C por quinze minutos,

para a confecção do cDNA, seguido por 15 minutos a 95°C, tempo este necessário para a denaturação do cDNA e degradação da enzima transcriptase. Cada ciclo de reação de polimerização em cadeia foi composto por 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C.

Para avaliar a eficiência dos *primers* elaborados para PGT equina, amostras do extrato de RNA hepático (FIG) e endometrial (END) foram diluídas em série, à partir de 50 ng/mL, como listradas na figura 3.

Figura 3 - Diluições em série de amostra de RNAm de tecido equino

Após as diluições, cada solução resultante foi misturada em duplicata ao kit para RT-PCR Verso 1-Step QRT-PCT ROX Kit e submetidas às condições de RT-PCR, da mesma forma que descrito acima para as diluições dos *primers*.

5.1.11 Preparação dos extratos de RNA total e RT-PCR para RNAm da PGT equina

O preparo das soluções finais (amostras de RNA acrescidas de RT-PCR Verso 1-Step QRT-PCT ROX Kit, EvaGreen e *primers*) foi realizado segundo descrito no item anterior (2.1.10), em triplicatas para ambos os *primers* de PGT e 18S. Somada às soluções contendo RNA, foram preparadas duas outras, sem a adição de amostra de extrato de RNA, para serem utilizadas como controle negativo de PGT e controle negativo de 18S.

O mesmo sistema para alocação das amostras e leitura óptica (placa óptica de reação, vedada com adesivo óptico) foi utilizado, sendo que cada poço foi preenchido com 25 µL da mistura final.

Quanto ao RT-PCR das amostras, esta técnica também foi realizada segundo descrito no item anterior (2.1.10).

Ao término dos 50 ciclos, os dados de RNAm foram gerados em valores CT, que refletem a quantidade relativa transcrita do gene em estudo (KUBISTA et al., 2006). Estes valores então foram normalizados e transformados segundo o cálculo de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

5.1.12 Curva de dissociação dos produtos de RT-PCR

Imediatamente após as reações de RT-PCR para o RNAm da PGT equina, foi realizada curva de dissociação do produto em questão, que possibilita a verificação da qualidade da reação realizada, além de revelar possíveis *splicings* alternativos do gene. Espera-se que na curva de dissociação seja observado um pico de fluorescência que determina a formação de um produto específico de PCR.

5.1.13 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, sendo a unidade experimental a amostra uterina recuperada por biópsia. Os quatro momentos reprodutivos da égua (E_0 , E_7 , E_{14} e E_G) foram considerados tratamentos e a variável dependente, a abundância relativa de RNAm para PGT equina. Os dados gerados foram analisados empregando-se o programa Statistical Analysis System (SAS, 1998). Inicialmente a normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias dos dados foram verificadas e, quando necessário, valores considerados *out-liers* pelo sistema estatístico foram desprezados. Em seguida análise de variância (ANOVA) foi realizada e as médias foram separadas pelo teste LSD. As hipóteses testadas foram consideradas significativas ao nível de 5 %.

5.2 EXPERIMENTO 2: INFLUÊNCIA DE FATORES EMBRIONÁRIOS EQUINOS NA EXPRESSÃO DE PGT E NA SECREÇÃO DE PGF2 α DO ENDOMÉTRIO EQUINO EM FINAL DE DIESTRO

5.2.1 Produção de meio condicionado embrionário equino (MCEE)

5.2.1.1 Acompanhamento do ciclo estral e inseminação artificial

Duas éguas ½ sangue da raça Bretã, e uma égua da raça Brasileiro de Hipismo, entre 8 e 10 anos de idade, pertencentes ao Setor Administrativo do Campus da USP de Pirassununga, e alojadas no Centro de Biotecnologias da Reprodução (CBRA) do Departamento de Reprodução Animal (VRA) FMVZ/USP, no Campus de Pirassununga, foram utilizadas como doadoras de 05 embriões de 13,5 dias de idade.

Para isto, os procedimentos para indução de luteólise do ciclo estral anterior e detecção da ovulação foram realizados segundo já descrito no item 2.1.2., com exames clínico-reprodutivos diários. Porém, para as inseminações artificiais foi utilizado sêmen fresco (motilidade progressiva visual do sêmen diluído = 45%, vigor = 2/3 e alterações morfológicas = 18%) de um garanhão de conhecida fertilidade, cuja dose inseminante utilizada foi de 500×10^6 espermatozóides móveis, depositados no corpo uterino. Ainda diferentemente do item 2.1.2., as inseminações artificiais foram pré-ovulatórias, sendo que todas as ovulações ocorreram até 24 horas após a inseminação.

5.2.1.2 Diagnóstico de gestação e coleta do embrião

O diagnóstico de gestação foi realizado 13 dias após detecção da ovulação, por exame ultrassonográfico (SIUI®, modelo CTS5500V, transdutor linear de 5MHz). Após detecção da vesícula embrionária intrauterina, o diâmetro médio da estrutura foi medido com auxílio de propriedades geométricas do aparelho de ultrassonografia.

Seis horas após o diagnóstico positivo da gestação, a égua doadora de embrião foi tranqüilizada com 0,02 mg/Kg de cloridrato de detomidina (Dormium®, Agener União Saúde Animal, Brasil), intravenoso. Dez minutos após a tranquilização, a coleta transcervical da vesícula embrionária foi realizada. Uma sonda endotraqueal para cavalos (diâmetro interno de 22 mm), previamente autoclavada, adaptada para a coleta do embrião foi utilizada. As adaptações incluíram diminuição do tamanho do balonete inflável, com auxílio de linha de nylon (para diminuir a porção intrauterina da sonda), retirada da ponta em bisel da extremidade traqueal (para facilitação da entrada do embrião na sonda) e retirada da porção expandida da extremidade oral (para encaixe do extensor de silicone) (Figura 4).

Em média, foram necessárias quatro lavagens uterinas, compostas por 2L de solução Ringer com Lactato cada, para a captação do embrião em proveta de 2L autoclavada.

Figura 4 - Sonda endotraqueal para cavalos (diâmetro interno de 22 mm). A: formato original. B: formato adaptada para coleta de embrião eqüino de 13,5 dias, com diminuição do comprimento do balonete utilizando linha de pesca, retirada da ponta em bisel da extremidade traqueal e retirada da porção azul da extremidade oral

5.2.1.3 Manipulação e cultivo do embrião eqüino de 13,5 dias de idade

A manipulação e preparação embrionária para o cultivo foi realizada no Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM), localizado no CBRA do VRA/FMVZ/USP, no Campus de Pirassununga, em fluxo laminar previamente desinfetado

com álcool 70%, enquanto que a incubação dos embriões foi realizada no LBSA/CBRA/VRA/FMVZ/USP.

Imediatamente após a captação do embrião em solução de Ringer com Lactato, foram realizadas 10 lavagens da vesícula embrionária, sendo que cada lavagem continha 30 mL de meio para cultivo celular Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Invitrogen Life Science, EUA – Anexo B) com 5% de albumina bovina sérica (BSA, Sigma®, EUA), 100UI/mL de penicilina G, 100µg/mL de estreptomicina e 250ng/ de anfotericina B (ABAM, Sigma®, EUA) (EALY et al., 2010).

Após as lavagens, cada embrião foi alocado em garrafa para cultura de 75 cm² (TPP®, Suíça), contendo 70mL de IMDM com 5% de BSA e ABAM e submetido a incubação a 5% de CO₂ e 37°C (Incubadora de CO₂, modelo MCO-19AIC-UV, Sanyo, Japão) sob placa agitadora, durante 24 horas.

Paralelamente, outra garrafa de cultura, de mesmo volúmen da solução IMDM/BSA/ABAM foi submetida às mesmas condições de incubação, para posteriormente ser utilizada como tratamento controle dos endométrios em diestro cultivados com MCEE.

5.2.1.4 *Recuperação e armazenamento do MCEE*

Após incubação, o conteúdo líquido presente nas garrafas foi recuperado sob fluxo laminar e alíquotas 4mL foram armazenadas em criotubos de 5mL. Estas alíquotas foram armazenadas a -80°C.

5.2.1.5 *Avaliação da integridade das membranas plasmáticas embrionárias após cultivo de 24 horas*

A fim de verificar a eficácia da condição de incubação imposta à vesícula embrionária durante 24 horas, a integridade da membrana plasmática embrionária foi realizada, segundo técnica modificada, utilizada por Peres (2004).

Para isto, após aspiração do líquido vitelínico em seringa de 1mL (seringa e agulha de insulina) os tecidos embrionários foram incubados com 90 μ L de iodeto de propídio (25 μ g/mL), durante 10 minutos, em ambiente escuro. Em seguida, foram lavados em 60 μ L de PBS com 0,4% de BSA. Após, os tecidos foram incubados por 20 minutos em uma gota de Hoechst33342 (10 μ g/mL), também em ambiente protegido da luz, cobertos por lamínula e submetidos a avaliação de microscopia de epifluorescência (Nikon[®], modelo Eclipse 80i), em filtro triplo (D/F/R, C58420), com aumento de 400x. As células que fluoresceram em azul foram consideradas com membrana plasmática íntegra, enquanto que as células fluorescentes de vermelho foram consideradas com membrana plasmática lesada, e, portanto, mortas. Somente foi realizada observação visual da percentagem de células vivas e mortas.

