MOANA RODRIGUES FRANÇA

Efeito do ambiente endócrino peri-ovulatório na expressão gênica e proteica de transportadores de glicose no endométrio durante a primeira semana do ciclo estral em bovinos de corte

São Paulo

2012

MOANA RODRIGUES FRANÇA

Efeito do ambiente endócrino peri-ovulatório na expressão gênica e proteica de transportadores de glicose no endométrio durante a primeira semana do ciclo estral em bovinos de corte

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

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Mario Binelli

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2012

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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.2745
FMVZ

França, Moana Rodrigues

Efeito do ambiente endócrino peri-ovulatório na expressão gênica e proteica de transportadores de glicose no endométrio durante a primeira semana do ciclo estral em bovinos de corte / Moana Rodrigues França. -- 2012.

72 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Mario Binelli.

1. Bovinos. 2. Útero. 3. Solute carrier protein. 4. Glicose. 5. Esteróides sexuais. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito do ambiente endócrino peri-ovulatório na expressão gênica do endométrio durante a primeira semana do ciclo estral em bovinos: via metabólica das proteínas carreadoras", protocolado sob o nº 2297/2011, utilizando 30 (trinta) zebuínos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Mario Binelli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/8/2011.

We certify that the Research "Effect of the periovulatory endocrine milieu on endometrial gene and protein expression during the first week post-estrus in cattle: the solute carrier protein pathway", protocol number 2297/2011, utilizing 30 (thirty) cattle, under the responsibility Prof. Dr. Mario Binelli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/17/2011.

São Paulo, 18 de agosto de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FRANÇA, Moana Rodrigues

Título: Efeito do ambiente endócrino peri-ovulatório na expressão gênica e proteica de transportadores de glicose no endométrio durante a primeira semana do ciclo estral em bovinos de corte

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 Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

“Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine.

E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.”

1 Coríntios 13:1,2

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha mãe **Teresinha Maria Rodrigues França**, minha amiga, meu pilar, meu exemplo, minha inspiração. Aquela cujo abraço cura qualquer dor, o carinho afasta qualquer angústia e o olhar dizima qualquer medo. Aquela que me ensinou o valor do estudo, do conhecimento, da honestidade e do caráter. Aquela que me mostrou a importância da fé e da confiança. Aquela que sempre torceu, participou, lutou, vibrou, chorou, sorriu. Aquela que me deu o melhor de si e lapidou o melhor de mim. Aquela cujo amor é tão grande, tão poderoso, tão pleno que me trouxe até aqui.

Com muito amor, Obrigada!

AGRADEÇO

Primeiramente a Deus, O criador de tudo, minha força maior, por ter me iluminado, me direcionado me protegido e me abençoado, sempre.

Aos professores Guilherme de Medeiros Bastos, Karen Regina Lemos, Mikael Neumann, Paulo Roberto Ost, Deonisia Martinichen e Raj Duggavathi, por terem acreditado no meu potencial desde a graduação, pelo direcionamento, pelos conselhos sempre motivadores.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mario Binelli, pela oportunidade, pela compreensão, pela confiança, pelo conhecimento a mim cedido, pela paciência, pelo exemplo.

Ao Dr. Fernando Mesquita, pelo conhecimento a mim transmitido, com calma e sabedoria e ainda pela amizade construída juntamente com a Sibeles e o Luiz Antônio.

À Prof. Dr. Claudia Bertan, pela coleta das amostras de endométrio e participação intensa nos experimentos, pelas oportunidades de aprendizado e crescimento, pelas conversas, sempre agradáveis.

Ao Dr. Guilherme Pugliesi, pelas contribuições para a conclusão desta dissertação.

Aos demais membros da família LFEM, Milena, Estela, Roney, Everton, Saara, Stephanie, Heitor, Yasmim, Bruna, pelas colaborações nos experimentos, pelos momentos de descontração e pelo trabalho em equipe.

A meus primos Jozilda e Claudio, por terem tão carinhosamente me recebido em sua casa em São Paulo durante o mestrado.

À Prof. Dr. Paula Papa por possibilitar a realização das imunohistoquímicas, cedendo seu laboratório, reagentes, anticorpos e seu tempo para ensinar a técnica e analisar os resultados. Agradeço ainda toda a equipe do LEME, em especial Renata dos Santos Silva, pelo auxílio na execução da técnica.

Aos nossos demais colaboradores, Prof. Dr. Luciano Silva, Prof. Dr. Flavio Meirelles, Prof. Dr. Guilherme Nogueira, Prof. Dr. Bruce Murphy e suas equipes, em especial, Fabiana Bressan, Fábio Pinaffi, Reno Araújo, Kalyne e Arnab, pela prontidão, e pela fundamental colaboração.

À Micheline por ter me recebido em sua casa e às demais moradoras Laryssa e Mariane, pela amizade e agradável convivência.

Ao programa de pós-graduação em reprodução animal da FMVZ da USP, pela oportunidade de fazer parte desta equipe excelente.

À prefeitura do campus de Pirassununga, pelos animais cedidos para o experimento.

Aos professores do VRA de Pirassununga, Prof. Dr. Ed Hoffman, Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, Prof. Dra. Annelise Traldi (Kiky), pela convivência agradável, pelo empréstimo de reagentes e equipamentos além do espaço físico de seus laboratórios, colaboração fundamental para a realização dos experimentos.

Aos funcionários do VRA, pela ajuda na limpeza, organização, manejo dos animais, facilitando nosso trabalho.

À Harumi pela ajuda durante todo o mestrado.

À Elza, pelo auxílio na correção da dissertação.

Ao Cláudio do Laboratório de Histopatologia, pela disposição para fazer os cortes histológicos.

Aos moradores da Casa do VRA, Dani, Shirley, Milena, Mayra, Henrique, Kleber, Milton, Roney, Thiago, pela convivência, momentos de descontração, ajuda, conversas, conselhos.

Aos demais amigos de Pirassununga, Gisele, Priscila, Qui, Roberta, Mariane, por tornarem a vida em Pirassununga mais divertida.

Aos meus pais, Moacyr e Teresinha, por terem acima de tudo respeitado a minha escolha, pelo apoio financeiro e emocional, pela compreensão, por terem suportado junto comigo a dor da saudade e feito o inimaginável para minimizar as dificuldades. Agradeço as conversas, o carinho, os momentos juntos.

Às minhas irmãs e cunhados Moema e Juliano e Moara e Guilherme, pelo apoio, pelo incentivo, por terem se desdobrado para resolver problemas quando a distância impediu minha presença.

Aos meus sobrinhos, Guilherme e Giovana, pelo carinho mais que especial, pela motivação, pelas orações inocentes que sempre foram atendidas, pela atenção, pela companhia, pela confiança.

A toda a família Rodrigues, tios e primos, pelo incentivo, pelo afeto, pelo apoio, pelos momentos que passamos juntos.

Aos meus amigos Gisara, Gabi, Karine, Robson, Wagner, Dani, pelas conversas demoradas, pelos momentos de descontração, pela compreensão e cumplicidade.

A FAPESP pelo suporte financeiro para realização do experimento.

A CAPES pela bolsa concedida durante o mestrado.

RESUMO

FRANÇA, M. F. **Efeito do ambiente endócrino peri-ovulatório na expressão gênica e proteica de transportadores de glicose no endométrio durante a primeira semana do ciclo estral em bovino de corte.** [Effect of the periovulatory endocrine milieu on endometrial glucose transporters gene and protein expression during the first week post-estrus in beef cattle]. 2013. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Em bovinos de corte, maiores diâmetros do folículo pré-ovulatório (FPO) e as subsequentes altas concentrações de progesterona [P4] aumentam o crescimento do conceito e a taxa de prenhez. Formulou-se a hipótese que a modulação do tamanho do FPO e [P4] no diestro subsequente à ovulação do FPO estimulam a expressão endometrial de transcritos e proteínas da famílias das *Solute Carrier Proteins* (SLC) que estão relacionadas ao transporte de glicose. Vacas Nelore (n=60), solteiras e ciclando receberam duas injeções de PGF2 α (PGF; 0,5mg; i.m.) com intervalo de 14 dias. Dez dias após (dia -10; D-10), receberam um dispositivo intra-vaginal liberador de P4 e benzoato de estradiol (2mg; i.m.). Para modular o crescimento do FPO e alterar a produção de P4 pós-ovulação, no D-10 os animais receberam PGF (grupo alta P4; AP) ou não (grupo baixa P4; BP). Dispositivos foram removidos e PGF injetada 60 a 42 horas antes da indução da ovulação para o grupo AP e 48 a 30 horas antes da indução para o grupo BP e ovulações foram induzidas com GnRH (buserelina; 10 μ g; i.m.) no D0. Crescimento e ovulação do FPO e formação do CL foram avaliados por ultrassom e [P4] medidas por radioimunoensaio. No D7 os animais que ovularam foram abatidos (AP, N=18 e BP, N=18), o endométrio foi dissecado e submetido à extração de RNA total para análises de qPCR, extração de proteínas totais para análises de western blotting e incluído em parafina para análises de imunohistoquímica. Diferença entre as médias dos grupos foi determinada pelo teste t de student. O diâmetro máximo do FPO (média $\pm$ erro padrão da média; 12,8 $\pm$ 0,4 vs. 11,1 $\pm$ 0,4mm) foi maior no grupo AP (P<0,01). A [P4] no D7 foi maior no grupo AP (4,5 $\pm$ 1,0 ng/mL vs. 3,3 $\pm$ 1,1 ng/mL; P<0,05). As concentrações relativas dos transcritos que codificam SLCs foram determinadas por qPCR, usando a ciclofilina como controle endógeno. Não houve diferença na expressão de SLC2A1 (0,91 $\pm$ 0,04 vs. 1,02 $\pm$ 0,07), SLC2A3 (1,14 $\pm$ 0,16 vs. 1,05 $\pm$ 0,1), SLC2A4 (1,20 $\pm$ 0,14 vs. 1,01 $\pm$ 0,05), SLC2A5 (0,95 $\pm$ 0,12 vs. 1,04 $\pm$ 0,12), SLC5A1 (1,35 $\pm$ 0,25 vs. 1,49 $\pm$ 0,44), ATP1A2 (1,29 $\pm$ 0,17 vs. 1,03 $\pm$ 0,1), ATP1B2 (1,20 $\pm$ 0,11 vs. 1,06 $\pm$ 0,1), SLC37A4 (1,16 $\pm$ 0,16 vs. 1,1 $\pm$ 0,12), entre os grupos AP e BP respectivamente (P>0.05). Também não foi possível identificar diferença na quantidade

proteica de SLC2A1 no endométrio dos animais do grupo AP em relação ao grupo BP. SLC2A1 foi identificada na membrana basal no epitélio luminal (EL), epitélio glandular (EG) e no estroma uterino dos animais. SLC2A4 foi identificada na membrana basal e membrana apical no EL, EG e no estroma uterino dos animais. Em conclusão, a modulação do tamanho do FPO e [P4] no diestro não afetaram a expressão gênica ou proteica dos transportadores de glicose. É possível que ao invés da expressão gênica ou proteica, a atividade transportadora das SLCs, ou ainda, a expressão e função de genes relacionados ao metabolismo de carboidratos, sejam regulados pelo ambiente endócrino peri-ovulatório em vacas.

Palavras-chave :Bovinos. Útero. Solute carrier protein. Glicose. Esteroides sexuais.

