Gisele Almeida Lima Veiga

**Expressão gênica dos receptores de estrógeno e
ocitocina no endométrio, miométrio e placenta
durante a gestação e parto em cadelas**

São Paulo
2008

Gisele Almeida Lima Veiga

**Expressão gênica dos receptores de estrógeno e
ocitocina no endométrio, miométrio e placenta
durante a gestação e parto em cadelas**

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

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Profa. Dra. Camila Infantsi Vannucchi

São Paulo
2008

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1987
FMVZ

Veiga, Gisele Almeida Lima

Expressão gênica dos receptores de estrógeno e ocitocina no endométrio, miométrio e placenta durante a gestação e parto em cadelas / Gisele Almeida Lima Veiga. – São Paulo : G. A. L. Veiga, 2008.
73 f. : il.

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

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

Orientador: Profa. Dra. Camila Infantsi Vannucchi.

1. Estrógeno. 2. Ocitocina. 3. Gestação. 4. Parto. 5. Cadelas. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização da expressão gênica dos receptores de estrógeno e ocitocina no útero, artéria uterina, corpo lúteo e placenta durante a gestação e parto em cadelas", protocolo nº870/2006, utilizando 40 (quarenta) cães, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Camila Infantsi Vannucchi, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião do dia 17/05/2006.

(We certify that the Research "Characterization of oxytocin and oestrogen receptors gene expression in uterus, uterine artery, corpus luteum and placenta during pregnancy and parturition in bitches", protocol number 870/2006, utilizing 40 (forty) dogs, under the responsibility of Profa. Dra. Camila Infantsi Vannucchi,, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting on the 17th of May of 2006).

São Paulo, 18 de maio de 2006

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Vice-Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: VEIGA, Gisele Almeida Lima

Título: Expressão gênica dos receptores de estrógeno e ocitocina no endométrio, miométrio e placenta durante a gestação e parto em cadelas

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Tereza e Manoel, que me ensinaram a amar e a lutar, e sempre me apoiaram e encorajaram, e a quem dedico este livro com todo o amor e gratidão.

Aos meus irmãos, Sérgio e Cláudio, que me ensinaram a ser humano e a lutar, e sempre me apoiaram e encorajaram, e a quem dedico este livro com todo o amor e gratidão.

Aos meus amigos, que me ensinaram a ser humano e a lutar, e sempre me apoiaram e encorajaram, e a quem dedico este livro com todo o amor e gratidão.

Aos meus professores, que me ensinaram a ser humano e a lutar, e sempre me apoiaram e encorajaram, e a quem dedico este livro com todo o amor e gratidão.

Aos meus colegas, que me ensinaram a ser humano e a lutar, e sempre me apoiaram e encorajaram, e a quem dedico este livro com todo o amor e gratidão.

Aos meus alunos, que me ensinaram a ser humano e a lutar, e sempre me apoiaram e encorajaram, e a quem dedico este livro com todo o amor e gratidão.

Aos meus pais, Tereza e Manoel, que me ensinaram a amar e a lutar, e sempre me apoiaram e encorajaram, e a quem dedico este livro com todo o amor e gratidão.

Aos meus irmãos, Sérgio e Cláudio, que me ensinaram a ser humano e a lutar, e sempre me apoiaram e encorajaram, e a quem dedico este livro com todo o amor e gratidão.

Aos meus amigos, que me ensinaram a ser humano e a lutar, e sempre me apoiaram e encorajaram, e a quem dedico este livro com todo o amor e gratidão.

Aos meus professores, que me ensinaram a ser humano e a lutar, e sempre me apoiaram e encorajaram, e a quem dedico este livro com todo o amor e gratidão.

Aos meus colegas, que me ensinaram a ser humano e a lutar, e sempre me apoiaram e encorajaram, e a quem dedico este livro com todo o amor e gratidão.

Aos meus alunos, que me ensinaram a ser humano e a lutar, e sempre me apoiaram e encorajaram, e a quem dedico este livro com todo o amor e gratidão.

Aos meus pais, Tereza e Manoel, que me ensinaram a amar e a lutar, e sempre me apoiaram e encorajaram, e a quem dedico este livro com todo o amor e gratidão.

Aos meus irmãos, Sérgio e Cláudio, que me ensinaram a ser humano e a lutar, e sempre me apoiaram e encorajaram, e a quem dedico este livro com todo o amor e gratidão.

Aos meus amigos, que me ensinaram a ser humano e a lutar, e sempre me apoiaram e encorajaram, e a quem dedico este livro com todo o amor e gratidão.

Aos meus professores, que me ensinaram a ser humano e a lutar, e sempre me apoiaram e encorajaram, e a quem dedico este livro com todo o amor e gratidão.

Aos Meus Pais...

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sergio e Maria que sempre me apóiam em minhas decisões, e sempre me ajudam a conquistar todos os meus objetivos e que apesar das dificuldades me permitiram realizar um grande sonho: a Medicina Veterinária.

Às minhas irmãs Patrícia e Daniela e à minha sobrinha querida Giovanna, que diante de toda correria sempre respeitaram minha ausência e meus momentos de solidão.

Às minhas amigas Cinthia e Juliana, pelo total apoio. Sem vocês do meu lado, sempre me incentivando, talvez eu não tivesse forças para levantar depois da queda inicial e tentar de novo e, com toda certeza nada disso estaria acontecendo.

Ao Prof. Dr. José Antônio Visintin e à Profa. Mayra Elena que me disponibilizaram o Laboratório de Biologia Molecular do VRA, para a realização desse experimento.

À Profa. Dra. Paula Papa e Luciana Alves que me abriram as portas do Departamento de Anatomia da FMVZ/USP.

Ao Prof. Dr. José Antunes Rodrigues e ao Prof. Dr. Hélio Vannucchi da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, pela ajuda com as dosagens de ocitocina.

À Dra. Priscila Viau Furtado, do Laboratório de Dosagens Hormonais da FMVZ/USP pelas dosagens de estrógeno.

Ao Dr. Felipe Braga e à Dra. Paula Ripamonte pela ajuda com o desenho dos primers.

Aos pós-graduandos do VRA, principalmente do Laboratório de Fecundação *in vitro*, Clonagem e Transgenia Animal: Mariana, Alessandra, Marcelo, Flávia, Renata, Camilla, Maran, Fabíola, Paulo, Gabriel, Zé Nélío, Rodrigo, em especial ao Marcílio a quem agradeço pela ajuda com as análises estatísticas desse trabalho e ao José Sergio (Zeca) que sempre me ajudou com os RNAs, cDNAs e etc...Zeca obrigada por tudo mesmo!!! A todos vocês eu só tenho a agradecer pela amizade e pela maneira como fui recebida na "casa de vocês" e saibam que agora sim, sinto-me à vontade em dizer que faço parte dela também!

Aos funcionários do VRA, em especial ao Miguel e Maria Amélia, pela ajuda com o nitrogênio líquido e pelas ótimas conversas de manhã.

A todos os veterinários de clínicas particulares que contribuíram para coleta de algumas amostras: Renata Refundini, Renato (Zeca), Ricardo, Rodrigo, Bia Helena e não poderia deixar de citar novamente a ajuda incondicional que me foi dada pela minha grande amiga Juliana Franco Frignani, sempre me ligando para avisar das gestantes e, mesmo sem nem saber direito o que eu estava fazendo, ficava comigo até tarde dissecando o material no centro cirúrgico. Já você não faz idéia do quanto a sua amizade é importante.

Às minhas mais novas amigas Garutti (Tatiana) e Dra. Pinto (Camila), companheiras de todas as tardes na Unisa, sempre me incentivando, me dando atenção e me fazendo rir muuuuuittoooo das suas "competições auxiliaadoras". Vocês são muito especiais...e a única coisa a dizer é RRRRRÁÁÁÁÁÁÁÁÁÁ!!!!!!

A todos os professores, funcionários, estagiários, monitores, mas especialmente aos residentes antigos e novos do Hospital Veterinário da Unisa, em especial ao Rafael Magdanelo (meu irmãozinho), Robertinha (Cabeça), Brenda Navarro, Carinne Brunnato, Fabio Tanga, Igor Quirico, Caroline Rodrigues, Caroline Sanchez, Marta Fleury, Carol Ghirelli, Fabricio Lorenzini, Fernando Schnauzer, Maurício Flocke (Pop), Gustavo Tiaen, Caroline Carramenha, Fernanda Puga, Camila Santiago, Laura Rocco, Vanessa Guedes, Natália (Naty), Fê Laudisio, Marco Baronne, Cláudio Rodrigues e Zé. Vocês não imaginam o quanto vocês são especiais para mim, e o quanto foi e é prazeroso trabalhar com vocês. ("Xentiiii, esse hospital é tuuuudooo!!!!").