5.2.2 Produção de meio condicionado endometrial eqüino (MCEnd)

5.2.2.1 Acompanhamento do ciclo estral e coleta endometrial de éguas em final de diestro

Outras cinco éguas da raça Brasileiro de Hipismo (entre 3,5 e 7 anos de idade) e uma da raça Mangalarga (8 anos de idade) foram utilizadas como doadoras de endométrio em final de diestro (n=6). Para tanto, um ciclo estral anterior de cada fêmea foi acompanhado e a luteólise induzida no quinto dia após a detecção da ovulação, como descrito no item 5.1.2. Da mesma maneira, as características morfológicas e ultrassonográficas de útero e ovários foram examinadas durante o ciclo estral seguinte, para a indução (com hCG) e detecção da ovulação.

5.2.2.2 Coleta das amostras endometriais em final de diestro

As amostras endometriais neste experimento foram coletadas igualmente ao item 5.1.3. Assim, foram realizadas três biópsias endometriais em cada égua, utilizando técnica de orientação transretal da pinça de biópsia para regiões determinadas, como já descrita.

Diferentemente do item 5.1.3., as três amostras endometriais foram coletadas somente aos 14 dias após ovulação, período este representativo do final do diestro e início do processo de luteólise na égua não gestante e cíclica (AGUILAR et al., 2006). A iniciativa de coletar três biópsias no mesmo período do ciclo estral teve o intuito de aumentar a quantidade de material para o processamento e avaliações laboratoriais endometriais.

5.2.2.3 Coleta, processamento e dosagem de P4 de sangue venoso das éguas doadoras de endométrio em diestro

Para confirmação do período estral das éguas e embasamento técnico das futuras atividades laboratoriais e discussão dos resultados, amostras de sangue venoso foram coletadas de cada égua, imediatamente antes das biópsias endometriais. Para tanto, amostras séricas foram coletadas da veia jugular, em frascos à vácuo, de 6 mL, estéreis, contendo EDTA (Vacuette[®], Greiner Bio-one, Brasil). As dosagens de P4 foram realizadas no Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH/VRA/FMVZ/USP).

5.2.2.4 Processamento e cultivo endometriais

Das três amostras endometriais coletadas, uma foi direcionada para avaliação histopatológica, segundo descrito no item 5.1.4. As outras duas foram pesadas em balança de precisão e picotadas com lâmina de bisturi estéril em quatro porções iguais. As porções foram imersas em meio de cultivo, respeitando a proporção de 10 mL de meio de cultivo para cada 150 mg de tecido, em microplacas para cultivo. Os tecidos, em duplicatas, foram cultivados com os seguintes meios de cultivo (tratamentos):

- MCEE: 100% meio condicionado embrionário,
- IMDM: 100% IMDM/BSA/ABAM

Os tecidos nos respectivos meios de cultivo foram mantidos a 37°C, em ambiente contendo 5% de CO₂, durante 24 horas, sob placa agitadora.

5.2.2.5 *Recuperação e armazenamento do MCEnd e amostras endometriais cultivadas*

Os meios condicionados endometrial resultantes da incubação acima descrita foram aliquotados em criotubos de 2,5mL, contendo 1 mL do meio em cada alíquota. Em seguida, as alíquotas foram armazenadas a -80°C.

Após a recuperação do MCEnd de cada tratamento, a respectiva amostra endometrial foi alocada em criotubo de 1mL e, em seguida, armazenada a -196°C.

5.2.1.6 *Extração, quantificação e avaliação da qualidade do RNAm das amostras endometriais cultivadas em MCEE*

Para a extração, quantificação e verificação da qualidade do material ribonucleico das amostras endometriais em diestro, cultivadas com ou sem MCEE, os procedimentos laboratoriais foram realizados igualmente aos descritos nos itens 5.1.6., 5.1.7. e 5.1.8.

Resumidamente, os extratos de RNA foram obtidos utilizando TRIzol® Plus RNA Purification Kit, seguido da avaliação da quantidade de RNA total de cada extrato (em ng/μL) no NanoDrop 2000C. A qualidade e possíveis contaminações do material ribonucleico foram verificadas em gel de agarose à 1% com brometo de etídeo (Anexo A).

5.2.1.7 *RT-PCR para RNAm da PGT equina em endométrio eqüino em diestro cultivado com meio condicionado embrionário eqüino*

A preparação e a reação de transcrição reversa e polimerização em cadeia em tempo real (RT-PCR) dos extratos de RNA das amostras deste experimento seguiram os mesmos procedimentos descritos no item 5.1.11., incluindo a utilização do kit Verso 1-Step QRT-PCT ROX, da sonda fluorescente Eva Green e dos *primers* R (exon 7) e F (exon 6).

5.2.1.8 *Análise Estatística*

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, sendo a unidade experimental 1/2 da amostra uterina recuperada de cada égua, estudada em duplicata. Os meios de cultivo endometrial MCEE e IMDM foram considerados tratamentos e a variável dependente, a abundância relativa de RNAm para PGT equina. Os dados gerados em ΔCT foram avaliados pelo programa computacional SAS (1998). Inicialmente a normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias foram verificadas, com a retirada de *outliers*. Em seguida, as médias $\pm$ desvios padrão foram submetidas à análise de variância (ANOVA), dentro do nível de significância de 5 %.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 EXPERIMENTO 1: IDENTIFICAÇÃO DO RNAm DA PGT NO ENDOMÉTRIO EQUINO CÍCLICO E GESTANTE

6.1.1 Avaliação histopatológica das amostras endometriais

Todas as amostras endometriais foram classificadas em grau I, segundo classificação descrita por Kenney e Doig (1986), não sendo observada presença de tecido miometrial em nenhuma amostra. De acordo com Doig e Waelchli (1992), éguas com endométrios na categoria I são consideradas potencialmente férteis, sendo estes endométrios possuidores de 82% ou mais de possibilidade de manutenção da gestação. Estes resultados são compatíveis com o histórico reprodutivo das fêmeas, uma vez que todas possuem histórico de anteriores e subseqüentes gestações, oriundas de embriões transferidos artificialmente.

O resultado de 100% das amostras classificadas na categoria I fortalece os resultados posteriores encontrados neste experimento, pois elimina possíveis variações derivadas de éguas classificadas como sub ou inférteis.

6.1.2 Quantificação e verificação da qualidade de RNA total das amostras experimentais

Para facilitação da identificação das amostras experimentais, cada extrato de RNA foi nominado por números, de maneira que as amostras identificadas com os números 1 a 6 são representativas de endométrio E₀, as nominadas com os números 7 a 12 são E₇, as 13 a 18 são E₁₄, as 19 a 22 são E_G, a 23 é fígado, a 24 é rim e a amostra 25 é extrato de RNA de tecido pulmonar equino (Tabela 1).

Os dados gerados das leituras espectrofotômetras para a quantificação de RNA total nas amostras experimentais estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Dados obtidos da quantificação de RNA total em tecidos eqüinos, avaliados em espectrofotometria (NanoDrop 2000C, Thermo Scientific®)

*Tecido eqüino	Identificação	Concentração (ng/ μ L)	A260/A280
E ₀	1	181,5	2,0
E ₀	2	156,9	2,0
E ₀	3	46,4	2,1
E ₀	4	56,5	2,0
E ₀	5	99,2	2,2
E ₀	6	149,7	2,1
E ₇	7	126,8	2,1
E ₇	8	673,6	2,0
E ₇	9	81,3	2,1
E ₇	10	70,5	2,0
E ₇	11	939,7	2,0
E ₇	12	125,5	2,1
E ₁₄	13	903,7	2,0
E ₁₄	14	125,0	2,0
E ₁₄	15	555,3	2,0
E ₁₄	16	101,9	1,9
E ₁₄	17	18,2	1,9
E ₁₄	18	521,9	1,9
E _G	19	57,2	2,1
E _G	20	101,2	2,1
E _G	21	402,7	2,0
E _G	22	489,1	2,0
Fígado	23	924,4	2,0
Rim	24	887,3	2,0
Pulmão	25	255,7	1,9

* E₀: endométrio coletado na presença de folículo pré-ovulatório; E₇: endométrio coletado sete dias após ovulação; E₁₄: endométrio coletado quatorze dias após ovulação; E_G: endométrio coletado aos quatorze dias de gestação.

Na tabela 1, tem-se a informação quanto à baixa de contaminação com proteínas, já que todas as razões A₂₆₀/A₂₈₀ foram maiores ou igual a 1,9, como indicado por Klein et al. (2010) para amostras de RNA livres de contaminantes protéicos.

Finalizando a verificação de contaminantes nas amostras experimentais, na corrida eletroforética dos extratos de RNA total em gel de agarose 1% foi observado contaminação com DNA nas amostras alocadas nos poços 3, 4, 8, 10, 11, 12, 14, 16, 17, 18, 21, 22, 13, 15, 27 e 28 (Figura 5). Este achado não invalida a utilização das amostras, pois os produtos de DNA serão eliminados durante o processamento e preparação dos extratos para o RT-PCR, utilizando DNase.

Entretanto, na figura 5 também foi possível observar, no poço 26 (seta branca), uma imagem sugestiva de degradação do material ribonucleico. Nesta região foi alocada amostra do tecido pulmonar equino. Assim sendo, foi postulado o descarte das amostras pulmonares como controle positivo, e a utilização dos extratos hepático e renal para este fim, já que ambos também são tecidos com expressão de RNA para síntese de PGT em outras espécies (SCHUSTER, 1998).