ABSTRACT

FRANÇA, M. F. **Effect of the periovulatory endocrine milieu on endometrial glucose transporters gene and protein expression during the first week post-estrus in beef cattle.** [Efeito do ambiente endócrino peri-ovulatório na expressão gênica e proteica de transportadores de glicose no endométrio durante a primeira semana do ciclo estral em bovinos de corte]. 2013. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

In beef cattle, changes in the peri-ovulatory endocrine milieu are associated with conceptus growth and fertility. A large size of the pre-ovulatory follicle (POF) and resulting elevated progesterone (P4) concentrations during diestrus affect pregnancy rates positively. Our hypothesis is that modulation of POF size and diestrus P4 concentrations regulate nutrient availability in the uterus. Specifically, optimal glucose concentrations in the histotroph are required for adequate embryo growth during early gestation. The objective was to determine if POF size and resulting P4 concentrations during the first week of diestrus influence gene expression of Solute Carrier Protein (SLC) families that are related to glucose transport. Cyclic, non-lactating Nelore cows received two injections of cloprostenol (PGF; 0.5mg; i.m.) 14 days apart. Ten days later (day -10; D-10), cows received a P4-releasing device along with estradiol benzoate (2mg; i.m.). To modulate the growth of the POF and alter post-ovulatory P4 production, on D-10 animals received PGF (high post-ovulatory P4 group; HP) or not (low post-ovulatory P4 group; LP). The P4-releasing devices were removed and PGF injected 60 to 42 hours before the ovulation induction in the HP group and 48 to 30 hours before the ovulation induction in the LP group. Ovulation was induced with buserelin (GnRH; 10µg; i.m.) on D0. Diameter of POF and ovulation were assessed by ultrasonography starting on D-2. From D1 to D7, plasma was obtained for measurement of P4 concentration. On D7, cows that ovulated were slaughtered (HP, n=18 and LP, n=18) and endometrium was dissected and subjected total RNA extraction for qPCR analyzes, total protein extraction for western blotting analyzes and included in paraffin for imunohistochemical analyzes. Differences between group means were determined by student's t test. Maximum diameter of the POF (mean $\pm$ SEM; 12.8 $\pm$ 0.4 vs. 11.1 $\pm$ 0.4mm) was greater in HP vs. LP (P<0.01). Progesterone concentration on D7 was larger on the HP group (4.5 $\pm$ 1.0 ng/mL and 3.3 $\pm$ 1.1 ng/mL; P<0.05). Relative concentrations of transcripts coding for facilitative sugar transporters (SLC2A1, SLC2A3, SLC2A4 and SLC2A5), a sodium-dependent glucose co-transporter (SLC5A1) and other transporters related to glucose uptake (ATP1A2, ATP1B2, SLC37A4) were determined by qPCR, using cyclophilin as the endogenous control gene. There were no

significant differences in expression of SLC2A1 (mean $\pm$ SEM; 0.91 ± 0.04 vs. 1.02 ± 0.07), SLC2A3 (1.14 ± 0.16 vs. 1.05 ± 0.1), SLC2A4 (1.20 ± 0.14 vs. 1.01 ± 0.05), SLC2A5 (0.95 ± 0.12 vs. 1.04 ± 0.12), SLC5A1 (1.35 ± 0.25 vs. 1.49 ± 0.44), ATP1A2 (1.29 ± 0.17 vs. 1.03 ± 0.1), ATP1B2 (1.20 ± 0.11 vs. 1.06 ± 0.1), SLC37A4 (1.16 ± 0.16 vs. 1.1 ± 0.12), between HP and LP, respectively ($P > 0.05$). There was no difference in the abundance of SLC2A1 protein between groups. The SLC2A1 protein was localized in the luminal epithelium (LE), glandular epithelium (GE) and uterine stroma (US) of animals. The SLC2A4 protein was localized on the basal and apical membrane of the LE, GE and US of animals. In conclusion, modulation of POF size and diestrus P4 concentrations did not affect the expression of glucose transporter genes or proteins. It is possible that activity of SLC proteins rather than gene expression, or alternatively, expression and function of genes related to carbohydrate metabolism, are regulated by the peri-ovulatory endocrine milieu in cows.

Keywords:Cattle.Uterus.Solute Carrier Proteins.Glucose. Sexual Steroids

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Modelo Hipotético Gráfico.....	18
Figura 2 -	Protocolo-base do manejo reprodutivo experimental dos animais para obtenção de amostras.....	29
Figura 3 -	Fluxograma da quantificação de transcritos por qPCR.	33
Figura 4 -	Condição de corrida de qPCR para análise de abundância de transcritos em extratos de tecidos endometriais de vacas nelore.....	34
Figura 5 -	Comparações das medidas de folículo e corpo lúteo entre os animais dos grupos alta progesterona após a ovulação (AP) e baixa progesterona após a ovulação (BP).....	44
Figura 6 -	Dinâmica temporal das alterações das concentrações plasmáticas de progesterona do dia 1 até o dia 7 dos animais dos grupos alta progesterona após a ovulação (AP) e baixa progesterona após a ovulação (BP).....	45
Figura 7 -	Taxa de aumento da concentração de progesterona (P4) do dia 1 ao dia 7 e concentração de progesterona no dia 7 dos animais dos grupos alta progesterona após a ovulação (AP) e baixa progesterona após a ovulação (BP).....	45
Figura 8 -	Eletroforese em géis de agarose para separação de produtos de PCR de genes que codificam as SLCs.....	46
Figura 9 -	Média ($\pm$ erro padrão da média) da abundância relativa de transcritos de genes relacionados ao transporte facilitado de glicose.	49
Figura 10 -	Média ($\pm$ erro padrão da média) da abundância relativa de transcritos de gene transportador de glicose dependente de sódio e outros genes relacionados ao transporte de glicose.	50
Figura 11 -	Expressão proteica de SLC2A1 no endométrio de vacas no dia 7 após a indução da ovulação.....	53
Figura 12 -	Imunohistoquímica para SLC2A1 em útero de vacas do grupo AP e BP.....	54
Figura 13 -	Imunohistoquímica para SLC2A4 em útero de vacas do grupo AP e BP.....	55
Quadro 1 -	Características dos primers utilizados nas detecções utilizando qPCR.....	36
Quadro 2 -	Anticorpos usados na Imunohistoquímica.	41
Quadro 3 -	Característica das reações de amplificação e da curva-padrão para validação de pares de primers.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Volumes (μL) e descrição de reagentes utilizados para procedimentos com qPCR para teste de concentração de primers, curva-padrão e comparação entre grupos.....	33
Tabela 2 -	Ingredientes para preparação da curva padrão de cDNA obtido a partir de extratos de endométrio de vacas Nelore (volumes em μL).....	38
Tabela 3 -	Análise de regressão entre os dados de expressão gênica, ou entre expressão e variáveis relacionadas às concentrações de progesterona (P4).....	51

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	BIOLOGIA DA GESTAÇÃO INICIAL EM RUMINANTES	19
2.2	REGULAÇÃO DO AMBIENTE UTERINO PELOS HORMÔNIOS ESTEROIDES OVARIANOS	21
2.3	IMPORTÂNCIA DA GLICOSE PARA O DESENVOLVIMENTO DO EMBRIÃO.....	23
2.4	PROTEÍNAS CARREADORAS DE GLICOSE NO ÚTERO DE BOVINOS.....	24
2.4.1	Família SLC2A	24
2.4.2	Família SLC5A e outras SLCs relacionadas ao transporte de glicose	26
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	ANIMAIS E MANEJO REPRODUTIVO.....	27
3.1.1	Exames ultrassonográficos.....	29
3.2	OBTENÇÃO DE AMOSTRAS.....	30
3.2.1	Plasma para mensuração de progesterona.....	30
3.2.2	Endométrio para análises de expressão gênica e proteica.....	30
3.2.3	Corpo lúteo, dados morfológicos	30
3.2.4	Útero para imunohistoquímica.....	31
3.3	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	31
3.3.1	Extração de RNA	31
3.3.2	Síntese de cDNA.....	31
3.3.3	Extração de proteínas	32
3.4	ANÁLISES LABORATORIAIS	32
3.4.1	Reação de polimerase em cadeia em tempo real.....	32
3.4.2	Desenho de primers e validação.....	34
3.4.3	Eletroforese	38
3.4.4	Sequenciamento de produtos de PCR	39
3.4.5	Western blot.....	39
3.4.6	Imunohistoquímica	40
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1	MODELO ANIMAL	43
4.2	EXPRESSÃO GÊNICA.....	46
4.3	DADOS DE EXPRESSÃO PROTEICA	51
4.4	LOCALIZAÇÃO PROTEICA.....	52
5	CONCLUSÃO	56
6	IMPLICAÇÕES	57
	REFERÊNCIAS	58
	APÊNDICES	64

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior exportador mundial de carne bovina e precisa de melhorias na produção de bovinos de corte a fim de suprir a demanda nacional e internacional sem perder sua posição de destaque no mercado mundial de carne (ANUALPEC, 2012). Para otimizar o retorno financeiro da criação de bovinos de corte, é imprescindível melhorar as taxas de produção juntamente com as taxas de reprodução (OLIVEIRA et al., 2007), visto que o principal fator que altera a lucratividade da atividade é a reprodução (FORMIGONI et al., 2002). Além disso, a expectativa de aumento da população torna indispensável o aumento da eficiência da produção de carne, que inquestionavelmente depende de taxas reprodutivas mais elevadas que as observadas atualmente.

Perdas embrionárias tendem a ocorrer, em sua maioria até 14 dias após a fertilização e são importantes fatores causadores de prejuízos da indústria agrícola (DUNNE et al., 2000). Durante a gestação inicial, a mortalidade embrionária pode ser causada por fatores genéticos, fisiológicos, endócrinos ou ambientais (ASHWORTH; SALES; WULMUT, 1994; ZAVY, 1994).

Durante as primeiras semanas de gestação, o embrião encontra-se solto no lúmen uterino e a garantia de sua sobrevivência depende do endométrio que sintetiza, secreta e ainda transporta inúmeras substâncias como proteínas, inibidores de proteases, citocinas, fatores de crescimento, hormônios, aminoácidos e íons, que juntos formam o histotrofo (BAZER, 1975; ROBERTS; BAZER, 1988; KANE et al., 1997).

As oscilações hormonais que acontecem a cada ciclo coincidem com alterações que acontecem no útero e implicam sua preparação para receber o embrião. A progesterona, hormônio liberado pelo corpo lúteo, é o principal fator regulador das funções endometriais durante a gestação inicial (BAZER et al., 1979; SPENCER et al., 2004; SPENCER et al., 2007). Um correto funcionamento do útero é necessário para o desenvolvimento do embrião. De fato, demonstrou-se que existe associação positiva entre a concentração plasmática de progesterona medida sete dias após a inseminação e a probabilidade de concepção (DEMETRIO et al., 2007), o que ressalta a importância do papel da progesterona na primeira semana de gestação. Além disso, acelerado aumento nas concentrações de progesterona no período imediatamente após o cio está relacionado positivamente ao alongamento do conceito (GARRETT et al., 1988; CARTER et al., 2008; SATTERFIELD et al., 2009).

Estudos recentes evidenciaram mudanças temporais no perfil do transcriptoma do endométrio bovino no período peri-ovulatório. Tais mudanças levaram à conclusão de que condições de baixa progesterona levam a um ambiente uterino sub-ótimo e uma habilidade reduzida de promover o alongamento do conceito (FORDE et al., 2011). Em contraste a suplementação com progesterona após a ovulação altera a expressão gênica endometrial em estágios críticos do período peri-implantação do embrião (FORDE et al., 2009). Dentre os genes cuja expressão é alterada pela concentração de progesterona ainda no período peri-ovulatório encontram-se alguns que codificam proteínas carreadoras de solutos, que são cruciais na determinação da composição do histotrofo, do qual o conceito depende para seu crescimento e desenvolvimento (FORDE et al., 2010).

Como nem o endométrio nem o conceito realizam gliconeogênese, a glicose depende de transportadores específicos para ser levada até o lúmen uterino (LEESE; BARTON, 1984; MOLEY et al., 1998) o que justifica a extrema importância da presença das proteínas carreadoras no endométrio nas primeiras semanas de gestação. O transporte de glicose pela membrana plasmática pode ser mediado por um ou mais membros de duas famílias de transportadores de glicose: os facilitadores (SLC2A ou GLUT) e os dependentes de sódio (sódio/glicose co-transportadores SLC5A ou SGLT; WOOD; TRAYHURN, 2003).