As minhas companheiras e hoje grandes amigas de toda e qualquer hora Carol, Pri, Fê (Carioca), Lu e Jé pelas lições de como *viver, curtir e ser feliz*. Nossa amizade fortaleceu no momento em que tudo simplesmente desabou...mas vocês como sempre, fizeram tudo virar uma grande festa!

Ao Trio mais unido que eu conheço: as famosas **MENINAS** – Cris, Li e Jaque. Vocês, ou melhor, nós somos a prova de que a amizade entre pessoas tão diferentes nunca deve ser imposta e, que um verdadeiro GRUPO só se fortalece com o passar do tempo e com convívio.....seja ele durante os rodízios nas madrugadas com as ovelhas do VRA, com as vacas em uma cidadezinha do interior, nas cesarianas ou até mesmo nas sextas do CA. Podem ter certeza de que todos os momentos e as trocas de experiências serão guardados como lições profissionais e de vida para sempre inesquecíveis...

À Dra. Marcella Pecora Milazzotto responsável por grande parte desse trabalho. Mazza, você com sua paciência tibetana, seu otimismo e empolgação, me ensinou em poucas palavras que o excesso de cobrança com a gente mesmo nos torna cada vez menores e, que acreditar que somos capazes é o segredo para as grandes vitórias.

Às Professoras **Katia Stracieri** e **Andrea Barbosa**, pessoas que tenho um carinho todo especial, responsáveis por tudo o que já conquistei e pelo meu envolvimento com a carreira acadêmica. Obrigada pela confiança em mim depositada e por permitir que eu faça parte desse grande time.

Em especial à Profa. Dra. Camila, minha orientadora, “*psicóloga*”, “*psiquiatra*”, “*terapeuta*”, “*conselheira*”, e “*irmã mais velha*” mais acima de tudo uma grande amiga. Prô, nesse momento as palavras faltam, mas vou tentar mesmo assim... Parece que foi ontem quando me deparei no centro cirúrgico com aquelas PittBulls e Rottweillers com seus pedículos desagradáveis, localizados quase que na coluna vertebral e, você com toda a sua paciência me ensinou que os desafios podem ser grandes, mas as conquistas serão maiores. Desde essa época, saiba que tem a minha total admiração e gratidão. A cada dia, a cada conversa, a cada ensinamento você não passa apenas informações, mas contribui, e muito, para a minha formação. Obrigada por ter acreditado (quando nem eu acreditava mais) que um dia eu conseguiria, que eu seria capaz... Táí Prô o resultado... a vitória é nossa... e eu não poderia terminar sem dizer que: “Prô você é”

RESUMO

VEIGA, G. A. L. **Expressão gênica dos receptores de estrógeno e ocitocina no endométrio, miométrio e placenta durante a gestação e parto em cadelas.** [Expression of the canine estrogen and oxytocin receptor genes in the endometrium, myometrium and placenta during pregnancy and parturition]. 2008. 73 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

As diversas interações hormonais durante a gestação e parto na espécie canina são parcialmente conhecidas. A resposta dos tecidos frente ao estímulo hormonal é dependente da expressão gênica de seus receptores, bem como da concentração local dos hormônios. Desta maneira, o presente estudo apresentou como objetivos: caracterizar a expressão gênica dos receptores de estrógeno e ocitocina no endométrio, miométrio e placenta, correlacionando com as concentrações séricas dos respectivos hormônios durante a gestação e o parto. As cadelas gestantes foram alocadas em 4 grupos de acordo com a idade gestacional: até 20 dias de gestação (grupo 1, n=11), de 20 a 40 dias de gestação (grupo 2, n=12), de 40 a 60 dias de gestação (grupo 3, n=12) e em pródromos do parto (grupo 4, n=11). As cadelas dos grupos 1, 2 e 3 foram submetidas à ovário-histerectomia e as cadelas do grupo 4, à cesariana seguida da ovário-histerectomia. Amostras de endométrio, miométrio e placenta foram colhidas, bem como amostras de sangue para obtenção do soro sanguíneo. A extração do RNA total e a confecção do cDNA das amostras foram realizadas a partir de kits comerciais. As reações da PCR em tempo-real foram realizadas para os genes (RNAm) do receptor do estrógeno α (RE α) e receptor da ocitocina (OTR), utilizando o 18S e RPS5 como controles endógenos. As dosagens hormonais foram realizadas por radioimunoensaio. A expressão gênica do RNAmRE α e RNAmOTR diferiram de acordo com o tecido e período gestacional. No endométrio, a expressão do RNAmRE α foi constante durante toda a gestação e parto, enquanto que o RNAmOTR foi mais expresso no grupo 4. Em relação ao miométrio, a expressão do RNAmRE α foi maior nos grupos 2 e 4, já o RNAmOTR foi mais expresso nos grupos 3 e 4. Na placenta, o RNAmRE α apresentou maior expressão nos grupos 1 e 2, e o RNAmOTR não sofreu mudanças durante a gestação e o parto. As concentrações séricas de ocitocina mantiveram-se

constantes, enquanto os níveis estrogênicos aumentaram a partir de 40 dias de gestação até o início do parto. Conclui-se que a expressão gênica dos RE α e OTR diferem de maneira temporal durante a gestação e o parto nos tecidos avaliados e as concentrações séricas de ocitocina não interferem na expressão gênica de tais receptores, enquanto os níveis de estrógeno elevam-se ao final da gestação, sendo possível atribuir a tal perfil a diferente modulação dos RE α e OTR nos tecidos estudados.

Palavras-chave: Estrógeno. Ocitocina. Gestação. Parto. Cadelas.

ABSTRACT

VEIGA, G. A. L. **Expression of the canine estrogen and oxytocin receptor genes in the endometrium, myometrium and placenta during pregnancy and parturition** [Expressão gênica dos receptores de estrógeno e ocitocina no endométrio, miométrio e placenta durante a gestação e parto em cadelas]. 2008. 73 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Several hormone interactions during pregnancy and parturition in the canine species are still unknown. Tissue response to hormonal stimulation is dependent on the expression of its receptor gene, as well as of the local hormonal concentration. Hence, the present study aimed to characterize the expression of the canine estrogen and oxytocin receptor genes in the endometrium, myometrium and placenta and its correlation with blood levels of the referred hormones during pregnancy and parturition. Pregnant bitches were allocated into 4 groups according to the gestational period: up to 20 days of pregnancy (Group 1, n=11), from 20 to 40 days of pregnancy (Group 2, n=12), from 40 to 60 days of pregnancy (Group 3, n=12) and in the early stage of labor (Group 4, n=11). Bitches from groups 1, 2 and 3 were subjected to ovariectomy and bitches from group 4 were submitted to cesarian section followed by ovariectomy. Endometrium, myometrium and placenta samples were collected, as well as blood samples. Extraction of the total RNA and cDNA synthesis were accomplished through commercial kits. The real-time PCR reactions were performed for the estrogen- α (RE α) and oxytocin (OTR) receptor genes, using the 18S and RPS5 as control. Estrogen and oxytocin hormonal assays were performed by radioimmunoassay. The results of the mRNA RE α and mRNA OTR gene expression differed among gestational periods and tissues. In the endometrium, mRNA RE α expression was homogeneous during pregnancy and labor, whereas group 4 presented a higher expression of mRNA OTR. In relation to the myometrium, mRNA RE α expression increased in groups 2 and 4, whilst mRNA OTR expression was higher in groups 3 and 4. In the placenta, groups 1 and 2 presented the highest mRNA RE α expression and the mRNA OTR expression did not change during pregnancy and parturition. Blood concentration of oxytocin remained constant, while estrogen levels increased from 40 days of gestation to labor. In conclusion, the

expression of canine RE α and OTR genes differed temporally during pregnancy and parturition in the experimented tissues. Oxytocin blood levels did not influence the receptor gene expression, whereas estrogen concentrations increased at the end of the gestation, possible modulating RE α and OTR expression in the canine endometrium, myometrium and placenta.