Figura 5 - Gel de agarose 1% e brometo de etídio, com amostras de tecidos equinos (poços 3 a 25). 2 e 15: marcador de peso molecular. 3 a 8: no período de estro. 9 a 14: sete dias após ovulação. 16 a 21: 14 dias após ovulação. 22 a 25: aos 14 dias de gestação. 26: amostra pulmonar. 27: tecido hepático. 28: tecido renal. A amostra do poço 26 possui imagem sugestiva de degradação do RNA (seta branca)

6.1.3 Teste da eficiência dos primers para PGT equina

Os dados gerados em CT da RT-PCR na verificação da eficiência dos *primers* produzidos para este experimento foram transformados para logaritmo, dos quais foi possível elaborar equações lineares ($y = -2,786x + 19,11$; $R^2 = 0,979$ para 18S e $y = -2,609x + 30,86$; $R^2 = 0,954$ para PGT). Em ambas as equações foram gerados coeficientes de regressão maiores que 0,95, o que comprova a eficiência relativa do *primer* para PGT produzido para este experimento.

6.1.4 Dados gerados na RT-PCR para PGT equina em tecido endometrial, hepático e renal

Em cada amostra experimental foi observada formação de um único pico de fluorescência na curva de dissociação (Figura 6), eliminando, assim, a possibilidade de formação de dímeros ou outras sequências gênicas não esperadas.

Figura 6 - Curvas de dissociação de produtos de RNAm em endométrio eqüino. **A:** produtos de gene endógeno 18S. **B:** produtos de proteína transportadora de prostaglandina (PGT)

As curvas de amplificação geradas durante a RT-PCR para PGT equina e 18S estão representadas na figura 7, no qual se observa a necessidade de maior número de ciclos (27 a 37 ciclos) para a formação do CT nas amostras amplificadas para PGT.

Figura 7 - Curvas de amplificação dos genes 18S (primeiro grupo de curvas) e PGT (Proteína Transportadora de Prostaglandina, segundo grupo de curvas) em tecidos endometriais, hepático e renal equinos

Os dados gerados em CT, normalizados e transformados segundo o cálculo de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), estão demonstrados na tabela 2.

Tabela 2 - Valores de CT e $2^{-\Delta\Delta CT}$ para gene codificador da proteína PGT equina, resultantes de RT-PCR de amostras teciduais endometriais, coletadas *in vivo*

* Amostras endometriais	CT		$2^{-\Delta\Delta CT}$
	18S	PGT	
1	14,1	30,1	1,6
2	13,9	30,1	1,3
3	12,9	27,7	2,8
4	14,3	30,8	1,2
5	13,5	30,0	0,9
6	13,1	29,0	1,6
7	14,3	30,9	1,0
8	14,1	30,2	1,6
9**	-	-	-
10	13,0	28,7	1,8
11	13,1	28,7	1,8
12	12,6	26,4	1,9
13	13,1	29,9	0,8
14	14,0	30,5	1,1
15	14,9	30,7	1,7
16**	-	-	-
17	12,8	30,2	0,7
18	13,9	30,6	0,9
19	14,4	28,8	2,0
20	13,9	30,6	1,0
21	18,5	32,2	1,7
22	15,6	32,1	1,2

* As linhas internas na tabela dividem as amostras por grupo. Amostras **1 a 6**: endométrio de égua cíclica, na presença de folículo pré-ovulatório. **7 a 12**: endométrio de égua cíclica, 7 dias após ovulação. **13 a 18**: endométrio égua cíclica, 14 dias após ovulação. **19 a 22**: endométrio aos 14 dias de gestação. ** Os dados de CT das amostras 9 e 16 foram identificados como *outliers* pelo SAS (Statistical Analysis System)

Conforme a figura 8, tem-se que as quantidades relativas de RNAm para PGT equina foram iguais entre os quatro momentos reprodutivos da égua, estudados neste experimento ($P=0,36$), ou seja, a quantidade relativa de RNAm para a PGT equina não varia no endométrio quando em estro ($E_0 = 1,6 \pm 0,6$), meio de diestro ($E_7 = 1,4 \pm 0,4$), final de diestro ($E_{14} = 1,0 \pm 0,4$) ou gestação de 14 dias ($E_G = 1,5 \pm 0,4$).

Figura 8 - Perfil de RNAm para a proteína PGT no endométrio de éguas cíclicas, na presença de folículo pré-ovulatório e edema uterino (E₀), sete dias após ovulação (E₇) e quatorze dias após ovulação (E₁₄) e no endométrio de éguas com 14 dias de gestação (E_G). Não foi observada diferença estatística entre os grupos (P=0,36)

Baseado na literatura referente à fisiologia reprodutiva da égua, considerando principalmente o período de luteólise e importante produção de PGF_{2α} pelo endométrio eqüino (GINTER, 2009; FERREIRA-DIAS et al., 2006), a informação de que há altas concentrações plasmáticas deste hormônio em torno do 14º dia do ciclo estral da fêmea vazia (DOUGLAS; GUINThER, 1976) para o retorno ao estro, juntamente com o conhecimento da necessidade do bloqueio da luteólise pelo embrião aos 14 dias de idade (SHARP et al., 1984; BOERBOOM et al., 2004), esperava-se encontrar maior quantidade do RNAm para produção da PGT em fêmeas vazias aos 14 dias após ovulação e menores quantidades deste RNA em endométrio vazio no período do estro e gestante aos 14 dias.

Porém, na figura 5 tem-se quantidade similares do RNAm em estudo no endométrio aos 14 dias após ovulação e no endométrio com 14 dias de gestação. Similar resultado foi observado por Merkl et al. (2010), porém em amostras endometriais coletadas ao 12 dias após ovulação, tanto em fêmeas gestantes, como cíclicas.

As outras pesquisas referente a PGT que até então avaliaram o perfil da PGT em endométrio cíclico nas outras espécies domésticas de produção (BANU et al., 2003; BANU et al., 2005; KANG et al., 2006; BANU et al., 2008) somente confrontaram dois momentos do

ciclo estral, o período do estro com o período da luteólise, respeitando as particularidades quanto ao ciclo estral de cada espécie.

Porém, é preciso destacar outra tão importante função da PGT, que é o transporte da PGE_2 (CHAN et al., 1998; SCHUSTER, 1998), cuja afinidade pela proteína transportadora é a mesma que a $PGF_{2\alpha}$ (CHAN et al., 1998; SCHUSTER, 2002). Esta outra função da PGT pode vir a explicar a quantidade do RNAm encontrada no endométrio gestante aos 14 dias. Isto porque entre os dias 8 e 17 da gestação, a vesícula embrionária equina, de maneira peculiar à espécie, movimenta-se por todo lúmen uterino, sendo que o maior deslocamento ocorre entre os dias 12 e 14 após ovulação (GUINThER, 1985; STOUT; ALLEN, 2001). Esta mobilidade embrionária é essencial para o bloqueio da luteólise e manutenção da gestação (MCDOWELL et al., 1988). O mecanismo pelo qual a mobilidade embrionária bloqueia a luteólise ainda não foi explicado, porém sabe-se que há produção de PGE_2 tanto pela vesícula embrionária, quanto pelo endométrio gestante durante este período (WATSON; SERTICH, 1989), e que este hormônio é importante para o deslocamento embrionário, principalmente devido ao efeito contrátil que causa no miométrio eqüino (ALLEN, 2001). Assim sendo, a PGE_2 de origem embrionária e endometrial atua indiretamente no bloqueio da luteólise em éguas gestantes, nas primeiras semanas da gestação. Dessa forma, uma vez que a PGT também transporta PGE_2 (CHAN et al., 1998; SCHUSTER, 1998), é de se esperar a presença de RNAm codificador desta proteína no endométrio gestante aos 14 dias para que haja a continuidade da gestação.

O método de RT-PCR de um passo utilizado, apesar de muito eficaz e acurado, proporciona informação quantitativa relativa de material gênico (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), não sendo possível distinguir informações espaciais do material. Durante o processamento do tecido endometrial para extração do RNA total, o método não faz distinção entre os compartimentos teciduais, como epitélio luminal, *estratum compactum* e epitélio glandular (RICKETTS, 1975).

Considerando que há distinta localização da proteína PGT no endométrio de ratas com 5 a 8 dias de gestação, sendo que somente ocorre imunofluorescência em epitélio luminal e glandular periblastocisto e que existe efeito estimulante da aplicação estrógeno na síntese da proteína na mesma espécie (FEI GAO et al., 2007), é possível que a localização da proteína PGT varie no endométrio de éguas cíclica e gestante, de acordo com os estímulos hormonais locais. Se assim ocorrer, similarmente à resposta em ratas, é possível explicar fisiologicamente a quantidade do RNAm em questão no endométrio eqüino em estro, pois

neste momento o endométrio equino está sob intensa influência estrogênica (GINTHER et al., 2003).