Membros dessas famílias de transportadores estavam presentes em clusters de genes que tiveram sua expressão alterada pela concentração de progesterona no período imediatamente após a ovulação (SHIMIZU et al., 2010). Ainda Gao et al., (2009) relataram que alguns membros das famílias SLC2A e SLC5A têm sua expressão induzida pela progesterona no epitélio luminal, glandular e/ou glandular superficial e estroma do endométrio, bem como trofotoderma e endoderma extraembrionário.

Porém, os efeitos positivos da progesterona após a ovulação na receptividade do útero, também estão relacionados às concentrações de estradiol antes da ovulação, ou seja, a criação de um ambiente uterino favorável ao desenvolvimento embrionário se dá em resposta a oscilações dos esteroides sexuais antes, durante e após a ovulação. Os modelos até hoje propostos para estudo do ambiente uterino em resposta a esteroides se caracterizam por modelos essencialmente farmacológicos, mediante suplementação de hormônios sexuais em animais ovariectomizados (SHIMIZU et al., 2010), suplementação de progesterona após a ovulação (CARTER et al., 2008) ou ainda redução da função do corpo lúteo após a ovulação (BELTMAN et al., 2009).

O presente tem por **objetivo** um estudo da influência das oscilações hormonais durante o período peri-ovulatório na abundância transcritos e proteínas pertencentes às

famílias de transportadores de glicose no endométrio de vacas de corte no dia 7 após a indução da ovulação. Para isso propõe-se a modulação do crescimento do folículo pré-ovulatório de vacas Nelore, com a finalidade de manipular a formação e crescimento do corpo lúteo subsequente e decorrentes concentrações de progesterona circulante. Este modelo experimental visa testar a **hipótese** de que o ambiente endócrino peri-ovulatório regula a via das proteínas carreadoras de glicose no endométrio de vacas de corte na primeira semana do ciclo estral (Figura 1).

Figura 1- Modelo hipotético gráfico

Fonte: (FRANÇA, M. R, 2012)

Transporte da glicose por intermédio das SLCs em resposta a diferentes ambientes endócrinos no período peri-ovulatório. Maiores concentrações de progesterona no diestro induzem um aumento na expressão gênica e proteica de transportadores de glicose levando ao aumento na concentração de glicose disponível no histotrofo. A glicose é transportada até o lúmen uterino, onde compõe juntamente com outras substâncias, o histotrofo. Folículo pré-ovulatório (FPO). Corpo lúteo (CL). Dia da indução da ovulação (D0). Dia 7 após a indução da ovulação (D7). Seta vermelha para cima indica alta concentração de progesterona [P4]. Seta vermelha para baixo indica baixa concentração de progesterona.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta revisão de literatura serão abordados temas referentes à biologia da gestação inicial em bovinos, regulação do ambiente uterino pelos hormônios esteroides ovarianos, importância da glicose para o desenvolvimento do embrião e proteínas carreadoras de glicose no útero de bovinos.

2.1 BIOLOGIA DA GESTAÇÃO INICIAL EM RUMINANTES

Estímulos endócrinos e parácrinos que atuam em oócitos imaturos levam à retomada da meiose do gameta feminino e ovulação (revisado por MEHLMANN, 2005). Após a ovulação, o oócito entra na tuba uterina. Na presença de espermatozoides já capacitados ocorre a fertilização. A sequência dos eventos de capacitação espermática, penetração no oócito, ativação e conclusão da meiose II precede a série de ciclos de divisões celulares que caracteriza a fase de clivagens embrionárias (revisado por BARNES; EYESTONE, 1990).

Até o estágio de 16 células, o embrião é caracterizado pelo número de células. A partir deste momento ele passa a ser denominado mórula. Este estágio é atingido por volta do dia 5 após a fertilização. Nesse momento, ocorre a passagem do embrião do oviduto para o lúmen uterino. No próximo estágio, 32 células, tem início o processo de compactação. Este evento é de extrema importância, pois é considerado um pré-requisito para a formação da blastocèle e consequente expansão do embrião, a blastocèle é uma cavidade repleta de fluido que aparece entre os dias 6 e 7 e representa a transformação de uma estrutura compacta, a mórula, em blastocisto, que inicialmente é composto por cerca de 100 células (revisado por BETTERIDGE; FLÉCHON, 1988).

O blastocisto passa então por um período de expansão, entre os dias 7 e 8, quando ocorre um aumento no diâmetro da estrutura e uma diminuição na espessura da zona pelúcida. Em seguida, ocorre a eclosão e inicia-se o processo de alongação que tem início aproximadamente no dia 12 e fim por volta do dia 18 após a fertilização (revisado por PEIPPO; MACHATY; PETER, 2011).

Ainda no início da gestação, ocorrem algumas mudanças no transcriptoma endometrial mesmo na ausência do conceito, ou seja, as primeiras mudanças até o reconhecimento da gestação são independentes da presença do embrião (FORDE et al., 2011). Para que ocorra sucesso gestacional, é necessário que o conceito secrete quantidades suficientes de interferon-tau (IFN- τ) a fim de inibir a produção de prostaglandina F2 α pelo endométrio e consequente luteólise (revisado por FORDE; LONERGAN, 2012). A partir deste momento, ocorre a regulação de genes no endométrio induzida pelo interferon e em alguns casos regulada pela progesterona (FORDE et al., 2011). Além do interferon, outras moléculas derivadas do conceito podem provocar mudanças específicas no endométrio relacionadas à gestação (MAMO, 2012).

Este prolongado período pré-implantação de embriões bovinos permite a fácil obtenção de conceitos, a base da indústria de transferência de embriões (BETTERIDGE; FLÉCHON, 1988). Por outro lado, até que ocorra a implantação, ainda sem contato com o tecido materno, o conceito encontra-se flutuante no lúmen uterino e depende do histotrofo para seu desenvolvimento.

Histotrofo é um complexo de enzimas, fatores de crescimento, citocinas, linfocinas, hormônios, proteínas de transporte entre outras substâncias transportadas ou secretadas das glândulas endometriais para o lúmen uterino (SPENCER; BAZER, 2004).

No início da gestação, o conceito que trata-se do embrião juntamente com as membranas extraembrionárias, depende do endométrio para seu desenvolvimento, visto que nesta fase ainda não ocorreu a placentação e o conceito tem contato direto apenas com o histotrofo (SPENCER; BAZER, 2004). Durante esta fase em que o conceito permanece flutuante nas secreções uterinas, o blastocisto sofre, em um curto período de tempo, uma expansão associada ao alongamento da vesícula trofoblástica e atinge o comprimento do corno ipsilateral ao lado da ovulação (CHAVATTE-PALMER; GUILLOMOT, 2007).

A exposição de ovelhas no período pré-natal a 19-norprogestina do nascimento até oito semanas de idade induz a ablação epigenética da morfogênese de glândulas endometriais sem alterar a formação do miométrio ou outras estruturas do trato reprodutivo feminino que derivam do ducto Mulleriano. Este tratamento deu origem ao modelo de ovelhas knockout para glândulas uterinas (GRAY et al., 2000).

A ausência de glândulas uterinas em ovinos levou ao insucesso no desenvolvimento do conceito. Além disso, a infusão de interferon-tau no útero de ovelhas knockout aumentou a expressão de genes estimulados pelo interferon-tau no endométrio desses animais. Portanto, a falha no desenvolvimento do conceito nesses animais parece estar

relacionada à ausência das glândulas e suas secreções e não à incapacidade do endométrio em responder a estímulos do concepto (GRAY et al., 2002).

Esses resultados corroboram com evidências de que o histotrofo é indispensável para que o concepto obtenha êxito na fase de crescimento garantindo sucesso na manutenção da gestação (SPENCER; BAZER, 2004).

2.2 REGULAÇÃO DO AMBIENTE UTERINO PELOS HORMÔNIOS ESTEROIDES OVARIANOS

Durante os diferentes períodos do ciclo estral de bovinos, ocorre uma oscilação nas concentrações dos hormônios esteroides progesterona e estradiol. Ocorre prevalência na circulação de progesterona, estradiol e progesterona durante o diestro, proestro-estro e metaestro, respectivamente. Essa sequência de exposição do endométrio aos hormônios esteroides ovarianos é de extrema importância para a sobrevivência do embrião e sucesso da gestação (MILLER, 1976). Variações na síntese e secreção de proteínas pelas células do oviduto e do epitélio e estroma do endométrio bovino ocorrem em resposta a variações na produção de estradiol e progesterona e seus receptores (BINELLI et al., 1999; BAUERSACHS et al., 2004; BAUERSACHS et al., 2005).

A exposição de vacas ovariectomizadas ao estradiol aumentou a expressão de genes relacionados ao ciclo celular, morfogênese e diferenciação celular no endométrio. A exposição desses animais a estradiol precedido de uma exposição à progesterona levou a um aumento na expressão endometrial de genes relacionados a migração, diferenciação e adesão celular. Esta interação entre esses dois hormônios no endométrio pode estar relacionada a uma remodelação tecidual controlada, necessária ao funcionamento do endométrio (SHIMIZU et al., 2010).

Secreções continuadas de progesterona pelo corpo lúteo estimulam e mantêm funções endometriais cruciais para crescimento, alongamento e pré-implantação do concepto bovino (THATCHER et al., 1984; SPENCER; BAZER, 2004). Concentrações de progesterona pós-estro parecem controlar secreções do endométrio que contribuem para a composição do histotrofo em ovinos e bovinos (FORDE et al., 2010).

A indução de concentrações mais altas de progesterona na primeira semana de

gestação em gado de corte está associada ao aumento do tamanho no concepto entre os dias 14 e 16 de gestação (GARRET et al., 1988; CARTER et al., 2008). Este incremento no tamanho do concepto em resposta a altas concentrações de progesterona durante o diestro se deve a mudanças no ambiente onde o embrião se desenvolve e não a uma ação direta da progesterona no embrião (CLEMENTE et al., 2009).

Uma série de alterações no transcriptoma do endométrio de ruminantes em resposta a esteroides já foi descrita. Dentre os genes cuja expressão é alterada pela concentração de progesterona ainda no período pós-ovulatório encontram-se alguns que codificam proteínas carreadoras, que são cruciais na determinação da composição do histotrofo, do qual o concepto depende para seu crescimento e desenvolvimento (FORDE et al., 2010).

De fato, maiores concentrações de progesterona obtidas através da suplementação do hormônio após indução da regressão do corpo lúteo alterou a composição dos fluidos do oviduto e útero, porém de forma diferente em cada meio. A concentração de aminoácidos aumentou no oviduto por estímulo da progesterona, porém não houve alterações nas concentrações das fontes de energia. Já no útero, o esteroide provocou aumento na concentração de glicose no histotrofo (HUGENTOBLE et al., 2010). Esta regulação local do transporte de substâncias atende às necessidades do embrião, que no início de seu desenvolvimento, enquanto localizado no oviduto, não depende da glicose como fonte de energia, porém após atingir a fase de blastocisto e passar do oviduto para o lúmen uterino utiliza a glicose como sua principal fonte de energia (LEESE; BARTON, 1984; KIM et al., 1993).

Concentrações mais altas de progesterona no dia 5 pós-estro, ou a suplementação de progesterona nos dias 1 a 4 ou 5 a 9 pós-inseminação favoreceram o desenvolvimento embrionário, induziram a secreção de proteínas para o fluido uterino e estimularam a produção de IFN- τ (GARRETT et al., 1988; GREEN, et al., 2005; MANN et al., 2006).

Ovelhas suplementadas com progesterona nos dias 9 ou 12 após inseminação tiveram aumento na abundância de transcritos de genes de transportadores de glicose e aminoácidos associada ao aumento da concentração desses substratos no lavado uterino em comparação aos animais que não receberam suplementação do hormônio. Adicionalmente, animais que receberam a suplementação de progesterona seguida da administração de uma substância antiprogestina do dia 8 ao dia 12 não manifestaram alterações no perfil dos transcritos no endométrio nem da composição do histotrofo (SATTERFIELD et al., 2009). Esses dados evidenciam a influência específica da progesterona na regulação do transporte de

glicose no endométrio.