Keywords: Estrogen. Oxytocin. Pregnancy. Parturition. Bitches.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1	ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	32
3.2	COLHEITA DAS AMOSTRAS.....	33
3.3	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	34
	3.3.1 Isolamento do RNA total.....	34
	3.3.1.1 Placenta.....	34
	3.3.1.2 Endométrio e miométrio.....	34
	3.3.2 Quantificação do RNA total.....	35
	3.3.3 Síntese do cDNA.....	35
	3.3.4 Reação de amplificação por PCR em tempo real.....	36
	3.3.5 Dosagens hormonais.....	37
	3.3.5.1 Dosagem de estrógeno.....	37
	3.3.5.2 Dosagem de ocitocina.....	37
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
4	RESULTADOS	41
4.1	ANÁLISE DAS VARIÂNCIAS DOS CONTROLES ENDÓGENOS NOS DIFERENTES TECIDOS.....	42
4.2	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DO RE α E OTR NA PLACENTA.....	43
4.3	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DO RE α E OTR NO ENDOMÉTRIO.....	46
4.4	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DO RE α E OTR NO MIOMÉTRIO.....	48
4.5	ANÁLISE DAS DOSAGENS HORMONAIS.....	52
	4.5.1 Dosagem de estrógeno.....	52

	<i>4.5.2 Dosagem de ocitocina.....</i>	52
5	DISCUSSÃO	55
6	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Curva de amplificação e dissociação do controle endógeno 18S.....	41
Figura 2-	Curva de amplificação e dissociação do controle endógeno RPS5.....	41
Figura 3-	Curva de amplificação e dissociação do RNAmRE α	42
Figura 4-	Curva de amplificação e dissociação do RNAmOTR.....	42
Figura 5-	Expressão gênica do RNAmRE α em relação ao 18s na placenta nos grupos 1, 2, 3 e 4.....	44
Figura 6-	Expressão gênica do RNAmRE α em relação ao RPS5 na placenta nos grupos 1, 2, 3 e 4.....	44
Figura 7-	Expressão gênica do RNAmOTR em relação ao 18s na placenta nos grupos 1, 2, 3 e 4.....	45
Figura 8-	Expressão gênica do RNAmOTR em relação ao RPS5 na placenta nos grupos 1, 2, 3 e 4.....	45
Figura 9-	Expressão gênica do RNAmRE α em relação ao 18s no endométrio nos grupos 1, 2, 3 e 4.....	46
Figura 10-	Expressão gênica do RNAmRE α em relação ao RPS5 no endométrio nos grupos 1, 2, 3 e 4.....	46
Figura 11-	Expressão gênica do RNAmOTR em relação ao 18s no endométrio nos grupos 1, 2, 3 e 4.....	47

Figura 12-	Expressão gênica do RNAmOTR em relação ao RPS5 no endométrio nos grupos 1, 2, 3 e 4.....	47
Figura 13-	Expressão gênica do RNAmREα em relação ao 18s no miométrio nos grupos 1, 2, 3 e 4.....	48
Figura 14-	Expressão gênica do RNAmREα em relação ao RPS5 no miométrio nos grupos 1, 2, 3 e 4.....	48
Figura 15-	Expressão gênica do RNAmOTR em relação ao 18s no miométrio nos grupos 1, 2, 3 e 4.....	49
Figura 16-	Expressão gênica do RNAmOTR em relação ao RPS5 no miométrio nos grupos 1, 2, 3 e 4.....	49
Figura 17-	Expressão gênica do RNAmREα e RNAmOTR na placenta, endométrio e miométrio em relação ao grupo 1.....	50
Figura 18-	Expressão gênica do RNAmREα e RNAmOTR na placenta, endométrio e miométrio em relação ao grupo 2.....	50
Figura 19-	Expressão gênica do RNAmREα e RNAmOTR na placenta, endométrio e miométrio em relação ao grupo 3.....	51
Figura 20-	Expressão gênica do RNAmREα e RNAmOTR na placenta, endométrio e miométrio em relação ao grupo 4.....	51
Figura 21-	Concentrações séricas de estrógeno nos grupos 1, 2, 3 e 4.....	52
Figura 22-	Concentrações séricas de ocitocina nos grupos 1, 2, 3 e 4.....	53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Idade gestacional (dias) nos grupos experimentais 1, 2, 3 e 4.....	33
Quadro 2-	Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores e suas temperaturas de anelamento.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Variâncias apresentadas pelos controles endógenos 18S e RPS5 na análise de expressão gênica na placenta.....	43
Tabela 2- Variâncias apresentadas pelos controles endógenos 18S e RPS5 na análise de expressão gênica no miométrio.....	43
Tabela 3- Variâncias apresentadas pelos controles endógenos 18S e RPS5 na análise de expressão gênica no endométrio.....	43

[illegible]

1 INTRODUÇÃO

A fisiologia e endocrinologia da gestação e parto nos animais domésticos contêm eventos ainda desconhecidos, os quais estão se tornando passíveis de reconhecimento com o emprego de novas técnicas de biologia molecular. Na espécie canina, não se conhece detalhadamente as interações endócrinas e suas conseqüentes alterações fisiológicas durante todo o período gestacional e no momento do parto. A interação dos hormônios com seus receptores é responsável por mudanças convergentes. Entretanto, a síntese e secreção, bem como a ação hormonal não são plenamente conhecidas durante a gestação. A resposta do tecido-alvo à ação de certos hormônios é determinada tanto pela presença de receptores específicos quanto por sua concentração local. Nos últimos anos, poucos foram os estudos concernentes à expressão gênica dos principais receptores hormonais frente às mudanças uterinas que ocorrem durante a gestação e parto. Em relação à espécie canina, não há até o momento pesquisas que elucidem tais mecanismos.

O período gestacional é caracterizado por altas concentrações de progesterona, hormônio fundamental para a manutenção da gestação, por promover o desenvolvimento endometrial, manter a integridade placentária, reduzir a atividade miometrial e a sensibilidade à ocitocina, tornando o útero quiescente (CONCANNON, 1986). Durante o curso da gestação, a produção de estrógeno ocorre em vários tecidos e sua ação, em contraposição aos estímulos progesteracionais, contribui para o crescimento uterino necessário para o bem sucedido desenvolvimento embrionário e fetal. A produção placentária de estrógeno, em bovinos e mulheres gestantes, é precípua para a viabilidade fetal. Já em ovelhas, a produção de estrógeno na placenta é induzida somente pelo cortisol fetal, como estímulo para contração miometrial e liberação de prostaglandina no parto (DOBSON et al., 1993; WOOD, 1999; KINDAHL, 2002). O receptor de estrógeno (RE) e o RNAmRE estão presentes na musculatura lisa uterina e nas células ao redor dos vasos sangüíneos do miométrio, indicando o envolvimento estrogênico na contratilidade do miométrio e fluxo sangüíneo durante a gestação (WU et al., 1996a).

O principal evento endócrino durante o parto refere-se ao rápido aumento da relação estrógeno/progesterona placentários. A queda dos níveis de progesterona e

o aumento de estrógeno são possivelmente as principais causas para o descolamento de placenta, dilatação da cérvix e aumento da contratilidade uterina (CONCANNON, 1986). O estrógeno estimula o parto por ampliar a expressão dos genes responsáveis pela excitabilidade e contração miometrial, aumentando no decorrer da gestação a sensibilidade uterina à ocitocina (FUCHS, 1983). Em ovelhas, a atuação do estrógeno associada à queda da atividade progestacional ao final da gestação é responsável por induzir a expressão dos receptores de ocitocina (ROT) durante o trabalho de parto (LACHER et al., 1995). O controle do RNAmROT no útero é mediado pelo REalfa (RE α), este último, por sua vez, é regulado pela queda da progesterona (MURATA et al., 2003). Além da importante expressão no miométrio e glândula mamária, o ROT também está presente no endométrio, placenta, ovário, testículos, epidídimo, ductos deferentes, timo, coração e rim, bem como no tecido cerebral (KIMURA, 2003).

A ativação dos ROT nos tecidos alvos está na dependência das concentrações locais de ocitocina. Por esse motivo, a ação da ocitocina circulante nos receptores miometriais é controversa em humanos, pois as concentrações séricas permanecem baixas durante toda a gestação e parto (MITCHELL et al., 1998). Por outro lado, as concentrações plasmáticas de ocitocina elevam-se no período que antecede o parto em primatas, demonstrando a ação endócrina e não autócrina ou parácrina da ocitocina (HIRST et al., 1993).

Em suínos, os altos níveis séricos de estrógeno ao final da gestação induzem a transcrição do RNAmROT no endométrio. Neste local, a ação da ocitocina é responsável pela liberação de PGF2 α , promovendo a luteólise pré-parto (OPONOWICZ et al., 2006). A expressão do RNAmOTR no miométrio é extremamente importante ao final da gestação em ratas, tornando-se máxima no parto. A ligação da ocitocina ao seu receptor promove aumento do cálcio intracelular e consequente contração miometrial. Já na placenta, a expressão do RNAmOTR mantém-se baixa durante toda a gestação (CHAN et al., 1993).