Em adição, a teoria da secreção endócrina da $\text{PGF}_{2\alpha}$ na porca cíclica e exócrina na porca gestante (BAZER; THACTHER, 1977), juntamente com a informação da diferença espacial na produção estrogênica de origem uterina entre porcas gestantes e cíclicas (FRANCZAK; KOTWICA, 2008), possibilitam hipotetizar uma possível influência do estrógeno na localização da PGT equina uterina. Na ausência de vesícula embrionária, a produção do estrógeno na espécie suína é de responsabilidade do miométrio e a $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterina é enviada para a corrente circulatória, enquanto que no útero gravídico, a produção estrogênica é realizada pelo endométrio e a $\text{PGF}_{2\alpha}$ é direcionada para o lúmen uterino. Ainda não há a identificação da proteína PGT no útero suíno, mas somente em tecido intestinal de leitões (VAN POUCKE et al., 2009), porém é possível que ocorra um controle estrogênico na localização uterina desta proteína na espécie, como ocorre em ratas. Similarmente às fêmeas murinas e suínas a localização da PGT no útero eqüino pode ter influência estrogênica, visto que a vesícula embrionária equina de 14 dias de idade é produtora de estrógeno (CHU et al., 1997).

6.2 EXPERIMENTO 2: INFLUÊNCIA DE FATORES EMBRIONÁRIOS EQUINOS NA EXPRESSÃO DE PGT E NA SECREÇÃO DE $\text{PGF}_{2\alpha}$

6.2.1 Coleta de embrião eqüino com 13,5 dias de idade

Aos 13 dias após ovulação, os diagnósticos de gestação foram realizados com auxílio de ultrassonografia, sendo observada 100% de taxa de prenhez, ou seja, ambas inseminações artificiais realizadas em dois ciclos consecutivos das duas éguas de sangue Bretã e uma inseminação realizada na égua da raça BH resultaram em gestação positiva, cujos diâmetros embrionários estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Diâmetro (mm) de vesícula embrionária intrauterina aos 13,5 dias de idade, em éguas, medido com auxílio de ultrassonografia

*Égua	Ciclo estral utilizado	Diâmetro do embrião (mm)
1	1°	18,1
1	2°	17,9
2	1°	14,0
2	2°	14,6
3	1°	13,9

*1 e 2: Éguas de raça ½ sangue Bretã. 3: Égua da raça Brasileira de Hipismo

Segundo Ginther (1983), o diâmetro médio da vesícula embrionária equina aos 13 dias de idade é de $13,7 \pm 0,5\text{mm}$, e aos 14 dias é de $17,3 \pm 0,5\text{mm}$, enquanto que Leith e Ginther (1984) encontraram as mesmas variáveis com $13,6 \pm 2,2\text{mm}$ e $17,1 \pm 2,0\text{mm}$, respectivamente. Porém, as vesículas embrionárias da égua 1 apresentaram medidas maiores que o esperado para o período gestacional, acordando com o valor de desvio padrão superior de Leith e Ginther (1984). Possivelmente tal achado é uma característica individual materna, já que foi utilizado sêmen do mesmo garanhão nas três éguas.

6.2.2 Avaliação da integridade das membranas plasmáticas embrionárias após 24 horas de cultivo

Na avaliação da integridade da membrana plasmática embrionária foi observada maior proporção visual de células com membranas íntegras que com membranas lesadas (Figura 9), ou seja, foi encontrado maior número de células vivas que mortas. A técnica de coloração de embrião equino com Hoescht33342 somente havia sido utilizada em indivíduos em estágios de desenvolvimento de mórula e blastocisto (BALL; ALTSCHUL, 1990; PERES, 2004), o que dificulta possíveis comparações quanto à qualidade dos embriões deste experimento. Porém, uma vez que maior proporção visual de células com membrana plasmática foi observada, possivelmente a condição de incubação por 24 horas imposta à vesícula embrionária foi eficaz para a produção do MCEE.

Figura 9 - Células de tecido embrionário equino com 14,5 dias de idade, corados com HOECHST 33342 (10µg/mL) e iodeto de propídio (125µg/mL) após 24 horas de incubação a 37°C e 5% de CO₂. Células coradas em azul apresentam membrana plasmática intacta. Células coradas em vermelho apresentam membrana plasmática lesada

6.2.3 Dosagens de progesterona sérica das éguas doadoras de endométrio em luteólise

As concentrações de P4 sérico das éguas doadoras de endométrio em final de diestro estão representadas na tabela 4, na qual é possível observar duas situações hormonais distintas.

Tabela 4 - Concentração de progesterona (P4) sérica em éguas cíclicas aos 14 dias após ovulação

Égua	P4 (ng/mL)
Retranca	8,8
Baronesa	0,17
Boneca	9,6
Avelã	2,9
Bailarina	0,17

As amostras séricas foram coletadas imediatamente após os procedimentos de biópsia uterina, ou seja, aos 14 dias após ovulação, pois este dia foi considerado como último dia do diestro (HUGHES et al., 1971). Os valores de P4 séricos acima de 1ng/mL encontrados no experimento são compatíveis com os resultados de Griffin e Ginther (1993), cuja média da concentração sérica deste hormônio em éguas no mesmo período foi de aproximadamente 4ng/mL. No entanto, duas éguas apresentaram valores progesterônicos séricos inferiores a 1ng/mL, em concordância com os resultados de Al-zí'abi et al. (2002) que encontraram queda brusca do hormônio em éguas aos 14 dias após ovulação (0,6ng/mL), em relação ao 13º dia (2,8ng/mL)

6.2.4 Quantificação e verificação da qualidade de RNA total das amostras endometriais cultivadas in vitro

A identificação por números e as concentrações de RNA total de cada amostra endometrial, cultivadas na presença ou ausência de MCEE, juntamente com o índice A_{260}/A_{280} estão demonstrados na tabela 5.

As amostras 25, 26, 38, 45, 51, 54 e 67 possuem razão A_{260}/A_{280} menor que 1,9, indicativo de contaminação com DNA (KLEIN et al., 2010) durante o procedimento de extração do RNA total. Entretanto esta contaminação com material desoxiribonucléico foi eliminada durante processo de RT-PCT, uma vez que o *kit* utilizado para a reação de polimerização em cadeia de um passo possui *RT enhancer*, responsável pela remoção de contaminantes de DNA. Segundo fabricante, este componente do *kit* degrada fitas duplas de DNA durante a transcrição do RNA e é inativado durante início da reação de polimerização, a 95°C, durante 15 minutos (THERMO FISHER SCIENTIFIC Inc., 2007).

Tabela 5 - Identificação por números de amostras endometriais de 6 éguas aos 14 dias após ovulação, cultivadas em duplicatas com meio *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM) ou meio condicionado embrionário equino (MCEE), quantificação de RNA total e relação A_{260}/A_{280}

Égua	Identificação	Tratamento	Concentração RNA (ng/ μ L)	A260/A280
Retranca	25	MCEE	173,9	1,79
Retranca	26	MCEE	503,6	1,71
Retranca	34	IMDM	472	2,01
Retranca	35	IMDM	440,5	2,02
Nala	37	MCEE	855	1,98
Nala	38	MCEE	638,4	1,89
Nala	43	IMDM	1052,9	2,02
Nala	44	IMDM	407	1,94
Baronesa	45	MCEE	582,5	1,88
Baronesa	46	MCEE	1713,1	2,04
Baronesa	51	IMDM	1780,4	1,81
Baronesa	52	IMDM	1181,6	1,93
Boneca	53	MCEE	927,5	2,02
Boneca	54	MCEE	342,1	1,87
Boneca	59	IMDM	1858,2	2,03
Boneca	60	IMDM	2721,1	1,95
Avelã	61	MCEE	1765,5	2,04
Avelã	62	MCEE	241,7	1,91
Avelã	67	IMDM	165,9	1,8
Avelã	68	IMDM	199,8	1,9
Bailarina	69	MCEE	642,7	1,95
Bailarina	70	MCEE	3155,3	2
Bailarina	75	IMDM	379,4	1,98
Bailarina	76	IMDM	365,9	1,94

6.2.5 Dados gerados na RT-PCR para PGT equina em endométrio cultivado *in vitro*

Os dados gerados em CT, normalizados e transformados segundo o cálculo de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) das amostras endometriais cultivadas com MCEE e IMDM, estão demonstrados na tabela 6.

Tabela 6 - Valores de CT e $2^{-\Delta\Delta CT}$ para gene codificador da proteína PGT equina, resultantes de RT-PCR de amostras teciduais endometriais cultivadas com meio condicionado embrionário equino (MCEE) ou Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)

Amostras endometriais	Tratamento	CT		$2^{-\Delta\Delta CT}$
		18S	PGT	
25	MCEE	15,3	34,2	0,2
26	MCEE	15,3	34,4	0,1
27	MCEE	16,0	35,2	0,1
37	MCEE	15,3	33,5	0,2
38	MCEE	15,9	35,3	0,2
45	MCEE	12,7	30,4	0,3
46	MCEE	12,5	31,2	0,2
53	MCEE	13,0	30,8	0,3
54	MCEE	13,7	33,2	0,1
61	MCEE	14,6	33,8	0,1
70	MCEE	15,5	35,1	0,1
34	IMDM	15,9	35,5	0,2
35	IMDM	15,5	34,6	0,2
43	IMDM	14,9	34,8	0,2
44	IMDM	14,7	33,3	0,2
51	IMDM	14,1	34,3	0,1
52	IMDM	13,8	33,6	0,1
59	IMDM	14,4	32,4	0,3
60	IMDM	15,2	34,0	0,2
67	IMDM	16,3	36,0	0,1
75	IMDM	16,3	34,9	0,2

Comparando as quantidades relativas do gene encontradas no experimento 1, no qual as amostras endometriais foram coletadas *in vivo*, com os resultados obtidos no experimento

2, que utilizou o cultivo endometrial, observa-se que houve queda de aproximadamente 10 vezes na expressão gênica relativa quando o tecido foi submetido a incubação por 24 horas, com temperatura e CO₂ controlados (Tabela 3 X Tabela 6). As condições de cultivo impostas às amostras endometriais e aos embriões foram baseadas em Ealy et al. (2010), que obtiveram resultados positivos quanto à estímulo da atividade gênica para PGHS₂ (prostaglandina H sintetase – tipo 2) de amostras endometriais cultivadas por 24 horas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), acrescido de 5% de BSA e antibiótico e antimicótico. Neste experimento foi utilizado um meio de cultivo diferente dos autores, porém mais enriquecido quanto a aminoácidos e vitaminas.