2.3 IMPORTÂNCIA DA GLICOSE PARA O DESENVOLVIMENTO DO EMBRIÃO

A glicose é uma molécula composta por seis carbonos e serve como substrato tanto para produção de energia quanto para síntese de moléculas complexas. Após entrar na célula e ser fosforilada a glicose-6-fosfato, a glicose participa de quatro vias principais sendo elas a produção de ATP, NADPH, glicosamina-6-fosfato e glutamato ou ainda glicogênio para armazenamento (RIEGER, 1992).

Difícilmente ocorrerá o desenvolvimento do conceito na ausência de substratos energéticos (KIM et al., 1993). Durante as primeiras semanas após a fertilização, ocorrem mudanças nas necessidades nutricionais do embrião. Desde as primeiras divisões celulares até a blastulação, o substrato de maior importância para o desenvolvimento do conceito parece ser o piruvato. A partir da fase de blástula, a glicose passa ser a mais importante fonte de energia (LEESE; BARTON, 1984; KIM et al., 1993), porém em seu estudo, Rieger et al., (1992) sugeriram que a relação glicose e glutamina tem grande importância a partir do início do estágio de clivagem. A captação de glicose pelo embrião parece ser um indicador positivo do potencial de desenvolvimento fetal (FLEMING et al., 2004).

Mesmo sendo indispensável para o desenvolvimento inicial do embrião a glicose em altas concentrações pode ser desfavorável para o crescimento do conceito (RIEGER et al., 1995). Portanto, é necessário que exista um controle na quantidade de glicose a ser disponibilizada no histotrofo para garantir o crescimento do conceito sem prejudicar seu desenvolvimento.

Efeitos de distúrbios nutricionais e no desenvolvimento sofridos durante o início das divisões celulares afetam toda a trajetória de desenvolvimento embrionário e fetal. As variáveis associadas ao metabolismo do embrião estão relacionadas ao crescimento futuro e atividade fisiológica (FLEMING et al., 2004).

A glicose depende da presença de transportadores específicos no endométrio para ser levado até o lúmen uterino, visto que nem o endométrio nem o conceito realizam gliconeogênese (MOLEY et al., 1998; LEESE et al., 1984).

O primeiro passo na utilização da glicose é a sua captação para dentro da célula que pode ser mediada por um co-transportador de glicose sódio-dependente (SGLTs,

atualmente chamado de SLC5A) ou por um transportador facilitador de glicose (GLUTs, atualmente chamado de SLC2A; FROLOVA; MOLEY, 2011). São membros destas duas famílias que farão ainda o transporte da glicose até o lúmen uterino.

Além da glicose outras substâncias importantes para o desenvolvimento do embrião também precisam de carreadores para que sejam disponibilizadas no histotrofo. O transporte de aminoácidos pela membrana plasmática representa a primeira etapa de sua utilização pelas células (WU et al., 2008), pois os carreadores de aminoácidos regulam a concentração dos aminoácidos livres em células e tecidos, incluindo placenta e endométrio (SMITH et al., 2003). As mudanças nas concentrações dos aminoácidos nos fluidos uterinos são controladas pelas diferentes concentrações de seus transportadores, membros da família SLC7A das proteínas carreadoras de solutos (GROEBNER et al., 2011).

2.4 PROTEÍNAS CARREADORAS DE GLICOSE NO ÚTERO DE BOVINOS

O transporte de glicose através da membrana das células pode ser mediado por membros de duas famílias de transportadores de glicose: SLC2A e SLC5A (WOOD; TRAYHURN, 2003).

2.4.1 Família SLC2A

A família SLC2A também conhecida como GLUT engloba proteínas que fazem o transporte facilitado da glicose e outros açúcares através da membrana plasmática pelo gradiente de difusão (WOOD; TRAYHURN, 2003). São doze membros já descritos (SLC2A1 até SLC2A12), e um transportador mio-inositol acoplado a H^+ SLC2A13 (RILEY; MOLEY, 2006). Diferentes membros desta família apresentam sequências conservadas localizadas distintamente na estrutura primária, porém não se pode prever o substrato específico de transporte pela presença dessas sequências (ULDRY; THORENS, 2004).

Esta família é subdividida em três classes de transportadores facilitados. A Classe I abrange os membros SLC2A1 a SLC2A4, responsáveis pelo transporte de glicose. A Classe II contém o transportador de frutose SLC2A5 e ainda SLC2A7 e SLC2A9. A Classe III engloba os transportadores SLC2A6, SLC2A8, SLC2A10, SLC2A12 e SLC2A13. Uma das

características da terceira classe é que sítio de glicosilação se localiza em uma região distinta dos outros membros da família (WOOD; TRAYHURN, 2003).

SLC2A1 pode ser encontrada em quase todos os tecidos, em diferentes níveis de expressão em diferentes tipos celulares (ULDRY; THORENS, 2004). Possui grande afinidade para o transporte de glicose e sua expressão no endométrio está associada a uma resposta a concentrações dos hormônios esteroides ovarianos (FROLOVA; MOLEY, 2011).

No endométrio de vacas ovariectomizadas, sua expressão aumentou em resposta a administração de progesterona (SHIMIZU et al., 2010). Em ovinos SLC2A1 está presente no epitélio luminal uterino e sua expressão é induzida por progesterona e estimulada por IFN- τ (GAO et al., 2009; SATTERFIRLD et al., 2009).

SLC2A3 transporta glicose com alta afinidade (ULDRY; THORENS, 2004). No útero de murinos se localiza preferencialmente nas células do estroma, mas também está presente no lúmen. Embriões de camundongos knockout para SLC2A3 tiveram apoptose induzida. Esta proteína depende de uma exposição à glicose para indução da sua expressão em embriões associada à passagem do estágio de mórula para o estágio de blastocisto (FROLOVA; MOLEY, 2011).

SLC2A4 é o transportador de glicose mais estudado. Sua relevante atuação na homeostase da glicose na célula se deve ao estímulo da translocação da proteína do citoplasma até a membrana pela insulina (THORENS; MUECKLER, 2010). A ligação da insulina ao seu receptor na superfície celular leva a um aumento na atividade celular de transporte de glicose. Porém, esta pode não ser a única via de ativação da SLC2A4. Em menor escala, a translocação desta proteína já foi descrita em resposta a uma sinalização regulada pela AMP ativada por proteína quinase (HOLMAN et al., 1990).

SLC2A5 possui alta afinidade para o transporte de frutose, mas também pode atuar no transporte de glicose em menor escala (ULDRY; THORENS, 2004). No dia 7 do ciclo estral, altas concentrações de progesterona, induzidas através da inserção de dispositivos vaginais liberadores de P4, estimularam a expressão de SLC2A5 no endométrio de novilhas (FORDE et al., 2010).

2.4.2 Família SLC5A e Outras SLCs Relacionadas ao Transporte de Glicose

Membros da família SLC5A são os transportadores de glicose dependentes de sódio, que atuam conduzindo a glicose contra os gradientes eletroquímicos, o que é importante para o transporte de glicose pelo endométrio para dentro do lúmen uterino (GARDNER et al., 1996). Esta família inclui mais de 200 membros entre animais e bactérias (WRIGHT; TURK, 2004).

Pouco se sabe ainda sobre essas proteínas, a SLC5A1 parece ter baixa afinidade para o transporte de glicose. A expressão desta proteína no endométrio foi induzida por suplementação de progesterona no diestro em novilhas (SHIMIZU et al., 2010).

Não existem estudos sobre a SLC37A4 e as ATPases (ATP1A2 e ATP1B2) no útero de espécies de mamíferos. A SLC37A4, também denominada transportadora de G-6-P (G6PT) é expressa ubiquitosamente e é co-dependente da enzima Glicose-6-fosfatase (G6Pase) para transporte de G6P para o lúmen do retículo endoplasmático (FROISSART et al., 2011).

As ATPases são transportadores de íons. Caracterizam-se por proteínas heterodímeras de membrana e regulam a homeostase iônica de células e transporte de substratos (WANG; O'DOHERTY, 2012). ATP1B2 e ATP1A2 são membros da família das Na^+/K^+ -ATPases (também denominadas Na, K-ATPase ou ATPase transportadora de sódio/potássio). Esses transportadores possuem funções ainda não totalmente elucidadas, porém em células de mamíferos geram gradientes de íons que mantêm o potencial da membrana e auxiliam no transporte de outros solutos principalmente em transporte dependente de sódio (CLAUSEN; EVERTS, 1989).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E MANEJO REPRODUTIVO

O experimento foi realizado na Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga. Foram utilizadas 60 vacas Nelore (*Bos indicus*) pluríparas, cíclicas, não lactantes, sem afecções reprodutivas detectáveis por exame ginecológico e com escore corporal entre 3 e 4 (0:magra, 5:obesa). Os animais foram mantidos a pasto e suplementados com cana de açúcar e/ou silagem de milho, concentrado e sais minerais e água *ad libitum*. As dietas foram formuladas para atenderem às exigências de manutenção para vacas de corte.

O objetivo do manejo reprodutivo foi estabelecer um protocolo hormonal a fim de manipular o ambiente endócrino peri-ovulatório e possibilitar a formação de dois grupos com distintos tamanhos de folículos pré-ovulatórios que levassem ao desenvolvimento de corpos lúteos com distintas concentrações de progesterona no diestro subsequente à ovulação desses folículos. A manipulação do crescimento do folículo pré-ovulatório foi baseada na conhecida influência da progesterona na frequência de pulsos de liberação do hormônio luteinizante (LH). A progesterona reduz a frequência dos pulsos de LH e em consequência ocasiona menor estímulo ao crescimento do folículo após o momento da divergência de crescimento folicular (PFEIFER et al., 2009). Corpos lúteos subsequentes à ovulação de folículos maiores tendem a ser maiores e capazes de produzir mais progesterona em relação a corpos lúteos menores (CARTER et al., 2008; MANN, 2009). Baseando-se nesse princípio, estabeleceu-se um protocolo-base de tratamentos hormonais e testaram-se variações pontuais desse protocolo para melhorar sua eficácia em produzir grupos de animais distintos quanto ao crescimento folicular e função luteínica. Não foi objetivo dessa dissertação apresentar, comparar ou discutir os detalhes de cada protocolo. Assim, foi descrito abaixo o protocolo-base utilizado e, quando relevante, modificações realizadas serão apontadas no texto.

No protocolo-base, as vacas foram submetidas a uma pré-sincronização do ciclo estral. Para tanto os animais receberam duas aplicações de 0,5 mg de prostaglandina F2 α (Cloprostenol Sódico; Sincrocio[®]; Ourofino, Cravinhos, SP, Brasil), administradas com 14 dias de intervalo (Figura 2). Objetivou-se obter animais contendo um corpo lúteo responsivo à prostaglandina 10 dias após a segunda aplicação (dia experimental -10; D-10). A presença do

corpo lúteo foi confirmada por exame ultrassonográfico transretal (US). No D-10, todos os animais receberam 2 mg de Benzoato de Estradiol (Sincrodiol[®]; Ourofino, Cravinhos, SP, Brasil) para induzir o recrutamento de uma nova onda de crescimento folicular e a inserção de um dispositivo intravaginal liberador de progesterona de primeiro uso (1g; Sincrogest[®]; Ourofino, Cravinhos, SP, Brasil). Neste momento os animais foram divididos nos grupos Alta Progesterona Pós-ovulação (AP) e Baixa Progesterona Pós-ovulação (BP). Ainda nesse dia, os animais do grupo AP receberam uma aplicação de prostaglandina F2 α (0,5 mg de Cloprostenol sódico; Sincrocio[®]). A PGF foi aplicada nos animais do grupo AP com o intuito de lisar o corpo lúteo, com isso, os animais deste grupo teriam progesterona circulante apenas exógena, proveniente do dispositivo intravaginal. Raciocinou-se que a concentração plasmática de progesterona durante o crescimento folicular desses animais seria menor que a dos animais do grupo BP, visto que os animais do grupo BP teriam fonte endógena (corpo lúteo) e exógena (Sincrogest[®]) de progesterona durante o crescimento folicular. Em comparação ao grupo BP, a menor concentração de progesterona circulante nos animais do grupo AP resultaria em maior frequência dos pulsos de LH, estimulando o crescimento folicular. Sessenta horas antes da indução da ovulação retirou-se o dispositivo de progesterona e administrou-se mais uma injeção de prostaglandina nos animais do grupo AP. Para os animais do grupo BP, esse procedimento ocorreu 12 horas depois (D-2,5 e D-2 respectivamente). Dessa forma, os folículos pré-ovulatórios dos animais do grupo AP tiveram 12 horas a mais para crescer na ausência de progesterona. A ovulação foi induzida por hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH; 1 μ g de acetato de buserelina; Sincroforte[®]; Ourofino, Cravinhos, SP, Brasil) no D0. Em uma tentativa de obter maiores diferenças entre diâmetro de folículos pré-ovulatórios e corpos lúteos subsequentes e concentrações de progesterona no diestro um segundo protocolo foi realizado usando implantes de progesterona de segundo uso. Além disso, a retirada dos dispositivos intravaginais dos animais do grupo alta progesterona ocorreu no mesmo momento, 60 a 48 horas antes da indução da ovulação, porém os animais do grupo baixa progesterona tiveram os dispositivos removidos 12 a 24 horas depois dos animais do grupo AP, 48 a 30 horas antes da indução da ovulação. Os dois protocolos levaram a semelhantes resultados quanto às variáveis acessadas no experimento.