O estudo da expressão gênica dos receptores hormonais bem como o perfil endócrino nas diferentes fases da gestação e parto poderão esclarecer a razão para diferentes respostas nos vários tecidos, frente ao estímulo hormonal. A partir destes conhecimentos, será possível a aplicação terapêutica de determinados hormônios em situações fisiológicas ou complicações durante a gestação e o parto.

T-C-G-A-T-C-G-A-T·A-T-C-G-A-T-C-G-A-T··A-T-C-G-A-T-C-G-A-T·A-T-C-G-A-T-C-G-A-T·A-T-C-G-A-T-C-G-A-T·A-T-C-G-A-T-C-G-A-T·A-T-C-G-A-T-C-G-A-T·A-T-C-G-A-T-C-G-A-T·A-T-C-G-A

2 REVISÃO DE LITERATURA

A gestação e o parto são eventos caracterizados por mudanças hormonais que resultam no desenvolvimento bem sucedido e nascimento de um ou mais membros de uma mesma espécie (CHALLIS; LYE, 1994). Neste particular sentido, os hormônios esteróides (progesterona e estrógeno) desempenham importante papel na manutenção da gestação e no início do trabalho de parto, por meio da constante modulação da excitabilidade e contratilidade miométrial (MESIANO et al., 2002).

A secreção pituitária de hormônios luteotróficos, como o hormônio luteinizante (LH) e a prolactina, é responsável pela manutenção dos níveis elevados de progesterona durante a gestação (CONCANNON, 1980). A progesterona promove o desenvolvimento endometrial e a integridade placentária e previne o parto por reduzir a atividade miometrial e a sensibilidade à ocitocina, desta maneira, proporciona a quiescência miometrial (CONCANNON, 1986; MESIANO et al., 2002). Em contrapartida, o rápido aumento da relação estrógeno/progesterona placentários é o principal evento endócrino responsável pelo desencadeamento do parto, ou seja, a queda dos níveis de progesterona e o aumento estrogênico são provavelmente as maiores causas de descolamento placentário, dilatação da cérvix e aumento da contratilidade uterina (CONCANNON, 1986).

O estrógeno livre circulante pode se apresentar sob a forma de várias substâncias biologicamente ativas, tais como os hormônios 17β -estradiol, o sulfato de estrona e estriol (KINDAHL, 2002). Estudos prévios demonstram que na espécie bovina à segunda metade da gestação, a produção de estrógeno é essencialmente placentária e, portanto, a dosagem estrogênica nesta fase pode refletir a função placentária e, conseqüentemente, a viabilidade fetal (DOBSON et al., 1993; KINDAHL, 2002). Em ovelhas, o cortisol fetal ao final da gestação induz a ativação das enzimas 17α -hidroxilase e $17,20$ -liase placentárias, resultando no aumento dos níveis de estrógeno e diminuição da progesterona. Os referidos eventos estimulam a contração do miométrio, associada à secreção de prostaglandina no parto (WOOD, 1999). Na espécie humana, o estrógeno também é produzido na membrana fetal e placenta e sua concentração aumenta no momento do parto (MITCHELL et al., 1984; CHIBBAR et al., 1995). Todavia, na espécie canina, a concentração de estrógeno

aumenta lentamente durante a gestação, alcançando valores máximos de 20-30 ng/mL antes do parto, inferiores aos encontrados no final do proestro (CONCANNON, 1975). O aumento na síntese de esteróides ovarianos é provavelmente resultado do aumento na concentração de prolactina após 30 dias de gestação (CONCANNON, 2001). A origem do estrógeno nas cadelas parece ser particularmente ovariana, com menor dependência placentária. Portanto, a mensuração deste hormônio à metade da gestação não exprime informação a respeito da gestação e, por conseguinte, da viabilidade fetal (HOFFMANN et al., 1994; CONCANNON; VERSTEGEN, 1999; ONCLIN et al., 2002). Desta maneira, a ovariectomia em qualquer momento do período gestacional determina a reabsorção embrionária ou abortamento (SOKOLOWSKY, 1974).

A distribuição dos receptores hormonais nos tecidos uterinos é crucial para predizer sua provável ação local (AMSO et al., 1994). Os receptores de estrógeno (RE) podem ser classificados em dois subtipos (α e β) e o grau de expressão destes receptores pode determinar a intensidade da atividade estrogênica (TELLERIA et al., 1998). Os RE α e RE β são transcritos por diferentes genes e foram caracterizados a partir do útero de mulheres gestantes e próstata de ratos, respectivamente (GREENE et al., 1986; KUIPER et al., 1996). Os subtipos de RE são expressos diferencialmente em vários tecidos uterinos durante a gestação e parto, como no endométrio e miométrio, bem como nos folículos ovarianos e no corpo lúteo de várias espécies (KUIPER et al., 1997; SAUNDERS et al., 1997; TESSIER et al., 2000). Telleria et al. (1998) demonstraram que em ratas o RNAmRE α é expresso nos folículos ovarianos pequenos e em crescimento, porém com sinalização mais abundante no corpo lúteo. A expressão do RNAmRE β no corpo lúteo é semelhante durante toda a gestação, declinando no momento do parto; enquanto a expressão do RNAmRE α é baixa ao início da gestação, apresenta expressão máxima à metade da gestação, reduzindo no momento do parto.

Segundo Wu et al. (1996a), tanto o RE quanto o RNAmRE estão presentes na musculatura lisa do útero e em células ao redor dos vasos sangüíneos do miométrio, o que indica o envolvimento do estrógeno na contratilidade do miométrio e fluxo sangüíneo durante a gestação. O aumento do RNAmRE no miométrio é decorrente da elevação do cortisol fetal ao final da gestação em ovelhas, fato que caracteriza maior atividade do RE e, como consequência, aumento da resposta do miométrio a este hormônio durante o trabalho de parto.

A expressão do RNAmRE α é mediada por mecanismos distintos do RNAmRE β nas diferentes espécies. A queda dos níveis de progesterona aumenta a síntese, transcrição e expressão do RNAmRE α , enquanto que a indução do RNAmRE β depende de outros fatores ovarianos ou fatores feto-placentários (MURATA et al., 2003). A progesterona atua suprimindo a expressão do RNAmRE α em vários tecidos de ratos. Entretanto, tal ação inibitória não foi evidenciada no miométrio e endométrio de ovelhas (WU et al., 1996a). A expressão dos receptores de estrógeno, progesterona e ocitocina no endométrio de ruminantes é alterada por produtos embrionários, como o interferon-tau (SPENCER et al., 1995 a,b; SPENCER; BAZER, 1996). A presença do embrião impede o aumento dos receptores de estrógeno e ocitocina no útero e impede a liberação de prostaglandina F2 α (PGF2 α) (WHATES; HANON, 1993). Até o momento, não existem relatos do mecanismo de reconhecimento materno em cadelas como há nas demais espécies. Portanto, a regulação hormonal com referência aos esteróides e ocitocina durante a gestação é ainda propósito de pesquisa na endocrinologia canina.

Segundo Soloff (1975), o estrógeno atua diretamente sobre a expressão de receptores de ocitocina (OTR) em ratas e coelhas não-gestantes. O RE α é o subtipo mais predominante no útero de ratas durante a gestação e parto e, desta maneira, é o receptor envolvido diretamente no aumento do OTR (LARCHER et al., 1995). Os níveis de RNAmRE α aumentam gradualmente no útero durante a gestação até o parto, no entanto, a máxima expressão do RNAmOTR ocorre no momento do parto. O fato do RE α ser o receptor predominante no útero durante a gestação e ocorrer aumento concomitante do RNAmRE α e RNAmOTR no parto, sugere que o RE α é o mediador da expressão do RNAmOTR no útero (MURATA et al., 2003).

Durante o trabalho de parto, é preciso que o miométrio altere seu estado quiescente para o estado contrátil. Esta transição é resultado do aumento de estímulos contráteis e ausência de mecanismos que promovam relaxamento uterino, o que requer a queda da atividade progesteracional e ativação estrogênica (CHALLIS; LYE, 1994). A função da progesterona no parto não está totalmente estabelecida, entretanto, foi demonstrado que na placenta de mulheres gestantes, a progesterona bloqueia o efeito estimulatório do estrógeno no RNAm da ocitocina (CHIBBAR et al., 1995). Em humanos, também foi evidenciado que a resposta do miométrio à

progesterona diminui concomitantemente ao aumento coordenado na expressão do RE α (VEGETO et al., 1993; MESIANO et al., 2002).