Além disso, a quantidade média de expressão do gene endógeno 18S permaneceu similar entre os tecidos *in vivo* e *in vitro*, dado este que apóia a viabilidade tecidual após incubação, já que genes de controle endógenos não devem variar nos tecidos ou células em investigação ou em resposta ao tratamento experimental (VANDESOMPELE et al., 2002).

Um dos fundamentos para o procedimento de cultivo endometrial deste experimento foi a retirada de possíveis influências maternas no perfil do RNAm para PGT durante início da gestação equina, simulada pela presença do meio condicionado embrionário durante incubação, e isolamento de somente fatores embrionários no controle deste gene. Assim sendo, considerando a queda na quantidade relativa do gene em estudo nas condições de incubação impostas no experimento, o RNAm para PGT equina apresentou baixa expressão quando o tecido foi submetido a cultivo *in vitro* por 24 horas, ou seja, possivelmente o gene para a PGT equina no endométrio necessita de estímulos de origem materna.

Uma vez que o ambiente intrauterino na égua, seja em fêmeas cíclicas ou aos 14 dias de gestação, é rico em proteínas (ZAVY et al., 1979; STEWART et al., 1995; CROSSET et al., 1996; CROSSET et al., 1998), certamente estas secreções protéicas endometriais possuem atividade estimulatória ou de sinalização para expressão gênica e síntese de proteínas, uma vez que a importação e exportação de produtos nucleares, como, no caso, RNAm, necessitam de sinalizações por substratos para abertura ou fechamento dos poros nucleares (FREITAS; CUNHA, 2009; MOORE, 2010).

Quanto ao perfil do gene, o meio condicionado embrionário (MCEE) não alterou a quantidade do RNAm para PGT no endométrio em final de diestro ($0,17 \pm 0,1$), comparado com as amostras incubadas com somente meio de cultivo IMDM ($0,16 \pm 0,8$) ($P=0,44$, Figura 10).

Figura 10 - Perfil do RNAm para proteína transportadora de prostaglandina (PGT) em endométrio de éguas aos 14 dias após ovulação, cultivado com meio condicionado embrionário equino (MCEE) ou Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM). Não foi observada diferença estatística entre os grupos ($P=0,44$)

Este resultado corrobora com o que foi observado no experimento 1, no qual a quantidade relativa de RNAm para PGT no endométrio em fase final de diestro (E_{14}) foi igual à no endométrio de 14 dias de gestação.

Dentre as hipóteses deste experimento tem-se que fatores embrionários diminuiriam as quantidades relativas do RNAm para PGT no endométrio; para impedir o transporte da $PGF_{2\alpha}$ endometrial para o sistema circulatório e, consequentemente, a luteólise, porém nos resultados de ambos experimentos 1 e 2 foi possível observar que não há alteração na abundância relativa do gene em estudo entre endométrio cíclico e gestante. Dessa forma, fatores embrionários não possuem a capacidade de interferir na codificação do gene para PGT.

Novamente é preciso ressaltar outra função da PGT, o transporte de PGE_2 (CHAN et al., 1998; SCHUSTER, 1998), essencial para a manutenção da gestação inicial em éguas (STOUT; ALLEN, 2001) cuja afinidade pela proteína transportadora é a mesma que a $PGF_{2\alpha}$ (CHAN et al., 1998; SCHUSTER, 2002).

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

1. É possível identificar o RNAm para a proteína PGT em tecido eqüino, utilizando *primers* elaborados à partir do exon 7 e 8,
2. A quantidade relativa de RNAm para a proteína transportadora de prostaglandina não varia entre endométrios de égua em cio, em diestro, final de diestro e gestação inicial,
3. O meio condicionado embrionário eqüino não altera a quantidade relativa de RNAm para proteína transportadora de prostaglandina no endométrio eqüino em final do diestro.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ADACHI, H.; SUZUKI, T.; ABE, M.; ASANO, N.; MIZUTAMARI, H.; TANEMOTO, M.; NISHIO, T.; ONOGAWA, T.; TOYOHARA, T.; KASAI, S.; SATOH, F.; SUZUKI, M.; TOKUI, T.; UNNO, M.; SHIMOSEGAWA, T.; MATSUNO, S.; ITO, S.; ABE, T. Molecular characterization of human and rat organic anion transporter OATP-D. **American Journal of Physiology Renal and Physiology**, v. 285, p. 1188-1197, 2003.
- AGUILAR, J.; FRASER, H. M.; WILSON, H.; CLUTTON, E.; SHAW, D. J.; WATSON, E. D. Temporal relationship between proliferating and apoptotic hormone-producing and endothelial cells in the equine corpus luteum. **Reproduction**, v. 132, p. 111-118, 2006.
- AL-ZI'ABI, M. O.; FRASER, H. M.; WATSON, E. D. Cell death during natural and induced luteal regression in mares. **Reproduction**, v. 123, p. 67-77, 2002.
- ALBIHN, A.; SAMPER, J.; ORIOL, J. G.; CROY, B. A.; BETTERIDGE, K. J. Production of capsular material by equine trophoblast transplanted into immunodeficient mice. **Havemeyer Foundation Monograph Series: Equine Embryo Transfer**, Finland, n. 3, p. 60-61, 2000.
- ALBIHN, A.; WAELCHLI, R.O.; SAMPER, J.; ORIOL, J. G.; CROY, B. A.; BETTERIDGE, K. J. Production of capsular material by equine trophoblast transplanted into immunodeficient mice. **Reproduction**, v. 125, p. 855-863, 2003.
- ALLEN, W. R. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. **Reproduction**, v. 121, p. 513-527, 2001.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ANTONINI, R.; TURNER, T. T.; PAUERSTEIN, C. J. The hormonal control of the guinea-pig corpus luteum during early pregnancy. **Fertility and Sterility**, v. 27, p. 1322-1325, 1976.
- AROSH, J. A.; BANUS, S. K.; KIMMINS, S.; CHAPDELAIN, P.; MCLAREN, L. A.; FORTIER, M. A. Effect of interferon- τ on prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling at the time of maternal recognition of pregnancy in cattle: evidence of polycine actions of prostaglandin E2. **Endocrinology**, v. 145, n. 11, p. 5280-5293, 2004.
- ASHWORTH, C. J.; ROSS, A. W.; FLINT, A. P. F. Interrelationships of protein and oestradiol secretion by conceptuses and endometrium from Meishan pigs on days 11 - 15 of pregnancy. **Animal Reproduction Science**, v. 43, p. 123-135, 1996.
- ASSELIN, E.; GOFF, A. K.; BERGERON, H.; FORTIER, M. A. Influence of sex steroids on the production of prostaglandins F₂ α and E2 and response to oxytocin in cultured epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 371-379, 1996.

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

BAKER, C. B.; ADAMS, M. H.; MCDOWELL, K. J. Lack of expression of alpha or omega interferons by the horse conceptus. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 44, p. 429-443, 1991. Supplement.

BALL B. A.; ALTSCHUL, M. In vitro development of 4- to 8-cell equine embryos cocultured with trophoblastic vesicles or oviductal explants. **Theriogenology**, v. 33, n. 1, 189, 1990.

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. **PNAS**, v. 100, n. 20, p. 11747-11752, 2003.

BANU, S. K.; AROSH, J. A.; CHAPDELAINE, P.; FORTIER, M. A. Expression of prostaglandin transporter in the bovine uterus and fetal membranes during pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 73, p. 230-236, 2005.

BANU, S. K.; LEE, J.; SATTERFIELD, M. C.; SPENCER, T. E.; BAZER, F.W.; AROSH, J. A. Molecular cloning and characterization of prostaglandin transporter in ovine endometrium: role for multiple cell signaling pathway in transport of prostaglandin F2 alpha. **Endocrinology**, v. 149, n. 1, p. 219-231, 2008.

BAO, Y.; PUCCI, M. L.; CHAN, B. S.; LU, R.; ITO, S.; SCHUSTER, V. L. Prostaglandin transporter PGT is expressed in cell types that synthesize and release prostanoids. **American Journal of Physiologic Renal Physiology**, v. 282, p. 1103-1110, 2002.

BÄR, M.; BÄR, D.; LEHMANN, B. Selection and validation of candidate housekeeping genes for studies of human keratinocytes - review and recommendations. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 129, p. 535-537, 2009.

BARREIRO, E. J. Ecosanóides. Parte I. **Caderno de Farmácia**, v. 3, n. ½, p. 67-83, 1987.