Crescimento folicular, ovulação, formação e tamanho do corpo lúteo foram acessados por exame ultrassonográfico transretal a cada 24 horas a partir do D-2. Somente os animais que ovularam em resposta ao GnRH foram incluídos nas análises (n=36). No dia 7 após a indução da ovulação os animais foram abatidos. O dia 7 após a indução da ovulação foi escolhido para a coleta de amostras teciduais por ser um momento crítico para a fertilidade de

vacas. É o momento subsequente à passagem do embrião do oviduto para o corno uterino. A partir desse momento ocorre contato com o ambiente uterino cuja composição poderá interferir no sucesso gestacional. Além disso, a composição de tal ambiente pode ser alterada pelas concentrações de hormônios esteroides. Por exemplo, existe uma correlação positiva linear entre a probabilidade de sucesso gestacional e a concentração plasmática de progesterona no dia 7 pós-estro em vacas de leite e de corte (DEMETRIO et al., 2007; FORDE et al., 2009).

Figura 2 - Protocolo-base do manejo reprodutivo experimental dos animais para obtenção de amostras

Fonte: (FRANÇA, M. R, 2012)

Vacas Nelore, solteiras, cíclicas foram pré-sincronizadas, e então receberam nada (Grupo Baixa Progesterona; BP) ou uma injeção de PGF2 α (Grupo Alta Progesterona; AP) no momento da inserção de dispositivo intravaginal liberador de P4 (Sincrogest) de primeiro ou segundo uso. Benzoato de estradiol (BE). Prostaglandina F2 α (PGF). Asteriscos vermelhos indicam coleta de sangue para mensuração de P4 por RIE. A retirada do implante de progesterona ocorreu de 60 a 42 horas antes da indução da ovulação com GnRH para os animais do grupo AP e 48 a 30 horas antes da indução da ovulação para os animais do grupo BP.

3.1.1 Exames ultrassonográficos

Os exames ultrassonográficos foram feitos via transretal utilizando-se tanto um aparato Aloka SSD-500 equipado com uma sonda linear de 5MHz quanto um aparato Esaote MyLab 10 e com sonda multifrequencial e frequência selecionada entre 6 e 7.5 MHz. Considerou-se como ovulação o momento do desaparecimento do folículo dominante presente no ovário no último exame e aparecimento do corpo lúteo na mesma região do ovário. Os

diâmetros dos folículos e dos corpos lúteos foram determinados pela média de duas medidas perpendiculares de cada estrutura. Foi considerado folículo pré-ovulatório a última medida do folículo dominante antes da ovulação.

3.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

3.2.1 Plasma para Mensuração de Progesterona

Nos dias -10, -6 e -2 a 7 foi coletado sangue da veia jugular dos animais em tubos vacuolizados contendo heparina. Imediatamente após a coleta, o sangue foi armazenado em gelo e centrifugado a 1500 x g por 30 minutos a 4°C. O plasma foi aliquoteado e armazenado a -20°C até a realização do radioimunoensaio com kit coat-a-count progesterone (Siemens Medical Solutions Diagnostics) validado previamente para amostras de plasma bovino (GARBARINO et al., 2004).

3.2.2 Endométrio para Análises de Expressão Gênica e Proteica

Após o abate dos animais, o útero foi removido e a região intercaruncular do endométrio foi dissecada, sendo obtidas porções do terço médio do corno ipsilateral ao ovário com corpo lúteo. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido, maceradas e armazenadas em criotubos a -80°C até processamento para extração de RNA e proteína.

3.2.3 Corpo Lúteo, Dados Morfológicos

Os ovários foram removidos, pesados e o corpo lúteo separado, pesado e medido com paquímetro. Foram feitas três medidas do corpo lúteo, altura, largura e profundidade e a média dessas três medidas foi considerado como diâmetro. Para cálculo do volume do corpo lúteo foi utilizada a fórmula aritmética do volume da esfera ($V = 4/3\pi R^3$) sendo R o valor da metade do diâmetro calculado.

3.2.4 Útero para Imunohistoquímica

Um corte transversal com média de 2,5 cm de diâmetro e aproximadamente 5 mm de espessura da porção medial do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo foi obtido e mantido em formol tamponado a 4°C por 24 horas. As amostras foram lavadas com PBS e armazenadas nesta solução a 4°C e lavadas novamente com PBS a cada 24h. Para emblocamento em parafina, as amostras foram armazenadas em álcool 70% e enviadas ao Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia da FMVZ-USP, onde foram incluídas em paraplast utilizando-se os métodos convencionais. Cortes de 2 µm foram preparados e aderidos a lâminas silanizadas até a condução das análises de imunohistoquímica.

3.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

3.3.1 Extração de RNA

Ácido ribonucleico (RNA) total foi extraído das amostras de tecido utilizando Kit “RNeasy mini” (Qiagen Laboratories), seguindo o procedimento indicado pelo fabricante. Para maximizar a lise celular, as suspensões de tecido foram passadas pelo menos 10 vezes por uma agulha 20G e centrifugadas a 13.000 x g durante 3 minutos, o sobrenadante foi utilizado para o processamento através das colunas de sílica. As colunas foram eluídas com 40 µL de água tratada sem RNase. A concentração e pureza do RNA foram estimadas por NanoDrop (<http://nanodrop.com/>) pela absorbância 260nm e pelas razões 260/280 e 260/230 respectivamente. As amostras foram armazenadas a -80°C até a síntese de cDNA.

3.3.2 Síntese de cDNA

As amostras de RNA foram submetidas a síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA). Um micrograma de RNA total foi tratado com DNase I (Life

Technologies) em temperatura ambiente em uma reação de volume total de 10µL. Após 15 minutos, foi adicionado um microlitro de solução de EDTA (25mM) e o tubo foi aquecido a 65°C por 10 minutos para inativar a DNase I. Imediatamente após o tratamento com DNase foi iniciado o protocolo de transcrição reversa utilizando o kit “High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit” (Life Technologies) conforme instruções do fabricante.

3.3.3 Extração de Proteínas

Amostras de tecido endometrial congeladas foram submersas em nitrogênio líquido e maceradas. O macerado foi pesado e colocado em microtubo adicionado de solução de extração (Tris-base 50 mM; NaCl 300 mM, EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; DTT 1 mM; PMSF 0,5 mM; Glicerol 10%; Inibidor de protease; Triton) numa proporção de 10 mg de tecido para 100 µL de solução e armazenado em gelo por 30 minutos. O homogenato resultante foi passado repetidas vezes por uma agulha 40x12 mm e depois por uma agulha 30x8 mm sempre usando uma seringa de cinco mililitros. O microtubo contendo o homogenato foi centrifugado a 10.000xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi aliquoteado e armazenado a – 20°C. A quantificação de proteínas foi feita pelo método Bradford.

3.4 ANÁLISES LABORATORIAIS

3.4.1 Reação Polimerase em Cadeia em Tempo Real (qPCR):

Para obtenção dos dados de expressão gênica, análises por qPCR foram executadas, utilizando-se o aparato StepOnePlus® Applied Biosystem. Cada reação teve o volume de 20µL conforme Tabela 1. Foi utilizada placa de 96 poços e fita adesiva transparente para selar placas. O protocolo da reação de desnaturação, anelamento e curva de dissociação está representado na Figura 4. Para garantir a confiabilidade dos resultados de expressão gênica, seguiu-se uma sistemática analítica conforme ilustrado da Figura 3. Para as etapas de validação, utilizou-se um pool de cDNA constituído por volumes iguais de cDNA

de 22 amostras de endométrio, originárias tanto do grupo AP quanto BP. O pool de cDNA foi primeiramente diluído numa proporção de 1:80 para realização do teste de concentração dos primers. Para as reações de curva padrão o pool de cDNA foi diluído conforme tabela 2.

Figura 3- Fluxograma da quantificação de transcritos por qPCR

Fonte: (FRANÇA, M. R, 2012)

Primeiramente foi feito o desenho dos primers específicos para cada gene selecionado. Primers foram avaliados segundo critérios de qualidade e utilizados apenas após a confirmação de resultados satisfatórios. Realizaram-se testes de concentração de primers e curva padrão. Após escolha da concentração de primers para a reação de comparação entre grupos, foi realizada a comparação de abundância de transcritos entre os tecidos dos animais do grupo alta progesterona após a ovulação (AP) e baixa progesterona após a ovulação (BP). Para confirmação da amplificação específica da região delimitada pelo par de primers, o produto da reação de qPCR foi separado por eletroforese em gel de agarose. Buscou-se visualizar banda única e com o peso molecular esperado para o do produto de PCR. Confirmação definitiva da identidade do produto de PCR foi obtida por sequenciamento.

Tabela 1- Volumes (µL) e descrição de reagentes utilizados para procedimentos com qPCR para teste de concentração de primers, curva-padrão e comparação entre grupos

Concentração de Primer	Reagente					Total
	SyBR Green	Primer Senso	Primer Anti-Senso	Água	cDNA	
150nM	10	0,3	0,3	5,4	4,0	20
300nM	10	0,6	0,6	4,8	4,0	20
600nM	10	1,2	1,2	2,6	4,0	20

O gráfico apresenta a evolução da temperatura e do estado da bateria ao longo de 40 ciclos. O eixo vertical representa a temperatura em graus Celsius (°C), variando de 0 a 100. O eixo horizontal representa o tempo em horas e minutos, dividido em três fases principais: Estágio de espera, Ciclos (40 ciclos) e Curva de Dissociação.

Estágio de espera: A temperatura sobe de 25°C para 95,0°C em 10,00 horas. A coleta de dados está ligada (ícone verde).

Ciclos (40 ciclos): A temperatura permanece constante em 95,0°C por 00:15 horas. A coleta de dados está desligada (ícone amarelo). O ciclo é dividido em duas partes: 1 ciclo e 2 ciclos.

Curva de Dissociação: A temperatura desce de 95,0°C para 60,0°C em 01:00 horas. A coleta de dados está ligada (ícone verde). O ciclo é dividido em duas partes: 1 ciclo e 2 ciclos.

Legenda:

- Coleta de dados ligada (ícone verde)
- Coleta de dados desligada (ícone amarelo)

Estágio de espera: 95°C por 10 minutos. 40 Ciclos: Desnaturação, aumento de temperatura e separação da fita dupla (95°C por 15 segundos), Anelamento, primers se ligam a sua região homóloga no cDNA (60°C por 1 minuto). Curva de dissociação. 1, 2 e 3 indicam as etapas de cada estágio.