O estrógeno e a progesterona são os mais importantes controladores da síntese de ocitocina e aumento de seus receptores. A progesterona apresenta efeito positivo na síntese da ocitocina, entretanto, regula negativamente o OTR. Por outro lado, o estrógeno apresenta tanto efeito estimulatório para a síntese de ocitocina como para o aumento da concentração do OTR (MITCHELL et al., 1998). O número de OTR eleva-se durante a fase folicular do ciclo e diminui na fase lútea, refletindo o efeito positivo e negativo do estrógeno e progesterona na síntese e degradação de receptores, respectivamente (LESSEY, 1988; NOE, 1999). Do início à metade da fase lútea, a progesterona atua nos receptores presentes no endométrio inibindo a expressão do RE e suprimindo a formação do OTR (McCRACKEN et al., 1984). Entretanto, a exposição contínua do endométrio à progesterona diminui gradualmente a expressão do seu receptor (RP). Desta maneira, a progesterona perde a habilidade de bloquear a formação do OTR e o endométrio torna-se sensível aos efeitos do estrógeno (NOE, 1999). O aumento do estrógeno e do RE promove tanto a formação do OTR quanto a liberação de PGF2 α , culminando com a luteólise (SPENCER et al., 1995b).

Até a última década, muitos pesquisadores consideravam a ocitocina como um hormônio sintetizado no núcleo paraventricular e supra-óptico do hipotálamo, transportado pelos axônios e armazenado nos grânulos secretórios da hipófise posterior. Quando liberado na circulação, causa contração do miométrio durante a gestação e descida do leite durante a lactação (MITCHELL et al., 1998). Entretanto, a função da ocitocina no trabalho de parto não requer necessariamente o aumento de sua concentração plasmática (WU et al., 1996b). Vários estudos demonstram que a sensibilidade do miométrio à ocitocina aumenta durante o parto. No entanto, este evento ocorre como resultado do aumento da concentração do OTR e da concentração local deste hormônio (FUCHS, 1983; WU et al., 1996b). O estudo da síntese de ocitocina em um sistema parácrino no útero gestante pode esclarecer alguns dogmas a respeito da função da ocitocina no início do trabalho de parto em humanos (MITCHELL et al., 1998).

A ocitocina é importante no estágio expulsivo do parto e no processo de involução uterina. Os trabalhos relativos à espécie humana demonstram que a concentração de ocitocina é baixa na mulher não gestante e mantém-se baixa

durante a gestação (MITCHELL et al., 1998). As mulheres com disfunção pituitária aparentemente evoluem para parto normal, fato que sugere importantes controvérsias em relação ao papel desempenhado pela ocitocina no parto (CHARD, 1989). Desta forma, propõe-se que a ocitocina local (uterina ou placentária) seja iniciadora do parto, como resultado do aumento do RNAmOT na placenta humana (CHIBBAR, 1993; MITCHELL, 1998).

Em várias espécies, a concentração de ocitocina no plasma materno é maior durante o parto em relação ao período precedente (HIRST et al., 1993). A redução na metabolização da ocitocina ao final da gestação pode ser em parte responsável pelas altas concentrações observadas no parto (MITCHELL et al., 1997). A atividade ocitocinase é uma forma comum de degradação da ocitocina, por meio de enzimas que quebram as ligações entre os aminoácidos que formam a molécula de ocitocina (BURBACH; LEBOUILLE, 1982). A atividade ocitocinase em tecidos intra-uterinos em mulheres e ratas foi demonstrada anteriormente e tais estudos sugerem que o catabolismo da ocitocina nestes locais reduz-se antes do parto, resultando em significativo aumento da concentração local de ocitocina (MITCHELL; WONG, 1996; MITCHELL et al., 1997). Em ratas, o declínio de aproximadamente 25% na atividade ocitocinase ao final da gestação é responsável pelo significativo aumento da ocitocina no útero neste período (MITCHELL et al., 1998). A atividade de tais enzimas não foi evidenciada em cães, o que sugere que outros fatores possam modificar a meia vida e o metabolismo da ocitocina durante o parto nesta espécie (OLSSON et al., 2003).

A liberação da ocitocina é pulsátil, com amplitude de curta duração e meia vida plasmática de poucos minutos (THORTON et al., 1990). Pesquisas demonstram aumento na frequência de pulsos da ocitocina até o começo do parto (DAWOOD et al., 1978; OTSUKI et al., 1983; FUCHS et al., 1991). Em humanos e ratas, altas concentrações de ocitocina plasmática correlacionam-se com altas concentrações de estradiol. Por este motivo, o tratamento com estradiol em mulheres pode aumentar a concentração de ocitocina plasmática (AMICO et al., 1981; YAMAGUCHI et al., 1979).

Chann et al. (1993) postulam a existência de dois subtipos de receptores de ocitocina no útero de ratas, os quais estão relacionados com a formação de junções do tipo *gap* entre as células miometriais e com a liberação de prostaglandina no endométrio e placenta. O aumento do RNAmOTR e do OTR foi demonstrado no

placenta. O aumento do RNAmOTR e da ocitocina na placenta ao final da gestação associado à proximidade anatômica com os tecidos alvos (endométrio e miométrio) confirmam a hipótese de um sistema parácrino intra-uterino regulatório no momento do parto (MITCHELL et al., 1998). A ativação do OTR na placenta induz a liberação de PGF2 α , promovendo contrações uterinas, relaxamento cervical e luteólise (MITCHELL et al., 1998). No parto, a concentração do OTR no miométrio de ratas aumenta abruptamente. Por outro lado, na placenta, as concentrações permanecem baixas, indicando que o OTR no miométrio e na decídua são regulados por mecanismos independentes (CHAN et al., 1993).

Durante a gestação, a concentração uterina do OTR aumenta de 6 a 80x no momento de parto (FUCHS, 1983). Em humanos, a expressão do RNAmOTR no miométrio aumenta em 100x com a idade gestacional de 32 semanas e 300x no parto, comparando-se ao útero não gestante (KIMURA, 1996). Por outro lado, em ratas, os níveis de RNAmOTR aumentam mais de 25x durante a gestação: 4,5x durante os primeiros 21 dias de gestação, chegando a 6x entre o 21º dia e o início do parto (LARCHER et al., 1995). Em ovelhas, o aumento no RNAmOTR é 3x maior no corno gravídico, comparado ao não gravídico, sugerindo que a distensão uterina ou outros fatores locais podem regular a concentração do OTR (WU et al., 1996b).

Em humanos, há descrição da síntese de ocitocina fetal ao final da gestação, com ação reconhecida no início do trabalho de parto (CHARD, 1989). A ocitocina atua no cérebro fetal como agente vasodilatador no endotélio de vasos íntegros. Os episódios de baixa oxigenação no período perinatal levam à formação de radicais peróxidos e, conseqüentemente, lesão no endotélio vascular. No endotélio alterado, a ocitocina atua como agente vasoconstrictor, resultando em isquemia e danos neurológicos (BARI et al., 1997). As ações cardiovasculares maternas e fetais da ocitocina podem acarretar, em última análise, danos cerebrais aos neonatos, fato que impõe cuidados extremos à utilização empírica da ocitocina em partos distócicos.

T-C-G-A-T-C-G-A-T-A-T-C-G-A-T-C-G-A-T-A-T-C-G-A-T-C-G-A-T-A-T-C-G-A-T-C-G-A-T-A-T-C-G-A-T-C-G-A-T-A-T-C-G-A-T-A-T-C-G-A

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para o desenvolvimento deste estudo, foram selecionadas 46 cadelas gestantes, com idade reprodutiva entre 1 e 6 anos, sem discriminação em relação à raça, clinicamente saudáveis e sem histórico de alterações reprodutivas ou obstétricas.

Os animais eram provenientes da rotina de atendimento em clínicas veterinárias particulares. Apenas fêmeas para as quais os proprietários objetivaram interromper a gestação indesejada foram incluídas neste estudo, respeitando as normas de utilização de animais em experimentos, adotadas a partir da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

As cadelas foram alocadas em 4 grupos de acordo com a idade gestacional, determinada por exame ultra-sonográfico, histórico reprodutivo e mensuração do comprimento *crown-rump* fetal, segundo Evans (1993).

- Grupo 1: fêmeas em fase inicial (0-20 dias) de gestação (n = 11);
Grupo 2: fêmeas com idade gestacional entre 20 e 40 dias (n = 12);
Grupo 3: fêmeas com idade gestacional superior a 40 dias (n = 12);
Grupo 4: fêmeas em fase preparatória ou pródromos do parto (n = 11).

A distribuição dos animais segundo o tempo gestacional nos diferentes grupos experimentais está elencada no quadro 1.

3.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Os fragmentos de endométrio, miométrio e placenta foram destinados à análise da expressão gênica pela PCR em tempo real. Já o soro sanguíneo foi utilizado para as determinações de ocitocina e estrógeno.