BATTUT, I.; COLCHEN, S.; FIENI, F.; TAINURIER, D.; BRUYAS, J. F. Success rates when attempting to nonsurgically collect equine embryos at 144, 156 or 168 hours after ovulation. **Equine Veterinary Journal**, v. 25, p. 60-62, 1998. Supplement.

BATTUT, I.; GRANDCHAMP DES RAUX, A.; NICAISE, J. L.; FIENI, F.; TAINURIER, D.; BRUYAS, J. F. When do equine embryos enter the uterine cavity: an attempt to answer? **Havemeyer Foundation Monograph Series: Equine Embryo Transfer**, Finland, n. 3, p. 66-68, 2000.

- BAZER, F. W.; THATCHER, W.W. Theory of the maternal recognition of pregnancy in swine based on estrogen controlled endocrine versus exocrine secretion of prostaglandin F_{2α} by the uterine endometrium. **Prostaglandins**, v. 14, p. 397-401, 1977.
- BETTERIDGE, K. J.; EAGLESOME, M. D.; MITCHELL, D.; FLOOD, P. F.; BERIAULT, R. Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens. . **Journal of Anatomy**, v. 135, n. 1, p. 191-209, 1982.
- BEZARD, J.; MAGISTRINI, M.; DUCHAMP, D.; PALMER, E. Chronology of equine fertilisation and embryonic development *in vivo* and *in vitro*. **Equine Veterinary Journal**, v. 21, p. 105-110, 1989.
- BLACKWELL, D.M.; SPETH, R.C.; MIRANDO, M.A. Morphometric Analysis of the Uterine Endometrium of Swine on Days 12 and 16 Postestrus. **The Anatomical Record Part A.**, 270A:59–66, 2003.
- BOERBOON, D.; BROWN, K. A.; VAILLANCOURT, D.; POITRAS, P.; GOFF, A. K.; WATANABE, K.; DORÉ, M.; SIROIS, J. Expression of key prostaglandin synthases in equine endometrium during late diestrus and early pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 391-399, 2004.
- CHADIO, S.; XYLOURI, E.; KALOGIANNIS, D.; MICHALOPOULOU, E.; EVAGELATOS, S.; MENEGATOS, I. Early pregnancy diagnosis in swine by direct radioimmunoassay for progesterone in blood spotted on filter paper. **Animal Reproduction Science**, v. 69, p. 65-72, 2002.
- CHAN, B. S.; SATRIANO, J. A.; PUCCI, M.; SCHUSTER, V. L. Mechanism of prostaglandin E₂ transport across the plasma membrane of hela cells and xenopus oocytes expressing the prostaglandin transporter “PGT”. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 12, p. 6689-6697, 1998.
- CHU, J. W. K.; SHAROM, F. J.; ORIOL, J. G.; BETTERIDGE, K. J.; CLEAVER, B. D.; SHARP, D. C. Biochemical changes in the equine capsule following prostaglandin-induced pregnancy failure. **Molecular Reproduction and Development**, v. 46, p. 286–295, 1997.
- CROFFORD, L.J. Prostaglandin biology. **Gastroenterology Clinics of North America**, 30(4):863-876, 2001.
- CROSSETT, B.; ALLEN, W. R.; STEWART, F. A 19 kDa protein secreted by the endometrium of the mare is a novel member of the lipocalin family. **Biochemistry Journal**, 320: 137-143, 1996.
- CROSSETT, B.; SUIRE, S.; HERRLER, A.; ALLEN, W. R.; STEWART, F. Transfer of a uterine lipocalin from the endometrium of the mare to the developing equine conceptus. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 483–490, 1998.

DAELS, P. F.; HUGHES, J. P. The normal estrous cycle. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine reproduction**. Pensilvania: Lea & Febiger, 1992. cap. 14, p.121-132.

DOIG, P. A.; WAELCHLI, R. O. Endometrial Biopsy. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine reproduction**. Pensilvania: Lea & Febiger, 1992. cap. 26, p.225-233.

DOUGLAS, R. H; GINTHER, O. J. Effect of prostaglandin F_{2α} on length of diestrus in mares. **Prostaglandins**, v. 2, p. 265–268, 1972.

DOUGLAS, R. H.; GINTHER, O. J. Concentration of prostaglandin F in uterine venous plasma of anaesthetized mares during the oestrous cycle and early pregnancy. **Prostaglandins**, v. 11, p. 251-260, 1976.

EALY, A. D.; EROH, M. L.; SHARP III, D. C. Prostaglandin H synthase Type 2 is differentially expressed in endometrium based on pregnancy status in pony mares and responds to oxytocin and conceptus secretions in explants culture. **Animal Reproduction Science**, v. 17, p. 99-105, 2010.

EDGERTON, L.A.; KAMINSKI, M.A.; SILVIA, W.J. Changes in uterine secretion of prostaglandin F_{2α} in response to oxytocin during the estrous cycle, early pregnancy and estrogen-induced pseudopregnancy in swine. **Biology of. Reproduction**, 55: 657-662, 1996.

ENDO, S.; NOMURA, T.; CHAN, B. S.; LU, R.; PUCCI, M. L.; BAO, Y. SCHUSTER, V. L. Expression of PGT in MDCK cell monolayers: polarized apical localization and induction of active PG transport. **American Journal of Physiologic Renal Physiology**, v. 282, p. 618–622, 2002.

FERREIRA-DIAS, G.; BRAVO, P. P.; MATEUS, L.; REDMER, D. A.; MEDEIROS, J. A. Microvasculature and angiogenic activity of equine corpora lutea throughout the estrous cycle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 30, p. 247-249, 2006.

FEI GAO, M. S.; WEI LEI, B. S.; HONG-LU, D.; SHI-JUN, H.; LI-MING, L.; ZENG-MING, Y. Differential expression and regulation of prostaglandin transporter and metabolic enzymes in mouse uterus during blastocyst implantation. **Fertility and Sterility**, v. 88, n. 2, p. 1256-1265, 2007.

FRANCZAK, A.; KOTWICA, G. Secretion of estradiol-17β by porcine endometrium and myometrium during early pregnancy and luteolysis. **Theriogenology**, v. 69, p. 283–289, 2008.

FREEMAN, D. A.; WEBER, J. A.; GEARY, R. T.; WOODS, G. L. Time of embryo transport through the mare oviduct. **Theriogenology**, v. 36, n. 5, p. 823-830, 1991.

FREEMAN, D. A.; WOODS, G. L.; VANDERWALL, D. K.; WEBER, J. A. Embryo-initiated oviductal transport in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 95, p. 535-538, 1992.

FREITAS, N.; CUNHA, C. Mechanisms and signals for the nuclear import of proteins. **Current Genomics**, v. 10, p. 550-557, 2009.

GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L.; TORRES, C. A. A.; GINTHER, O. J. Effect of PGE2 on uterine contractility and tone in mares. **Theriogenology**, v. 50, p. 989-999, 1998.

GINTHER, O. J. Local versus systematic uteroovarian relationships in farm animals. **Acta Veterinary Scand. Supplement**, v. 177, p. 103-115, 1981.

GINTHER, O. J. Fixation and orientation of the early equine conceptus. **Theriogenology**, v. 19, n. 4, p. 613-623, 1983.

GINTHER, O. J. Dynamic physical interactions between the equine embryo and uterus. **Equine Veterinary Journal**, v. 3, p. 41-47, 1985. Supplement.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; DONADEU, F. X.; BERGFELT, D. R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 239-257, 2003.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BAERWALD, A. R.; PIERSON, R. A. Systemic concentrations of hormones during the development of follicular waves in mares and women: a comparative study. **Reproduction**, v. 130, p. 379-388, 2005a.

GINTHER, O. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BEG, M. A. Regulation of Circulating Gonadotropins by the Negative Effects of Ovarian Hormones in Mares. **Biology of Reproduction**, v. 73, p. 315-323, 2005b.

GINTHER, O. J. A 40-year odyssey into the mysteries of equine luteolysis. **Theriogenology**, v. 72, p. 591-598, 2009.

GOFF, A. K.; PONTBRIAND, D.; SIROIS, J. Oxytocin stimulation of plasma 15-keto-13, 14-dihydro prostaglandin F-2 α during the oestrous cycle and early pregnancy in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 35, p. 253-260, 1987. Supplement.

GRIFFIN, P. G.; GINTHER, O. J. Effects of day of estrous cycle, time of day, luteolysis, and embryo on uterine contractility in mares. **Theriogenology**, v. 39, p. 997-1008, 1993.

HAGENBUCH, B.; MEIER, P. J. The superfamily of organic anion transporting polypeptides. **Biochemical Biophysical Acta**, v. 1609, n. 1, p. 1-18, 2003.

HARNEY, J. P.; BAZER, F. W. Effect of porcine conceptus secretory proteins on interestrus interval and uterine secretion of prostaglandins. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 277-284, 1989.

HEAP, R. B.; DEANESLY, R. Progesterone in systemic blood and placenta of intact and ovariectomized guinea-pigs. **Journal of Endocrinology**, v. 34, p. 417-423, 1966.