Para amplificação de um produto único em uma reação de polimerase em cadeia (PCR), é necessário que os oligonucleotídeos iniciadores (primers) senso e anti-senso sejam específicos para o gene a ser detectado. Para isso, os genes de interesse foram localizados na base de dados da NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) e o identificador (Representative Public ID) de cada gene foi obtido. A ferramenta PrimerQuest^{QM} (IDT[®]; <http://idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest>) foi utilizada para determinar as sequências de pares de primers pelo fornecimento da identificação de cada gene (representative public ID; Quadro 1). Cada par de primer foi avaliado quanto à probabilidade de formação de hairpins, homodímeros e heterodímeros de primers utilizando o programa Oligo Analyzer 3.1 (IDT[®]; <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>). Tais sequências foram testadas quanto a sua especificidade usando o software “*Basic Local Alignment Search Tool*” (Blast; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Os pares de primers escolhidos foram sintetizados por laboratório terceirizado (<https://commerce.invitrogen.com>). Os primers chegaram ao laboratório liofilizados. Uma primeira re-suspensão foi feita com água tratada com DEPC livre de nucleases, gerando uma solução de estoque com concentração de 100 mM, armazenada a -20°C. Uma alíquota dessa solução foi diluída em

água para fazer a solução de trabalho, com concentração de 20 mM. Esta solução também foi armazenada a -20°C. Para validação dos primers, reações de qPCR com concentrações finais de cada reação de primers senso:anti-senso de 150:150 nM, 300:300 nM e 600:600 nM de primers foram testadas em duplicata com um pool de cDNA de endométrio de vários animais. Para a comparação dos resultados para a escolha da concentração de primers a ser usada, os dados fornecidos pelo software do aparato StepOnePlus foram analisados pelo software LinRegPCR (Ramakers et al., 2003; <http://www.genequantification.de/download.html#linregpcr>). A escolha foi feita considerando a concentração de primers que gerou: (1) eficiência da reação mais próxima a 100%, dentro de um intervalo de 85 a 110%, (2) curva de dissociação com pico único de amplificação para reações com cDNA e sem picos para reações controle, sem cDNA e (3) a menor concentração limiar (Ct). Após a escolha da concentração de primers para cada transcrito analisado, elaborou-se uma curva padrão. Diluições seriadas de pool de cDNA de endométrio bovino conforme a tabela 1 foram usadas em duplicata e a concentração de primers usada foi a escolhida no teste anterior. Para aceitação da curva, valores de inclinação da curva padrão (slope), coeficiente de determinação (r^2) e eficiência, fornecidos pelo software do aparato StepOnePlus foram analisados. Foram aceitas curvas com eficiência entre 83 e 110% e r^2 próximo de 1 (Tabela 3). Após a validação dos primers, testes de qPCR para a comparação da abundância de cada transcrito entre os grupos AP e BP foram feitos utilizando cDNA na diluição de 1:80 de cada animal em triplicata e a ciclofilina foi utilizada como gene constitutivo para correção dos resultados.

Quadro 1 - Características dos primers utilizados nas quantificações de transcritos das SLCs selecionadas

(Continua)

Gene	Símbolo do Gene	Identificação (Representative ID)	Sequência primer senso (5'-3')	Sequência primer anti-senso (5'-3')	Referências
Solute Carrier Family 2 member 1	SLC2A1	NM_174602.2	ATCATCTTCACCGTGCTCCTGGTT	TGTCACCTTTGACTTGCTCCTCCCT	PrimerQuest
Solute Carrier Family 2 member 3	SLC2A3	NM_174603.3	CCGATAGAGGACATTTTGGAGG	GATGGCGAAGATCAGAGGTG	PrimerQuest
Solute Carrier Family 2 member 4	SLC2A4	NM_174604.1	AGTTCCTAAGACAAGATGCCG	AGAATACGCCAAGGACCAAG	PrimerQuest
Solute Carrier Family 2 member 5	SLC2A5	NM_001101042.1	AGTCTCCTGGCAAACGAAGA	AAGAAGGGCAGGAAGAGGAG	PrimerQuest
Solute Carrier Family 5 member 1	SLC5A1	NM_174606.2	TCACCGCCCTTTACACAATC	CACCATACCCTCCCACTTC	PrimerQuest

(Conclusão)

Gene	Símbolo do Gene	Identificação (Representative ID)	Sequência primer senso (5'-3')	Sequência primer anti-senso (5'-3')	Referências
Solute Carrier Family 34 member 4	SLC37A4	NM_001193045.2	TACGCCATCAGCAAGTTTGTGAGC	AGGAACCAGAGAGCAGCAAAGACA	PrimerQuest
ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 2 polypeptide	ATP1A2	NM_001081524.1	TCCAGGGACACACAGAATGAGCTT	ACCAAGGCAGGTCTCCTAATGCTT	PrimerQuest
ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 2 polypeptide	ATP1B2	NM_174677.2	CTATGGTTACAGCACTGGACAG	GGAACATAACGAAGTTGCCG	PrimerQuest
Ciclofilina		NM_178320.2	GCCATGGAGCGCTTTGG	CCACAGTCAGCAATGGTGATCT	(BETTEGOW DA et al., 2006)

Tabela 2 - Ingredientes para preparação da curva padrão de cDNA obtido a partir de extratos de endométrio de vacas Nelore (volumes em μL)

Padrão	Solução de Origem	Volume da solução de origem	Volume de H ₂ O	Volume final
1	Pool cDNA	20	0	20
1:20	1	1	19	20
1:40	1:20	10	10	20
1:80	1:40	10	10	20
1:160	1:80	10	10	20

3.4.3 Eletroforese

Para visualização dos produtos de qPCR, eletroforese foi feita. Para isso, agarose foi diluída em TBE (Tris/Borato/EDTA) numa concentração de 2%. A solução foi aquecida seguidas vezes em forno micro-ondas em potência máxima até iniciar a fervura, entre um aquecimento e outro a solução foi homogeneizada, até que a agarose estivesse totalmente diluída. Utilizou-se corante fluorescente de ácidos nucleicos GelRedTM (1 μL /100mL; Biotium). Após resfriar até 50°C a solução foi despejada lentamente no suporte para gel com pente para oito poços evitando a formação de bolhas.

Após solidificação do gel, o pente foi retirado lentamente e o suporte foi alocado adequadamente na cuba para eletroforese (Hoefer HE33, mini submarine electrophoresis unit) com a extremidade onde se localizam os poços voltada para o eletrodo negativo. A cuba foi preenchida com TBE 0,5x até cobrir o gel. Oito microlitros do produto de PCR foram adicionados a dois microlitros de tampão de corrida 5x (loading buffer) e dez microlitros desta solução foi colocado em cada poço do gel. Para cada gene testado, foi feito um controle positivo e um controle negativo. Para identificação do tamanho dos amplicons foi utilizado padrão de corrida de 100 pares de bases (Promega Corporation). A corrida do gel foi feita a uma tensão de 150V por 45 minutos. Após a corrida as bandas foram escaneadas usando fotodocumentador (DNR Bio-Imaging Systems; MiniBis Camera) com luz UV e o software GelCapture. Buscou-se identificar o peso molecular da banda em comparação ao padrão de corrida e o tamanho do amplicon esperado para confirmar a amplificação somente da região específica delimitada pelos pares de primers. Além disso, esperou-se que os poços contendo amostras referentes ao controle negativo não apresentassem bandas.

3.4.4 Sequenciamento de Produtos de PCR

Para sequenciamento da porção amplificada na reação, produtos de PCR foram purificados utilizando QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen Laboratories). Os produtos de PCR foram quantificados por NanoVue (GE Life Sciences). As amostras foram diluídas e acrescidas das soluções dos respectivos primers (somente as soluções com primers senso) e encaminhadas para o Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo. As sequências dos resultados foram acessadas pelo software Chomaz (http://technelysium.com.au/) e testadas quanto a sua especificidade usando o software “*Basic Local Alignment Search Tool*” (Blast; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.4.5 Western Blot

Os extratos proteicos de quatro animais do grupo alta progesterona e de quatro animais do grupo baixa progesterona foram diluídos para a concentração final de 3,34µg/µL. Cinquenta microgramas de proteína total de cada amostra foram fracionados eletroforéticamente em gel de poliacrilamida a 10%. O fracionamento foi realizado em cuba de eletroforese Bio-Rad durante 120 minutos, em tampão de corrida, em tensão de 160 volts. Após a eletroforese, o gel foi equilibrado em tampão de transferência e submetido à transferência de proteínas para uma membrana de nitrocelulose. Utilizou-se membrana de nitrocelulose (Amersham Hybond ECL Nitrocellulose Membrane, GE Healthcare) para a transferência úmida, realizada em cuba de transferência Bio-Rad, durante 14 horas, em corrente de 60 mA. Após a transferência a membrana foi submetida ao bloqueio de ligações inespecíficas sendo utilizada solução de TBS contendo 0,1% de tween-20 e 5% de leite desnatado por 90 minutos.

A membrana foi então lavada em TBS-tween-20 (0,1% v/v) – TBST, quatro vezes por 10 minutos cada lavagem. A incubação com o anticorpo primário foi feita por 1 hora, em temperatura ambiente, usando-se os anticorpos anti Glut 1 (SLC2A1; Santa Cruz Biotechnology, Inc; sc-1605) na diluição de 1:500 em TBST e 1% de BSA; anti Glut 4 (SLC2A4; Milipore; #07-1404) na diluição de 1:100 em TBST e 1% de BSA e Anti β actina (Monoclonal anti β actin peroxidase produzida em camundongo; Sigma A3854) na diluição de 1:100000 em TBST e 5% de leite. Posteriormente a membrana foi lavada com TBST, quatro vezes por 10 minutos. Após as lavagens as membranas foram incubadas em anticorpo

secundário (donkey anti – goat, IgG-HRP; SC 2020, Santa Cruz Biotechnology) diluição 1:10000 (anticorpo primário anti Glut 1), e anticorpo secundário (goat anti rabbit IgG-HRP; SC 2004, Santa Cruz Biotechnology), diluição 1:10000 (anticorpo primário Glut 4) por 60 minutos. Nova lavagem foi realizada em TBST, quatro vezes por 10 minutos.

As membranas foram incubadas em solução de quimioluminescente (ECLTM Prime Western Blot Detection Reagent, GE Healthcare) na diluição 1:1, por 1 minuto. A membrana então foi exposta à captação de quimioluminescência em filme de raio X Kodak MXG, durante 1 minuto.

As bandas foram identificadas conforme o peso esperado em Kilodaltons (Kd).

Foi utilizado o software ImageJ freeware (WS Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) para avaliação da densitometria das bandas. Uma caixa é desenhada de forma que esta cubra a área da maior banda do blot, incluindo o mínimo possível da área em torno da banda. A mesma caixa é utilizada para todas as bandas e ainda para medir o background acima de cada banda. Este background é utilizado para corrigir o sinal da banda. O sinal corrigido da GLUT 1 é dividido/normalizado pelo sinal corrigido da β -actina. Posteriormente, a média dos valores normalizados do grupo LP é usada para normalizar todos os valores individuais normalizados. Estes valores normalizados pela média do grupo LP são utilizados para cálculo da média, erro padrão e comparação de médias.