3.3.1 Isolamento do RNA total

Foram utilizados dois métodos de extração de RNA, de acordo com o tipo de tecido:

3.3.1.1 *Placenta*

Para a extração do RNA total das placentas, foi utilizado o reagente TRIzol (Invitrogen®). Os fragmentos do tecido congelado foram macerados e a eles adicionado 1 mL do reagente TRIzol (isoticianato de guanidina + fenol). As amostras foram incubadas por 5 minutos, para em seguida ser adicionado 200 µL de clorofórmio. A mistura foi agitada vigorosamente por 15 segundos, incubada por 2 minutos a temperatura ambiente e centrifugada por 15 minutos a 4°C a 1200 *xg*. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e foram adicionados 500 µL de isopropanol. A mistura foi incubada por 10 minutos, centrifugada a 4°C a 1200 *xg* por 10 minutos e o sobrenadante foi removido por decantação. O sedimento foi, então, lavado com etanol a 70%, seco e ressuspendido em 40 µL de água DEPC.

3.3.1.2 *Endométrio e miométrio*

Para a extração do RNA total das amostras de endométrio e miométrio foi utilizado o sistema *Illustra RNAspin Mini RNA Isolation* (GE Healthcare®), conforme as instruções do fabricante. Os fragmentos dos tecidos congelados foram

macerados e adicionou-se 350 μ L de *buffer RA1* e 3,5 μ L de β -mercaptoetanol. A mistura foi agitada vigorosamente em vórtex até a formação de uma solução homogênea e, em seguida, transferida para um filtro e centrifugada a 8000 xg durante 30 segundos. Após o descarte do filtrado, adicionou-se 350 μ L de *Membrane Desalting Buffer* e centrifugado a 11000 xg por 1 minuto. O filtrado foi novamente descartado, para então ser adicionado 95 μ L de uma mistura de DNase, a qual foi incubada a temperatura ambiente durante 15 minutos. Após este período, foram adicionados 200 μ L de *Buffer RA2* e, em seguida, a solução foi centrifugada a 11000 xg durante 1 minuto. O filtro foi colocado em um novo tubo coletor e foram adicionados 600 μ L de *Buffer RA3*, procedendo-se nova centrifugação a 11000 xg durante 1 minuto. Foram adicionados 250 μ L de *Buffer RA3* ao filtro e centrifugados durante 2 minutos a 11000 xg . O filtro foi transferido para um novo tubo coletor e então acrescentados 100 μ L de água (livre de RNases) e centrifugado a 11000 xg durante 1 minuto.

3.3.2 Quantificação do RNA total

O RNA total foi quantificado após diluição em água (livre de RNAses) na proporção de 1:100, em aparelho de biofotometria Eppendorf® modelo Vi 1.35.

3.3.3 Síntese do cDNA

Após quantificação, 1 µg de RNA total foi utilizado para a síntese da primeira fita de cDNA pela reação de transcrição reversa utilizando-se o sistema *SuperScript™ II reverse transcriptase* (Invitrogen®) na presença de oligo dT. Inicialmente, o RNA total adicionado de 1 µL de oligo dT e água DEPC q.s.p 12 µL foi exposto a 70°C durante 10 minutos em termociclador modelo PTC-100. Em seguida a solução foi mantida a -20°C durante 1 minuto. Foram adicionados 2 µL de *First Strand Buffer*, 2 µL de MgCl₂ 25mM, 1 µL de dNTP e 2 µL de 0,1 M DTT, para então proceder a exposição a 42°C durante 5 minutos. Finalmente, foi adicionado

A eficiência das reações para os diferentes genes foi determinada pela amplificação das amostras em diluições seriadas. Tais valores foram utilizados para o cálculo da eficiência relativa (gene alvo/gene endógeno), considerando-se que:

$$\text{Eficiência} = 10^{-1/\text{slope}}$$

A eficiência calculada segundo a fórmula acima para as reações nos distintos genes foram: 1,98 (18S), 2,05 (RPS5), 2,08 (RE α) e 1,94 (OTR).

3.3.5 Dosagens hormonais

3.3.5.1 *Dosagem do estrógeno*

As amostras foram processadas utilizando o conjunto diagnóstico comercial para dosagem de estradiol sérico da *DSL-4400* (Diagnostic Systems Laboratories, Webster, Texas, USA) por radioimunoensaio marcado com ^{125}I , desenvolvido para quantificação hormonal em soro humano; previamente validado para a espécie canina. A sensibilidade da reação e os coeficientes de variação inter e intra-ensaio foram 1,85 pg/ml (95%), 7,32% e 0,05%, respectivamente. O protocolo utilizado seguiu o recomendado pelo fabricante e os padrões de qualidade empregados estavam de acordo com o utilizado na rotina do Laboratório de Dosagens Hormonais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

3.3.5.2 *Dosagem de ocitocina*

Para determinação hormonal, o volume de 1 mL do soro foi adicionado de acetona e éter petróleo e as concentrações de ocitocina foram mensuradas pela técnica de radioimunoensaio, conforme descrição de Elias et al. (1997). A

sensibilidade da reação e os coeficientes de variação inter e intra-ensaio foram 0,9 pg/ml, 7,0% e 12,6%, respectivamente. Os padrões de qualidade empregados estavam de acordo com o utilizado na rotina do Laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados por meio do programa SAS System for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2000). Por meio do aplicativo Guided Data Analysis, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Caso não obedecessem a estas premissas, foram transformados em logaritmo na base 10 ($\log_{10}X$) ou Raiz quadrada ($\sqrt{X}$). Para descrição dos resultados, foram empregados os erros padrões e as médias (média $\pm$ erro padrão da média) dos dados originais.

Neste experimento, as variáveis classificatórias utilizadas foram as fases da gestação (grupos 1, 2, 3 e 4) e o gene em estudo nos tecidos. Neste caso, foi avaliada a interação entre o tempo da gestação e a expressão do gene. As variáveis REα/18S (miométrio) e REα/RPS5 (endométrio) obedeceram às premissas após a transformação para raiz quadrada e exclusão de amostras que se comportaram como *outliers*. As variáveis OTR/RPS5 (miométrio), OTR/18S (miométrio), REα/18S (endométrio), OTR/RPS5 (endométrio), OTR/18S (endométrio), REα/18S (placenta), REα/RPS5 (placenta), OTR/RPS5 (placenta) e OTR/18S (placenta) obedeceram às premissas após transformação para logaritmo na base 10 e exclusão de *outliers*. A variável REα/RPS5 (miométrio) obedeceu às premissas apenas após exclusão de *outliers*. As amostras consideradas *outliers* foram:

- ✓ duas amostras no grupo 1 e uma amostra no grupo 3 para REα/RPS5 (miométrio);
- ✓ uma amostra no grupo 3 para REα/18S (miométrio);
- ✓ uma amostra no grupo 4 para REα/RPS5 (endométrio);
- ✓ uma amostra no grupo 2 e uma amostra no grupo 3 para REα/18S (endométrio);

- ✓ uma amostra no grupo 4 para OTR/RPS5 (endométrio);
- ✓ uma amostra no grupo 2 e uma amostra no grupo 3 para OTR/18S (endométrio);
- ✓ uma amostra no grupo 2 e uma amostra no grupo 3 para REα/RPS5 (placenta);
- ✓ uma amostra no grupo 2, uma amostra no grupo 3 e duas amostras no grupo 4 para OTR/RPS5 (placenta).

Os resultados foram testados utilizando-se a análise de variância para medidas repetidas (ANOVA). O teste de Tukey foi utilizado como teste de comparações múltiplas complementar à ANOVA para identificação da origem das diferenças.

Para verificar a estabilidade dos controles endógenos (RPS5 e 18S) em cada tecido (miométrio, endométrio e placenta), as variâncias dos dois controles foram comparadas por meio do teste Brown and Forsythe.

O nível de significância utilizado para rejeitar H0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as variáveis classificatórias (tratamentos) para uma determinada variável resposta.

T-C-G-A-T-C-G-A-T·A-T-C-G-A-T-C-G-A-T··A-T-C-G-A-T-C-G-A-T·A-T-C-G-A-T-C-G-A-T·A-T-C-G-A-T-C-G-A-T·A-T-C-G-A-T-C-G-A-T·A-T-C-G-A-T-C-G-A-T·A-T-C-G-A-T-C-G-A-T·A-T-C-G-A

Figura 3 – Curva de amplificação e dissociação do RNAmRE α

Figura 4 – Curva de amplificação e dissociação do RNAmOTR

4.1 ANÁLISE DAS VARIÂNCIAS DOS CONTROLES ENDÓGENOS NOS DIFERENTES TECIDOS

A variância (desvio padrão) dos genes constitutivos utilizados como controle endógeno (18S e RPS5) não diferiram estatisticamente na placenta e no miométrio (Tabelas 1 e 2, respectivamente). Entretanto, no endométrio, o gene 18S apresentou variância superior (em $p=0,07$) ao gene RPS5, denotando tendência estatística a serem diferentemente expressos (Tabela 3).