- HUGHES, J. P.; STABENFELDT, G. H.; EVANS, J. W. Estrous cycle and ovulation in the mare. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 161, n. 11, p. 1367-1374, 1971.
- IRVINE, C. H. G.; EVANS, M. J. Recent advances in reproductive endocrinology of the mare. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 27, n. 9, p. 176-180, 1979.
- IRVINE, C. H. G.; ALEXANDER, S. L. A novel technique for measuring hypothalamic and pituitary hormone secretion rates from collection of pituitary venous effluent in the normal horse. **Journal of Endocrinology**, v. 113, p. 183-192, 1987.
- KANAI, N.; LU, R.; SATRIANO, J. A.; BAO, Y.; WOLKOFF, A.W.; SCHUSTER, V. L. Identification and characterization of a prostaglandin transporter. **Science**, v. 268, p. 866-869, 1995.
- KANG, J.; CHAPDELAINE, P.; PARENT, J.; MADORE, E.; LABERGE, P. Y.; FORTIER M. A. Expression of human prostaglandin transporter in the human endometrium across the menstrual cycle. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90, n. 4, p. 2308-2313, 2005.
- KANG, J.; CHPDELAINE, P.; LABERGE, P. Y.; FORTIER, M. A. Functional characterization of prostaglandin transporter and terminal prostaglandin synthases during decidualization of human endometrial stromal cells. **Human Reproduction**, v. 21, n. 3, p. 592-599, 2006.
- KENNEY, R. M.; DOIG, P. A. Equine endometrial Biopsy. In: **Current therapy in theriogenology 2**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986. p. 723-729.
- KIEBORZ, K. R.; SILVIA, W. J.; EDGERTON, L. A. Changes in uterine secretion of prostaglandin F2 α and luteal secretion of progesterone in response to oxytocin during the porcine oestrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 45, p. 950-954, 1991.
- KLEIN, C.; SCOGGIN, K. E.; EALY, A. D.; TROEDSSON, M. H. T. Transcriptional profiling of equine endometrium during the time of maternal recognition of pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 83, n. 5, p. 874-886, 2010.
- KÖNIG, J.; SEITHEL, A.; GRADHAND, U.; FROMM, M. F. Pharmacogenomics of human OATP transporters. **Archives of Pharmacology**, v. 372, p. 432-443, 2006.
- KOTWICA, J.; DUSZA, L.; CIERESZKO, R.; OKRASA, S.; SCHAMS, D. Oxytocin plasma levels during spontaneous and cloprostenol-induced luteolysis in sows. **Animal Reproduction Science**, v. 22, p. 109-119, 1990.

KRZYMOWSKI, T.; STEFAŃCZYK-KRZYMOWSKA, S. Uterine blood supply as a main factor involved in the regulation of the estrous cycle--a new theory. **Reproductive Biology**, v. 2, n. 2, p. 93-114, 2002.

LA BONNARDIERE, C.; MARTINAT-BOTTE, F.; TERQUI, M.; LEFEVRE, F.; ZOUARI, K.; MARTAL, J.; BAZER, F. W. Production of two species of interferon by Large White and Meishan pig conceptuses during the peri-attachment period. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 91, p. 469-478, 1991.

LEITH, G. S.; GINTHER, O. J. Characterization of intrauterine mobility of the early equine conceptus. **Theriogenology**, v. 22, n. 4, p. 401-408, 1984.

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

LU, R.; KANAI, N.; BAO, Y.; SCHUSTER, V. L. Cloning, in vitro expression, and tissue distribution of a human prostaglandin transporter cDNA (hPGT). **Journal of Clinic Investigation**, v. 98, p. 1142-1149, 1996.

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

MCDOWELL, K. J.; SHARP, D. C.; GRUBAUGH, W.; THATCHER, W.W.; WILCOX, C. J. Restricted conceptus mobility results in failure of pregnancy maintenance in mares. **Biology of Reproduction**, v. 39, p. 340-348, 1988.

MERKL, M.; ULBRICH, S. E.; OTZDORFF, C.; HERBACH, N.; WANKE, R.; WOLF, E.; HANDLER, J.; BAUERSACHS, S. Microarray analysis of equine endometrium at days 8 and 12 of pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 83, n. 5, p. 874-886, 2010.
[doi:10.1095/biolreprod.110.085233](https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.085233).

MILNE, S. A.; JABBOUR, H. N. Prostaglandin (PG) F₂ Receptor Expression and Signaling in Human Endometrium: Role of PGF₂ α in Epithelial Cell Proliferation. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 4, p. 1825-1832, 2003.

MIKKAICHI, T.; SUZUKI, T.; TANEMOTO, M.; ITO, S.; ABE, T. The organic anion transporter (OATP) family. **Drug Metabol. Pharmacokinet**, v. 19, p. 171-179, 2004.

MOORE, M. From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. **Science**, v. 309, p. 1514-1518, 2010.

NETT, T. M. Estrogens. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine reproduction**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1992. Cap. 7, p. 65-68.

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, p. 77-87, 2007.

ORIOLE, J. G.; BETTERIDGE, K. J.; CLARK, A. J.; SHAROM, F. J. Mucin-like glycoproteins in the equine embryonic capsule. **M. Reproduction Development**, v. 34, n. 3, p. 255-265, 1993.

PERES, K. R. **Avaliação do uso do hormônio folículo estimulante equino (eFSH) visando a antecipação da estação reprodutiva e a a superovulação de éguas na fase de transição de primavera**. 2004. 232 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, Botucatu, 2004.

PETERS, K. E.; BERGFELD, E. G.; CUPP, A. S.; KOJIMA, F. N.; MARISCAL, V.; SANCHEZ, T.; WEHRMAN, M. E.; GROTTJAN, H. E.; HAMERNIK, D. L.; KITTOCK, R. J.; KINDER, J. E. Luteinizing hormone has a role in development of fully functional corpora lutea (CL) but is not required to maintain CL function in heifers. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 1248-1254, 1994.

PIERSON, R. A. Folliculogenesis and ovulation. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine reproduction**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1992. Cap. 17, p. 161-171.

POYSER, N. L. Prostaglandin production by the early pregnant guinea-pig uterus in relation to implantation and luteal maintenance, and the effect of oestradiol. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 72, p. 117-127, 1984.

PUCCI, M. L.; BAO, Y.; CHAN, B.; ITOH, S.; LU, R.; COPELAND, N. G.; GILBERT, D. J.; JENKINS, N. A.; SCHUSTER, V. L. Cloning of mouse prostaglandin transporter PGT cDNA: species-specific substrate affinities. **American Journal of Physiology**, v. 277, p. 734-741, 1999.

RICKETTS, S. W. Endometrial biopsy as a guide to diagnosis of endometrial pathology in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility, Supplement**, v. 23, p. 341-345, 1975.

ROZEN, S.; SKALETISKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods in Molecular Biology**, v. 132, p. 365-386, 2000.

SAINT-DIZIER, M.; CHOPINEAU, M.; DUPONT, J.; DAELS, P. F.; COMBARNOUS, Y. Expression and binding activity of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors in the primary corpus luteum during early pregnancy in the mare. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1743-1749, 2003.

SCAFIDI, S.; DOUGLAS, R. M.; FARAHANI, R.; BANASIAK, K. J.; HADDAD, G. G. Prostaglandin transporter expression in mouse brain during development and response to hypoxia. **Neuroscience**, v. 146, p. 1150-1157, 2007.

SCHUSTER, V. L. Molecular mechanisms of prostaglandin transport. **Annual Review of Physiology**, v. 60, p. 221–242, 1998.

SCHUSTER, V. L. Prostaglandin transport. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 68–69, p. 633–647, 2002.

SILVA, L. A.; GASTAL, E. L.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Changes in vascular perfusion of the endometrium in association with changes in location of the embryonic vesicle in mares. **Biology of Reproduction**, v. 72, p. 755–761, 2005.

SILVIA, P. J.; SQUIRES, E. L.; NETT, T. M. Changes in the hypothalamic-hypophyseal axis of mares associated with seasonal reproductive recrudescence. **Biology of Reproduction**, v. 35, p. 897–905, 1986.

SILVIA, W. J.; EDGERTON, L. A. Possible roles of oxytocin in regulating uterine prostaglandin secretion during the oestrus cycle and early pregnancy in sows. In: HAVEMEYER FOUNDATION WORKSHOP: FETOMATERNAL CONTROL OF PREGNANCY. **Proceedings...** 1999. p.10-12.

SIROIS, J.; DORÉ, M. The late induction of prostaglandin G/H synthase-2 in equine preovulatory follicles supports its role as a determinant of the ovulatory process. **Endocrinology**, v. 138, n. 10, p. 4427–4434, 1997.

SHARP, D. C.; ZAVY, M. T.; VERNON, M. W.; THATCHER, W. W.; BERGLUND, L. A. The role of prostaglandins in the maternal recognition of pregnancy in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 7, p. 269–282, 1984.

SHARP, D. C.; MCDOWELL, K. J.; WEITHENAUER, J.; FRANKLIN, K.; MIRANDO, M.; BAZER, F. W.; ALLEN, W. R.; ANTCZAK, D. F.; WADE, J. F. Is an interferon like protein involved in the maternal recognition of pregnancy in mares? **Equine Veterinary Journal**, v. 8, p. 7–9, 1989. Supplement.

SHARP, D. C.; THATCHER, M. J.; SALUTE, M. E.; FUCHS, A. R. Relationship between endometrial oxytocin receptors and oxytocin induced prostaglandin F_{2α} release during the oestrus cycle and early pregnancy in pony mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 109, p. 137–144, 1997.

SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Implantation mechanisms: insights from the sheep. **Reproduction**, v. 128, p. 657–668, 1996.