3.4.6 Imunohistoquímica

Lâminas silanizadas foram desparafinadas em banhos de Xilol I e II e reidratadas em banhos em gradiente de álcool (álcool absoluto I e II, álcool 90%, álcool 70%) e água destilada. Em seguida, as amostras foram mantidas em solução de citrato (ácido cítrico monohidratado e citrato de sódio) por cinco minutos. Na sequência, as lâminas submersas em solução de citrato foram fervidas em forno micro-ondas, por 5 minutos em potência alta por 3 vezes, a cada intervalo água destilada era adicionada para compensar o volume evaporado. Depois de retiradas do micro-ondas, as lâminas permaneceram por 20 minutos em tampão citrato, em temperatura ambiente, para resfriar. Foram então realizadas duas lavagens em água destilada e uma em PBS com triton, com duração de 5 minutos cada lavagem. O bloqueio foi feito com peróxido de hidrogênio em metanol, por 30 minutos. Após o bloqueio foram feitas 3 lavagens em PBS com triton, de 5 minutos cada uma, com agitação. Após as lavagens que sucedem o bloqueio, as lâminas foram encaixadas em placas (Shandon CoverplateTM; Thermo

Scientific). Após 15 minutos em solução bloqueadora de proteína caseína (Protein block Serum-Free, X0909, Dako North America, Inc), 100 µL da solução de anticorpo (Quadro 2) foi incubada em câmara úmida a 4°C por 22 horas. Após período de incubação do anticorpo primário, foram feitas três lavagens de 5 minutos com PBS com triton e na sequência procedeu-se a incubação do anticorpo secundário universal biotinilado (Biotinylated Link; kit Dako LSAB + System-HRP, K0679, Dako North America, Inc) por 15 minutos. Passado esse tempo, foram feitas 3 lavagens de 5 minutos com PBS com triton seguidas por incubação da solução amplificadora estreptavidina-peroxidase (Streptavidin-HRP; kit Dako LSAB + System-HRP, K0679, Dako North America, Inc) por 15 minutos. As lâminas foram retiradas dos suportes e mantidas em câmara úmida para incubação com Diaminobenzidina (DAB; DAB + Substrate buffer; kit Dako LSAB + System-HRP, K0679, Dako North America, Inc). Após 5 minutos com DAB, as lâminas foram submersas em água destilada para retirar o excesso e então foram feitas 3 repetições de banho em água destilada com agitação por 10 minutos cada. As lâminas foram contracoradas em hematoxilina de Harris filtrada por 30 segundos e enxaguadas em água corrente por 10 minutos. Após a lavagem, as lâminas foram fixadas em gradiente de álcool (70%, 90%, absoluto I e II) e Xilol I e II por dois minutos em cada solução, e fechadas com permount e lamínula. Lâminas referentes aos controles negativos receberam o mesmo tratamento que as demais, porém foram incubadas com PBS+Triton no lugar dos anticorpos primários.

Quadro 2- Anticorpos usados na Imunohistoquímica

Anticorpo	Isotipo	Epitope	Diluição	Fornecedor
SLC2A1	IgG Policlonal Cabra	C-terminus	1:50	Santa Cruz Biotechnology, Inc (sc-1605)
SLC2A4	IgG Policlonal Coelho	C-Terminus	1:200	Milipore (#07-1404)

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram examinados para a normalidade dos resíduos usando o teste Shapiro-Wilk. Os dados que não seguiram a normalidade dos resíduos foram transformados

por rank. As concentrações de progesterona entre os dias 1 e 7 foram analisadas por análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas no tempo, considerando-se o efeito aleatório de vaca e os efeitos fixos de tratamento, dia e interação tratamento e dia utilizando-se o PROC mixed do software SAS (Versão 9.2; SAS Institute). Teste t de student não pareado foi usado para comparar médias entre os dois grupos dentro de cada dia. O teste de DMS (Diferença Mínima Significativa) foi utilizado para as comparações entre dias dentro de cada grupo. Para as variáveis discretas (diâmetro do folículo e CL, volume e peso do CL, taxa de aumento da progesterona, progesterona no D7, diferenças entre expressão gênica relativa e abundância de proteínas) as comparações foram feitas pelo teste t Student.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MODELO ANIMAL

Primeiramente, as avaliações realizadas visaram aferir a eficiência do manejo reprodutivo e estabelecer o modelo experimental. Variáveis relativas ao crescimento dos folículos dominantes e corpos lúteos e ainda as concentrações de progesterona após a ovulação foram avaliadas em cada grupo.

Em bovinos de corte, menores concentrações de progesterona durante o crescimento do folículo dominante aumentam seu diâmetro e capacidade estroidogênica. Corpos lúteos resultantes da ovulação de tais folículos apresentam maior volume e atividade esteroidogênica (VASCONCELOS et al., 2001; PFEIFER et al., 2009).

Com base nessas informações, o modelo animal utilizado nessa tese visou gerar grupos de animais com distintos perfis endócrinos no período peri-ovulatório. De fato, os animais do grupo AP tiveram maior diâmetro do folículo pré-ovulatório comparado aos animais do grupo BP. O maior diâmetro do folículo pré-ovulatório foi acompanhado pela formação de um corpo lúteo que no dia 7 apresentou maior diâmetro, peso e volume (Figura 5).

Não houve efeito do grupo na avaliação da dinâmica temporal das alterações de progesterona do dia 1 ao dia 7 após a indução da ovulação, porém houve efeito do dia e da interação entre grupo e dia ($P < 0,01$; Figura 6). Sugere-se a partir da interpretação da interação grupo por dia que o aumento na produção de progesterona após a indução da ovulação foi mais acentuada nos animais do grupo AP.

Além disso, a taxa de aumento da concentração de progesterona, que é a razão entre as concentrações desse hormônio nos dias 7 e 1, foi maior nos animais do grupo AP com relação aos animais do grupo BP ($P < 0,05$; Figura 6).

Os resultados atingidos com o manejo reprodutivo foram satisfatórios quanto a gerar grupos com distintas diferenças quanto ao desenvolvimento folicular, formação do corpo lúteo e consequentes concentrações de progesterona circulante. Desta forma, foi estabelecido o modelo experimental capaz de gerar dois grupos com distintos perfis hormonais acerca da ovulação.

Figura 5- Comparações das medidas de folículo e corpo lúteo entre os animais dos grupos alta progesterona após a ovulação (AP) e baixa progesterona após a ovulação (BP)

Fonte: (LFEM, 2012)

(A) Comparação do diâmetro do folículo pré-ovulatório entre os grupos; (B) Comparação do diâmetro do corpo lúteo no dia 7 (D0= dia da aplicação do GnRH) entre os grupos; (C) Comparação do volume do corpo lúteo no dia 7 entre os grupos; (D) Comparação do peso do corpo lúteo no dia 7 entre os grupos (média ± erro padrão da média; asterisco: $P < 0,05$).

Figura 6- Dinâmica temporal das alterações das concentrações plasmáticas de progesterona do dia 1 até o dia 7 dos animais dos grupos alta progesterona após a ovulação (AP) e baixa progesterona após a ovulação (BP)

Fonte: (LFEM, 2012)

Média $\pm$ erro padrão da média; dois asteriscos: $P < 0,05$, um asterisco: $P < 0,1$

Figura 7- Taxa de aumento da concentração de progesterona (P4) do dia 1 ao dia 7 e concentração de progesterona no dia 7 dos animais dos grupos alta progesterona após a ovulação (AP) e baixa progesterona após a ovulação (BP)

Fonte: (LFEM, 2012)

(A) Taxa de aumento de progesterona entre os dias 1 e 7, (B) Concentração de progesterona no dia 7 (média $\pm$ erro padrão da média; asterisco: $P < 0,05$).

4.2 EXPRESSÃO GÊNICA

Primeiramente foi realizado o processo de validação dos primers. Pares de primers que atingiram valores satisfatórios para os parâmetros adotados (Quadro 3) foram utilizados para reações de qPCR para comparação da abundância de transcritos entre os grupos.

Para confirmação da especificidade dos produtos amplificados nas reações de qPCR, tais produtos foram estudados em géis de agarose. Foram comparados os pesos moleculares dos amplicons obtidos com os estimados durante o desenho dos primers (Figura 8).

Figura 8- Eletroforese em géis de agarose para separação de produtos de PCR de genes que codificam as SLCs

Fonte: (FRANÇA, M. R, 2012)

Bandas específicas indicam peso dos produtos de PCR dos genes SLC2A1 (A), SLC2A3 (B), SLC2A4 (C), SLC2A5 (D), SLC5A1 (E), SLC37A4 (F), ATP1A2 (G) e ATP1B2 (H). Padrão de corrida 100 pares de bases (P). Controle Positivo (CP). Controle Negativo (CN). Pares de bases (pb).

Os resultados dos géis de agarose confirmam a amplificação das sequências referentes aos primers especificados, pois apresentaram banda única e com o peso molecular esperado.

Avaliou-se a abundância de transcritos de genes relacionados ao transporte facilitado de glicose, os membros da família SLC2A, que codificam as proteínas da família conhecida como GLUT. Os genes testados foram SLC2A1, SLC2A3, SLC2A4 e SLC2A5. A abundância de transcritos referentes a esses genes não foi alterada pela manipulação do crescimento do folículo pré-ovulatório e consequente diferença entre os grupos nas concentrações de progesterona no dia 7 após a indução da ovulação ($p > 0,05$; Figura 9).

O segundo grupo de genes avaliados engloba um membro da família de transportadores de glicose dependente de sódio, o SLC5A1, e outros genes relacionados ao transporte de glicose, ATP1B2 e SLC37A4. A exposição de vacas ovariectomizadas a progesterona foi capaz de promover um aumento na expressão gênica de SLC5A1 e ATP1B2 (SHIMIZU et al., 2010). A expressão desses dois genes provavelmente está relacionada, visto que a SLC5A1 depende de sódio para realizar o transporte de glicose pela membrana celular, enquanto a ATP1B2 fica responsável por manter a homeostase iônica durante o transporte de solutos, neste caso a glicose, através de bomba de sódio/potássio.

As sequências amplificadas pelo PCR determinadas pelo sequenciamento foram especificamente homólogas somente aos genes testados com pelo menos 90% de homologia. As sequências referentes aos genes SLC2A4 e ATP1A2 não foram específicas para nenhum gene, isso se deve provavelmente a uma falha na técnica devido ao tamanho reduzido do amplicon, porém como o tamanho da banda do produto de PCR foi confirmado por eletroforese, os resultados foram considerados fidedignos. Novo sequenciamento será realizado para reavaliação dos resultados utilizando-se os primers senso e anti-senso, ao invés de apenas os primers senso como na análise atual. Caso seja ainda impossível se determinar a sequência, novos primers serão desenhados visando-se obter amplicons de tamanho mais adequado ao sequenciamento (>150 pb).

Estudos anteriores de outros grupos foram capazes de provocar diferenças na expressão gênica de proteínas transportadoras de glicose no endométrio de ruminantes (FORDE et al., 2009; SHIMIZU et al., 2010), porém através do uso de protocolos farmacológicos que em relação ao protocolo usado no presente estudo são menos semelhantes a eventos fisiológicos de oscilações dos hormônios esteroides nos momentos que circundam a ovulação.

Quadro 3- Característica das reações de amplificação e da curva-padrão para validação de pares de primers

Gene	Símbolo do Gene	Identificação (Representative ID)	Inclinação curva-padrão (Slope)	r ²	Eficiência curva-padrão (%)	Eficiência Amplificação (%)
Solute Carrier Family 2 member 1	SLC2A1	NM_174602.2	-3,536	0,99	91,77	88
Solute Carrier Family 2 member 3	SLC2A3	NM_174603.3	-3,252	0,98	102,999	89
Solute Carrier Family 2 member 4	SLC2A4	NM_174604.1	-3,43	0,94	95,668	84
Solute Carrier Family 2 member 5	SLC2A5	NM_001101042.1	-3,42	0,99	96,072	89,2
Solute Carrier Family 5 member 1	SLC5A1	NM_174606.2	-3,386	0,99	85,866	91
Solute Carrier Family 34 member 4	SLC37A4	NM_001193045.2	-3,418	0,99	96,133	88
ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 2 polypeptide	ATP1A2	NM_001081524.1	-3,807	0,99	83,097	86
ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 2 polypeptide	ATP1B2	NM_174677.2	-3,218	0,99	104,55	87

Dados de microarranjo de endométrio de vacas holandesas ovariectomizadas indicam aumento na expressão gênica de SLC2A1, SLC5A1 E ATP1B2 em resposta a inserção de dispositivos intravaginais liberadores de progesterona. Porém, tais genes não tiveram sua expressão alterada por suplementação de progesterona seguida de estradiol ou somente suplementação de estradiol (SHIMIZU et al., 2010). Tais dados se adequam muito mais a um efeito farmacológico da progesterona do que a efeitos fisiológicos causados pelas oscilações nas concentrações dos hormônios esteroides que a fim de regular a expressão de genes no endométrio e garantir a receptividade do útero.