Tabela 1 – Variâncias apresentadas pelos controles endógenos 18S e RPS5 na análise de expressão gênica na placenta – São Paulo - 2008

CONTROLE ENDÓGENO	VARIÂNCIA
18S	1,79 ^a
RPS5	2,14 ^a

^a sem diferença estatística (p=0,70)

Tabela 2 – Variâncias apresentadas pelos controles endógenos 18S e RPS5 na análise de expressão gênica no miométrio – São Paulo - 2008

CONTROLE ENDÓGENO	VARIÂNCIA
18S	1,46 ^a
RPS5	1,26 ^a

^a sem diferença estatística (p=0,45)

Tabela 3 – Variâncias apresentadas pelos controles endógenos 18S e RPS5 na análise de expressão gênica no endométrio – São Paulo - 2008

CONTROLE ENDÓGENO	VARIÂNCIA
18S	3,49 ^a
RPS5	2,91 ^b

^{a,b} diferença em p=0,07

4.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DO RE α E OTR NA PLACENTA

A expressão do RNAmRE α na placenta não diferiu estatisticamente ao longo da gestação, considerando-se o controle endógeno 18S (Figura 5). Ao analisar o RE α em relação ao RPS5 (Figura 6), nota-se que a expressão gênica do RNAmRE α é estatisticamente inferior no grupo 3, porém semelhante à placenta de cadelas ao início da gestação e durante o parto (grupo 4).

Referindo-se a expressão do RNAmOTR no miométrio em relação ao 18S e RPS5, evidencia-se diferença significativa dos grupos 3 e 4 em comparação aos grupos 1 e 2 (Figuras 15 e 16). Nota-se que o OTR é estatisticamente mais expresso no miométrio ao final da gestação e no parto.

Figura 15– Expressão gênica do RNAmOTR em relação ao 18S no miométrio nos grupos 1, 2, 3 e 4, ^{a,b,c} indica diferença significativa entre grupos ($p<0,05$)

Figura 16 – Expressão gênica do RNAmOTR em relação ao RPS5 no miométrio nos grupos 1, 2, 3 e 4, ^{a,b} indica diferença significativa entre grupos ($p < 0,05$)

4.5 ANÁLISE DAS DOSAGENS HORMONAIS

4.5.1 Dosagem de estrógeno

O grupo 4 apresentou concentrações de estrógeno estatisticamente superiores aos grupos 1 e 2 (Figura 21). Não houve diferença estatística entre os grupos 1, 2 e 3, bem como entre os grupos 3 e 4.

Figura 21 – Concentrações séricas de estrógeno nos grupos 1, 2, 3 e 4, ^{a,b} indica diferença significativa entre grupos ($p<0,05$)

4.5.2 Dosagem de ocitocina

As concentrações de ocitocina não diferiram estatisticamente ao longo da gestação (grupos 1, 2 e 3) e parto (grupo 4) (Figura 22).

[illegible]

5 DISCUSSÃO

As novas técnicas de biologia molecular são, atualmente, as principais ferramentas para decifrar as diversas interações hormonais e as conseqüentes mudanças fisiológicas nas espécies animais. Para a espécie canina, a perspectiva das pesquisas direcionadas à fisiologia e endocrinologia da gestação e parto inclui a determinação dos principais órgãos ou tecidos envolvidos na síntese, secreção e ação dos hormônios reprodutivos, bem como a exata localização de seus respectivos receptores. Pouco se conhece a respeito dos efeitos e mudanças decorrentes da interação hormônio-receptor nos tecidos alvo. Desta maneira, o uso de hormônios para terapia de intercorrências durante a gestação e parto é realizada de maneira empírica para a espécie canina.

A fase inicial da gestação em cadelas é caracterizada pelo período de implantação embrionária e placentação, as quais ocorrem a partir do 16º e 20º dias após o pico de LH, respectivamente (CONCANNON et al., 2001; MIGLINO et al., 2006). O desenvolvimento e funcionamento normal da placenta são fundamentais para manter a vida pré-natal e desencadear o parto (AL-BLADER, 2006). Em muitas espécies de mamíferos, o estrógeno placentário possui também ações autócrina e parácrina e, por conseguinte, caracteriza-o como principal responsável pelo crescimento e diferenciação da própria placenta (SCHULER et al., 2002). Os resultados deste experimento demonstram aumento significativo na expressão do RNAmRE α na placenta durante o terço inicial e médio da gestação (grupo 1 e 2), em comparação ao período final (grupo 3). Tal resultado sugere que no período gestacional compreendido entre os dias 17 e 40, momento no qual há importante desenvolvimento placentário, a ação autócrina ou parácrina do estrógeno é mais notável que a endócrina, uma vez que os níveis séricos de estrógeno nesta fase mantiveram-se constantes. A expressão do RNAmRE α na placenta sugere a síntese do RE α e comprova a necessidade da ação estrogênica no tecido placentário, pois este hormônio participa da multiplicação e hipertrofia celular bem como do desenvolvimento da vascularização placentária, importantes para o progresso da gestação. Frente a tais resultados, estudos futuros são necessários para comprovar a presença do RE α na placenta e determinar a síntese placentária deste hormônio, por meio da determinação de sua concentração local na espécie canina.

A expressão do RNAmRE α na placenta sofreu decréscimo significativo após 40 dias de gestação (grupo 3) e permaneceu baixa até o parto (grupo 4). Deste resultado, especula-se que no referido período a placenta canina seja pouco responsiva aos estímulos estrogênicos, pois os níveis séricos deste hormônio elevam-se de forma significativa. Tais achados podem ser corroborados por estudos em outras espécies, como roedores, bovinos e humanos (SAUERWEIN et al., 1989; BUKOWISKY et al., 2003; AL-BLADER, 2006). Em ratas, o aumento dos níveis estrogênicos durante o transcorrer da gestação resulta em diminuição do RE na placenta (AL-BLADER, 2006). O autor sugere que este seja um mecanismo protetor contra os efeitos deletérios do estrógeno ao final da gestação, caracterizados por retardo no desenvolvimento placentário e secundariamente limitação do crescimento fetal, evidenciados por Bartholomeusz et al. (1999), após a aplicação exógena de estradiol em ratas gestantes. Desta maneira, sugere-se que a elevação progressiva dos níveis estrogênicos, evidenciados neste estudo a partir de 40 dias de gestação, não influenciam a atividade placentária e, conseqüentemente, o desenvolvimento fetal. Neste período, a placenta apresenta menor capacidade de resposta aos estímulos do estrógeno, em decorrência da baixa expressão do RNAmRE α . O decréscimo na expressão do RNAmRE α na placenta associado aos níveis elevados de estrógeno circulante após 40 dias de gestação indicam que a placenta canina responde exclusivamente a estímulos estrogênicos de forma temporal e autócrina, respectivamente.

Não há, até a atualidade, pesquisas que demonstrem a expressão do RNAmOTR na placenta, bem como a ação da ocitocina neste tecido durante a gestação e parto na espécie canina. A placenta é considerada um dos órgãos de síntese da ocitocina, responsável por estimular a produção de PGF2 α endometrial, resultando em lise do corpo lúteo e início do parto. Considerações acerca da ação mediadora positiva do RE α sobre o RNAmOTR no útero foram descritas em diversos estudos (LARCHER et al., 1995; MURATA et al., 2003). Neste experimento, o perfil da expressão do RNAmOTR na placenta não se assemelhou ao RNAmRE α , pois a elevação significativa do RE α no grupo 2 não foi acompanhada pelo OTR. Ainda, os altos níveis de estrógeno ao final da gestação não foram capazes de aumentar a expressão do RNAmOTR na placenta. A expressão homogênea do RNAmOTR observada neste experimento pode ser atribuída ao bloqueio progestacional para a síntese do OTR. Tais resultados não excluem a possibilidade de ser o estrógeno o

síntese e liberação da PGF2 α , responsável pela lise do corpo lúteo e início do trabalho de parto.