SPENCER, T. E.; BURGHARDT, R. C.; JOHSON, G. A.; BAZER, F. W. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 537–550, 2004.

STARBUCK, G. R.; SOUT, T. A. E.; LAMMING, G. E.; ALLEN, W. R.; FLINT, A. P. F. Endometrial oxytocin receptor and uterine prostaglandin secretion in mares during the oestrus cycle and early pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 113, p. 173-179, 1998.

STEWART, F.; CHARLESTON, B.; CROSSETT, B.; BARKER P. J.; ALLEN W. R. A novel uterine protein that associates with the embryonic capsule in equids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 105, p. 65-70, 1995.

STOUT, T. A. E.; ALLEN, W. R. Role of prostaglandins in intrauterine migration of the equine conceptus. **Reproduction**, v. 121, p. 771-775, 2001.

STOUT, T. A. E.; ALLEN, W. R. Prostaglandin E(2) and F(2 alpha) production by equine conceptuses and concentrations in conceptus fluids and uterine flushings recovered from early pregnant and dioestrous mares. **Reproduction**, v. 123, p. 261-268, 2002.

THERMO FISHER SCIENTIFIC Inc. Verso™ 1-Step QRT-PCR ROX kit. 2007. **Manual**. Disponível em: <www.thermo.com>. Acesso em: 20/02/2010.

Van POUCKE, M.; MELKEBEEK, V.; ERKENS, T.; VAN ZEVEEREN A.; COX, E.; PEELMAN, L. J. Molecular cloning and characterization of the porcine prostaglandin transporter (SLCO2A1): evaluation of its role in F4 mediated neonatal diarrhea. **BMC Genetics**, v. 10, n. 64, p. 1-9, 2009.

VANDERWALL, O. K.; WOODS, G. L.; WEBER, J. A.; LICHTENWALNER, A. B. Uterine transport of prostaglandin E₂-releasing simulated embryonic vesicles in mares. **Theriogenology**, v. 40, p. 13-20, 1993.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative TR-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. 1-12, 2002.

WATHES, D. C.; LAMMING, G. E. The oxytocin receptor, luteolysis and the maintenance of pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 49, p. 53-67, 1995. Supplement.

WATSON, E. D.; SERTICH, P. L. Prostaglandin production by horse embryo and the effect of co-culture of embryo with endometrium from pregnant mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, p. 331-336, 1989.

WEBER, J. A.; WOODS, G. L.; LICH TENWA ALNER, A. B. Relaxatory effect of prostaglandin E₂ on circular smooth muscle is isolated from the equine oviductal isthmus. **Biology of Reproduction Monograph**, v. 1, p. 125-130, 1995.

ZAVY, M. T.; BAZER, F. W.; SHARP, D. C.; WILCOX, C. J. Uterine luminal proteins in the cycling mare. **Biology of Reproduction**, v. 20, p. 689-698, 1979.

ZAVY, M. T.; BAZER, F. W.; THATCHER, W. W.; WILCOX, C. J. A study of prostaglandin F₂ alpha as the luteolysin in swine. V. Comparison of prostaglandin F, progestins, estrone and estradiol in uterine flushings from pregnant and nonpregnant gilts. **Prostaglandins**, v. 20, n. 5, p. 837-851, 1980.

ZHANG, Z.; PARIA, B.; DAVIS, D. L. Pig endometrial cells in primary culture: morphology, secretion of prostaglandins and proteins, and effects of pregnancy. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 3005-3015, 1991.

ZHU, T.; GOBEIL, F.; VAZQUEZ-TELLO, A.; LEDUC, M.; RIHAKOVA, L.; BOSSOLASCO, M.; BKAILY, G.; PERI, K.; VARMA, D. R.; ORVOINE, R.; CHEMTOB, S. Intracrine signaling through lipid mediators and their cognate nuclear G-protein-coupled receptors: a paradigm based on PGE₂, PAF, and PLA₁ receptors. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 84, p. 377-391, 2006.

ANEXOS

ANEXO A - PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES PARA A ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE COM BROMETO DE ETÍDIO

- **Solução trabalho de TBE (1X) (preparo de 1L)**

Foram medidos 100 mL de TBE 10X (pH=8,4; Ludwig Biotecnologia Ltda) em proveta graduada de 1L. Após, o volúmen foi completado para 1L com água ultra pura (água milli Q).

A solução trabalho de TBE sempre foi preparada imediatamente antes da utilização nas eletroforeses.

- **Gel de agarose 1% com brometo de etídio (preparo de 200mL)**

2g de agarose foi medido em balança de precisão para ser diluído em 100 mL de solução trabalho TBE 1X.

O TBE 1X foi adicionado à agarose cuidadosamente, para diminuir aderência de líquido e pó de agarose na parede do Becker. Após, o recipiente contendo a mistura foi tarado em balança de precisão para posterior adequação do peso.

A mistura, então, foi incubada em microondas sob alta potência, durante 1 minuto, observando e impedindo o início de fervura.

Após a completa diluição do pó de agarose, o Becker foi novamente pesado na balança de precisão, previamente tarada com o peso inicial da mistura. Assim, foi possível ajustar a diferença do peso após incubação no microondas com o peso inicial, completando com TBE 1X.

Em seguida, 10 µL de brometo de etídio foram acrescentados à solução de gel de agarose 1%.

As soluções de gel de agarose sempre foram preparadas imediatamente antes da utilização nas eletroforeses.

- **Gel de agarose 1,5% com brometo de etídio (preparo de 200mL)**

3g de agarose foi medido em balança de precisão para ser diluído em 100 mL de solução trabalho TBE 1X.

O TBE 1X foi adicionado à agarose cuidadosamente, para diminuir aderência de líquido e pó de agarose na parede do Becker. Após, o recipiente contendo a mistura foi tarado em balança de precisão para posterior adequação do peso.

A mistura, então, foi incubada em microondas sob alta potência, durante 1 minuto, observando e impedindo o início de fervura.

Após a completa diluição do pó de agarose, o Becker foi novamente pesado na balança de precisão, previamente tarada com o peso inicial da mistura. Assim, foi possível ajustar a diferença do peso após incubação no microondas com o peso inicial, completando com TBE 1X.

Em seguida, 10 µL de brometo de etídio foram acrescentados à solução de gel de agarose 1%.

As soluções de gel de agarose sempre foram preparadas imediatamente antes da utilização nas eletroforeses.

- **Tampão de carregamento (loading buffer) (preparo de 10mL)**

Para o preparo do tampão de carregamento, 2.5 g de Ficoll (Pharmacia) e 25 mg de Bromophenol Blue foram diluídos em 7 mL de água ultra pura (água milli Q). O volúmen foi completado para 10 mL com água ultra pura, em proveta graduada de 10 mL.

Após o preparo, a solução foi armazenada em tubo Falco de 15 mL, sob refrigeração (15°C), sendo mantida sob gelo picado durante utilização nas eletroforeses.

ANEXO B - FORMULAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO *ISCOVE'S MODIFIED DULBECCO'S MEDIUM* (IMDM)

http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Product-Technical-Resources/media_formulation.76.html

COMPONENTS	Molecular Weight	Concentration (mg/L)	mM
Amino Acids			
Glycine	75	30	0.4
L-Alanine	89	25	0.281
L-Arginine hydrochloride	211	84	0.398
L-Asparagine (freebase)	150	25	0.167
L-Aspartic acid	133	30	0.226
L-Cystine 2HCl	240	91.4	0.381
L-Glutamic Acid	147	75	0.51
L-Glutamine	146	584	4
L-Histidine hydrochloride-H ₂ O	210	42	0.2
L-Isoleucine	131	105	0.802
L-Leucine	131	105	0.802
L-Lysine hydrochloride	183	146	0.798
L-Methionine	149	30	0.201
L-Phenylalanine	165	66	0.4
L-Proline	115	40	0.348
L-Serine	105	42	0.4
L-Threonine	119	95	0.798
L-Tryptophan	204	16	0.0784
L-Tyrosine disodium salt	225	104	0.462
L-Valine	117	94	0.803
Vitamins			

Biotin	244	0.013	0.0000533
Choline chloride	140	4	0.0286
D-Calcium pantothenate	477	4	0.00839
Folic Acid	441	4	0.00907
Niacinamide	122	4	0.0328
Pyridoxal hydrochloride	204	4	0.0196
Riboflavin	376	0.4	0.00106
Thiamine hydrochloride	337	4	0.0119
Vitamin B12	1355	0.013	0.0000096
i-Inositol	180	7.2	0.04
Inorganic Salts			
Calcium Chloride (CaCl ₂) (anhyd.)	111	165	1.49
Magnesium Sulfate (MgSO ₄) (anhyd.)	120	97.67	0.814
Potassium Chloride (KCl)	75	330	4.4
Potassium Nitrate (KNO ₃)	101	0.076	0.000752
Sodium Bicarbonate (NaHCO ₃)	84	3024	36
Sodium Chloride (NaCl)	58	4500	77.59
Sodium Phosphate monobasic (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	138	125	0.906
Sodium Selenite (Na ₂ SeO ₃ ·5H ₂ O)	263	0.0173	0.0000658
Other Components			
D-Glucose (Dextrose)	180	4500	25
HEPES	238	5958	25.03
Phenol Red	376.4	15	0.0399
Sodium Pyruvate	110	110	1