Ao final do período gestacional, o evento endócrino crucial é determinado pela diminuição dos níveis de progesterona e aumento de estrógeno, resultando na síntese do receptor de ocitocina durante o trabalho de parto (CHALLIS, 1971; LACHER et al., 1995). Em mulheres gestantes, o parto também é precedido por maior expressão do RE α no miométrio, simultaneamente à queda dos níveis de progesterona (VEGETO et al., 1993; MESIANO et al., 2002). Por outro lado, a expressão do RNAmRE α no miométrio de cadelas gestantes mantém-se constante a partir de 20 dias de gestação. Tal resultado pode ser comparado ao obtido no endométrio, em relação à expressão do RNAmRE α . A indução da síntese do RNAmOTR a partir do RE α não pôde ser comprovada neste estudo, embora a concentração sérica de estrógeno tenha elevado-se significativamente ao final da gestação. Conforme sugerido anteriormente, acredita-se que a modulação do receptor de ocitocina em cadelas gestantes possa ocorrer precipuamente por meio do RE β e de forma menos intensa pelo RE α .

A expressão do RNAmOTR no miométrio foi demonstrada durante toda a gestação e parto. No entanto, a expressão máxima pôde ser observada nos grupos 3 e 4, ou seja, ao final da gestação e início do trabalho de parto. Disto demonstra o aumento progressivo da sensibilidade miometrial frente ao estímulo da ocitocina para desencadeamento das contrações uterinas. A significativa elevação dos níveis séricos de estrógeno nos grupos 3 e 4, concomitantemente ao acréscimo significativo na expressão do RNAmOTR no miométrio, reforça a importante ação mediadora do estrógeno nos receptores de ocitocina e, conseqüentemente, no início do parto. Ainda, é importante ressaltar que o aumento do RNAmRE no miométrio é decorrente do aumento do cortisol fetal ao final da gestação em ovelhas, aumentando a sensibilidade uterina aos estímulos estrogênicos (WU et al., 1996a). Entretanto, tal mecanismo não pôde ser elucidado em cadelas com os resultados do presente trabalho.

Em mulheres, a concentração de ocitocina plasmática mantém-se baixa durante toda a gestação e no parto. No entanto, o tratamento com estradiol resulta em acréscimo dos níveis circulantes de ocitocina (AMICO et al., 1981; MITCHELL et al., 1998). Recentemente, Klarenbeek et al. (2007) demonstraram que as concentrações de ocitocina em cadelas ao final da gestação permanecem baixas,

podendo oscilar e aumentar somente no estágio expulsivo do parto, mas não necessariamente no momento da expulsão fetal. Os resultados do presente estudo vão ao encontro dos relatos prévios, pois as concentrações de ocitocina mantiveram-se constantes durante toda a gestação e o parto. Apesar da confirmada produção placentária de ocitocina como mecanismo de indução da luteólise (CHAN et al., 1993), nota-se que os níveis circulantes deste hormônio não se alteram ao longo da gestação. Tais observações sugerem que a ocitocina circulante na espécie canina possui influência mínima para o início do parto. Por este motivo, pode-se considerar que a ativação dos receptores de ocitocina miométriais dimana da ação parácrina da ocitocina de origem placentária.

Nas reações de PCR em tempo real neste trabalho, utilizou-se dois genes denominados constitutivos como controles endógenos (18S e RPS5). As variações dos resultados encontrados em alguns tecidos denotam diferenças entre os controles selecionados. Por se tratar de genes constitutivos, variações representam instabilidade gênica em tecidos específicos. No miométrio e na placenta, os genes 18S e RPS5 não revelaram diferenças importantes para a interpretação dos dados. Portanto, considera-se que ambos são estáveis nestes tecidos. Por outro lado, os referidos genes no endométrio geraram distintas interpretações, mas também evidenciou-se diferenças em suas variâncias. O gene constitutivo RPS5, por apresentar menor desvio padrão, pode ser considerado mais estável para o endométrio em relação ao 18S. Portanto, para avaliações futuras da expressão gênica no endométrio de cadelas, sugere-se o emprego do gene endógeno RPS5.

Considerações importantes a respeito da fisiologia reprodutiva da cadela foram abordadas no presente estudo. Os novos conhecimentos podem auxiliar futuras pesquisas voltadas para o estudo da reprodução canina. Da mesma forma, podem contribuir para a aplicação prática dos hormônios frente às possíveis alterações maternas ou fetais durante a gestação e parto. Todavia, ainda persistem lacunas para explicar as diversas interações hormonais e estabelecer padrões endócrinos. Futuros estudos devem ser conduzidos para elucidar tais questionamentos e contribuir para o conhecimento técnico-científico nesta espécie.

[illegible]

6 CONCLUSÃO

Nas condições deste estudo e com base nos resultados apresentados pode-se concluir que:

1. A expressão gênica dos receptores de estrógeno e ocitocina nos tecidos estudados é modulada segundo o período gestacional e o parto:

Endométrio

- ✓ O RNAmRE α é expresso de maneira constante durante a gestação e parto.
- ✓ O RNAmOTR possui maior expressão ao início do trabalho de parto.

Miométrio

- ✓ O RNAmRE α possui maior expressão entre 20 e 40 dias de gestação e ao início do trabalho de parto.
- ✓ O RNAmOTR é mais expresso entre 40 e 60 dias de gestação e ao início do trabalho de parto.

Placenta

- ✓ O RNAmRE α possui maior expressão até 40 dias de gestação.
- ✓ O RNAmOTR é expresso de maneira constante durante a gestação e ao início do trabalho de parto.

2. As concentrações séricas de ocitocina mantêm-se constantes durante todo período gestacional e no início do parto, enquanto os níveis estrogênicos elevam-se a partir de 40 dias de gestação até o parto.
3. É possível atribuir ao aumento dos níveis circulantes de estrógeno a maior expressão do RNAmOTR no miométrio e endométrio ao final da gestação. As concentrações séricas de ocitocina não influenciam o início do parto na espécie canina, bem como a modulação da expressão dos receptores de estrógeno e ocitocina no endométrio, miométrio e placenta.

[illegible]

REFERÊNCIAS

AL-BLADER, D. M. Estrogen receptors alpha e beta in rat placenta: detection by RT-PCR, real-time PCR and Western blotting. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, n. 13, p. 1-10, 2006.

AMICO, J. A.; SEIF, S. M.; ROBINSON, A. G. Oxytocin in human plasma: correlation with neurophysin and stimulation with estrogen. **Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 52, n. 5, p. 988-993, 1981.

AMSO, N. N.; CROW, J.; SHAW, R. W. Comparative immunohistochemical study of oestrogen and progesterone receptors in the fallopian tube and uterus at different stages of the menstrual cycle and the menopause. **Human Reproduction**., v. 9, n. 6, p. 1027-37, 1994.

BARI, F.; ERRICO, R. A.; LOUIS, T. M.; BUSIJA, D. W. Interaction between ATP-sensitive K⁺ channels and nitric oxide on pial arterioles en piglets. **Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism.**, v. 16, p. 1158-1164, 1996.

BARTHOLOMEUSZ, R. K.; BRUCE, N. W.; LYNCH, A. M. Embryo survival and fetal and placental growth following elevation of maternal estradiol blood concentrations in the rat. **Biology Reproduction**, v. 61, p. 46-50, 1999.

BUKOVSKY, A.; CAUDLE, M. R.; CEKANOVA, M.; FERNANDO, R. I.; WIMALASENA, J.; FOSTER, J. S.; HENLEY, D. C.; ELDER, R. F. Placental expression of estrogen receptor beta and its hormone binding variant – comparison with estrogen receptor alpha and a role for estrogen receptors in asymmetric division and differentiation of estrogen-dependent cell. **Reproductive. Biology. And Endocrinology.**, v. 1, p. 36-56, 2003.

BURBACH, J. P. H.; LEBOUILLE, J. L. M. Proteolytic conversion of arginine-vasopressin and oxytocin by brain synaptic membranes. **Journal of Biological Chemistry.**, v. 258, p. 1487-1494, 1982.

WU, W. X.; DERKS, J. B.; NATHANIELSZ, P. W. Effects of glucocorticoids on estrogen receptor messenger ribonucleic acid in the pregnant ovine myometrium in vivo and in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 230-241, 1996a.

WU, W. X.; VERBALIS, J. G.; HOFFMAN, G. E.; DERKES, J. A.; NATHANIELSZ, P. W. Characterization of oxytocin receptor expression and distribution in the pregnant sheep uterus. **Endocrinology**, v. 137, n. 2, p. 722-728, 1996b.

YAMAGUCHI, K.; ASAISHI, T.; NEGORO, H. Effect of oestrogen treatment on plasma oxytocin and vasopressin in ovariectomized rats. **Endocrinologica Japonicum**, v. 26, p. 197-205, 1979.