Em ovelhas prenhes, a suplementação de progesterona pós-estro aumentou a expressão de mRNA para SLC2A1 e SLC2A5 no endométrio no D9 e D12. No D9 a suplementação de progesterona também aumentou a concentração de glicose nos lavados uterinos do D9, mas não do D12 pós-estro. Para confirmar o papel da progesterona na expressão desses genes, um inibidor dos receptores de progesterona foi administrado juntamente com a progesterona. Tal tratamento aboliu o efeito da suplementação da progesterona na expressão dos genes SLC2A1 E SLC5A1 (SATTERFIELD et al., 2010).

Esses dados evidenciam a indução pela progesterona da expressão de genes relacionados ao transporte de glicose no endométrio de ruminantes, bem como o aumento na

concentração desse nutriente em resposta ao tratamento hormonal, porém, tais dados não se confirmaram em resposta ao protocolo utilizado no presente experimento.

Baixas concentrações de progesterona no diestro de novilhas foram atingidas através da administração de prostaglandina no D3. A expressão de SLC2A5 no endométrio de novilhas com menor concentração de progesterona foi menor em relação às daquelas com concentrações maiores (FORDE et al., 2011). Isso acontece, pois os transportadores de açúcares podem tanto transportar substrato do endométrio para o lúmen quanto do lúmen para o endométrio. É possível que a menor expressão de SLC2A5 no endométrio de animais com fenótipo indicativo de menor receptividade de útero esteja associada com um mecanismo para reduzir a captação da glicose presente no lúmen uterino pelo endométrio de forma a aumentar a disponibilidade para utilização pelo conceito.

Figura 9- Média ($\pm$ erro padrão da média) da abundância relativa de transcritos de genes relacionados ao transporte facilitado de glicose

Fonte: (FRANÇA, M. R, 2012)

Cada barra representa um grupo tratamento, grupo alta progesterona após a ovulação (AP) ou grupo baixa progesterona após a ovulação (BP). Os genes representados nos gráficos são: Família dos Carreadores de Solutos membro 1 (SLC2A1), membro 2 (SLC2A2), membro 3 (SLC2A3), membro 4 (SLC2A4) e membro 5 (SLC2A5). $p > 0,05$.

O modelo animal adotado no presente trabalho não foi capaz de provocar alterações na quantidade de transcritos de transportadores de glicose no endométrio de vacas Nelore através da comparação das médias da abundância de transcritos no endométrio entre os grupos AP e BP. Porém, mediante análises de regressão, alguns genes mostraram correlação positiva entre a abundância de transcritos no endométrio no D7 e as concentrações de progesterona no dia 7, dia 4 e ainda a diferença das concentrações de progesterona entre os dias 7 e 1 (Tabela 3; equações apêndice B).

O efeito quadrático da concentração de progesterona na expressão gênica de transportadores de glicose no endométrio pode estar associado com a constituição de um ambiente uterino adequado para o desenvolvimento do conceito. Existem coincidentes correlações positivas lineares e quadráticas entre as concentrações de progesterona no leite nos dias 5, 6 e 7 pós-inseminação e taxa de aumento entre os dias 4 e 7 com a taxa de sobrevivência embrionária (STRONGE et al., 2005).

Figura 10 - Média ($\pm$ erro padrão da média) da abundância relativa de transcritos de gene transportador de glicose dependente de sódio e outros genes relacionados ao transporte de glicose

Fonte: (FRANÇA, M. R, 2012)

Cada barra representa um grupo tratamento, grupo alta progesterona após a ovulação (AP) ou grupo baixa progesterona após a ovulação (BP). Os genes representados nos gráficos são: membro 5 da família de carreadores de soluto 5A (SLC5A1), membro 4 da família de carreadores de solutos 37A (SLC37A4) e as ATPases ATP1A2 e ATP1B2. $p > 0,05$.

Tabela 3 - Análise de regressão entre os dados de expressão gênica e variáveis relacionadas às concentrações de progesterona (P4)

Variável Dependente	Variável Independente	r ²	Valor de P	Efeito
SLC2A1	P4 no dia 7	0,185	0,076	Quadrático
	Diferença de P4 entre os dias 7 e 1	0,175	0,084	Quadrático
SLC2A4	P4 no dia 7	0,278	0,029	Quadrático
	Diferença de P4 entre os dias 7 e 1	0,302	0,028	Quadrático
SLC2A5	P4 no dia 7	0,173	0,025	Cúbico
	Diferença de P4 entre os dias 7 e 1	0,159	0,027	Cúbico
ATP1B2	P4 no dia 7	0,308	0,026	Quadrático
	Diferença de P4 entre os dias 7 e 1	0,319	0,023	Quadrático

Com o modelo experimental do presente estudo formaram-se grupos com distintos perfis hormonais no período peri-ovulatório mas não houve diferenças nas quantidades de transcritos dos transportadores de glicose no endométrio dos animais dos diferentes grupos. Uma possível regulação pós-transcricional de alguma dessas proteínas faz necessária a quantificação das proteínas transportadoras de glicose, o produto final e ativo da expressão gênica.

4.3 EXPRESSÃO PROTEICA

A abundância de transcritos medida por qPCR é um dado muito importante, porém é a eficiência da translação do mRNA em proteína que determina a funcionalidade do gene alvo estudado. Existe uma analogia entre a expressão gênica e expressão proteica, porém, a quantidade de proteínas é que vai influenciar na biologia animal (POLYCHRONAKOS, 2012).

As proteínas carreadoras de soluto SLC2A1 e SLC2A4, em outros tecidos, são de conhecida regulação pós-transcricional (MUÑOZ et al., 1996; RALPHE et al., 2005).

A quantificação proteica de do produto dos genes SLC2A1 e SLC2A4 foi feita a fim de verificar se o manejo reprodutivo do presente estudo foi capaz de formar grupos com diferentes concentrações proteicas desses transportadores no endométrio de forma a proporcionar melhores condições uterinas para o desenvolvimento do conceito durante a primeira semana após a ovulação.

Não houve diferença entre os grupos na expressão proteica de GLUT1 (Proteína codificada pelo gene SLC2A1; Figura 11). Os resultados da técnica de western blot referentes

a GLUT4, proteína codificada pelo gene SLC2A4, foram inconsistentes para detectar a proteína e por este motivo os dados obtidos não serão apresentados nesse trabalho.

Apesar de não haverem sido encontradas diferenças significativas na abundância dos transcritos e proteínas testados no endométrio dos animais com distintos perfis endócrinos no período peri-ovulatório, não se pode descartar uma possível diferença nas concentrações de glicose disponíveis no lúmen uterino em resposta aos diferentes tratamentos. Existe uma correlação quadrática entre a concentração de progesterona circulante e as concentrações de glicose no histotrofo de bovinos no D13 do ciclo. Essa relação foi encontrada em um estudo que não abordou técnicas para quantificação de transcritos ou proteínas (MATSUYAMA et al., 2012).

4.4 LOCALIZAÇÃO PROTEICA

As mesmas proteínas quantificadas por western blot foram localizadas em tecido uterino por imunohistoquímica.

GLUT1 foi identificada preferencialmente no epitélio luminal e glandular e membrana basal de glândulas do endométrio e em menor proporção na região do estroma (Figura 12) similarmente a um estudo anterior realizado em ovinos (GAO et al., 2009). Esta proteína parece estar presente de forma ubíqua em vários tecidos e parece exercer tanto a função de transportadora de glicose pela membrana celular quanto de regulação do transporte de glicose (GOULD; BELL, 1990).

Figura 11- Expressão proteica de SLC2A1 no endométrio de vacas no dia 7 após a indução da ovulação nos animais dos grupos Alta Progesterona (AP) e Baixa progesterona (BP)

Fonte: (FRANÇA, M. R, 2012)

A) Bandas referentes a actina detectadas por western blot. B) Bandas referentes a SLC2A1 detectadas por western blot. C) Média e erro padrão da média da abundância da proteína codificada pelo gene SLC2A1, ajustada para a abundância da β -actina e relativa à abundância da proteína no grupo BP. Kilodalton (Kd)

A proteína GLUT4, codificada pelo gene SLC2A4, por depender da insulina para ser translocada do citoplasma até a membrana, deveria estar presente preferencialmente em tecidos responsivos à insulina (KAESTNER et al., 1989). No presente estudo, GLUT4 foi identificada na membrana basal e apical de glândulas endometriais, células do estroma uterino e ainda na região basal e apical das células no lúmen uterino. O tecido uterino, principalmente a porção glandular, não é considerado um tecido clássico responsivo a insulina, porém,

insulina e fatores de crescimento semelhantes a insulina (IGFs) já foram identificados em glândulas uterinas de outras espécies. Existem vias de ativação alternativa da SLC2A4, menos efetivas que a insulina, mas ainda assim, capazes de promover o transporte de glicose (HOLMAN et al., 1990).

Figura 12- Imunohistoquímica para SLC2A1 em útero de vacas do grupo AP e BP

Fonte: (FRANÇA, M. R, 2012)

Considerou-se marcação positiva a cor laranja e/ou marrom em células do epitélio glandular (EG), epitélio luminal (EL), estroma (E) e vaso sanguíneo (V). Controle negativo (CN). Setas pretas apontam região de localização da proteína. CN indica controle negativo. Quadros A e B indicam animais do grupo alta progesterona após a ovulação (AP). Quadros C e D indicam animais do grupo baixa progesterona após a ovulação (BP). Insert: Controle Negativo (CN). Barra 20µm.

Figura 13 - Imunohistoquímica para SLC2A4 em útero de vacas do grupo AP e BP

Fonte: (FRANÇA, M. R, 2012)

Considerou-se marcação positiva a cor laranja e/ou marrom em células do epitélio glandular (EG), epitélio luminal (EL), estroma (E) e vaso sanguíneo (V). Controle negativo (CN). Setas pretas apontam região de localização da proteína. CN indica controle negativo. Quadros A, B e C indicam animais do grupo alta progesterona após a ovulação (AP). Quadros D e E indicam animais do grupo baixa progesterona após a ovulação (BP). Insert: Controle Negativo (CN). Barra 20µm.

5 CONCLUSÃO

O modelo experimental animal desenvolvido para o presente estudo foi capaz de gerar grupos de animais com distintos tamanhos de folículos pré-ovulatórios, diferentes tamanhos de corpos lúteos subsequentes e decorrentes concentrações de progesterona na primeira semana após a ovulação. Porém, os distintos perfis endócrinos no período peri-ovulatório não foram capazes de modular a expressão de transcritos ou proteínas relacionadas ao transporte de glicose no endométrio no dia 7 após a indução da ovulação.

6 IMPLICAÇÕES

Com o presente estudo não foi possível demonstrar diferenças na abundância de transportadores de glicose. Os dados obtidos não permitem considerar os transportadores de glicose potenciais marcadores de fertilidade em bovinos de corte. Porém não se pode desconsiderar a importância da glicose como substrato energético para desenvolvimento do conceito. Portanto é proposto um estudo da mensuração de glicose nos lavados uterinos obtidos dos mesmos animais avaliados quanto à expressão gênica e proteica. Propõe-se ainda uma investigação das vias de ativação dessas proteínas no endométrio em respostas a diferentes perfis hormonais no período peri-ovulatório a fim de elucidar o papel dessas proteínas dos diferentes padrões de receptividade em resposta a alterações hormonais durante o ciclo estral.

REFERÊNCIAS

- ANUALPEC 2012. **Anuário da Pecuária Brasileira**. São Paulo, Instituto FNP e Argos Comunicação, p 21-23, 2012.
- ASHWORTH, C. J.; SALES, D. I.; WILMUT, I. Evidence of an association between the survival of embryos and the periovulatory plasma progesterone concentration in the ewe. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, p. 23-32, 1989.
- BARNES, F. L.; EYESTONE, W. H. Early cleavage and the maternal zygotic transition in bovine embryos. **Theriogenology**, v. 33, p. 141-152, 1990.
- BAUERSACHS, S.; REHFELD, S.; ULBRICH, S.E.; MALLOK, S.; PRELLE, K.; WENIGERKIND, H.; EINSPANIER, R.; BLUM, H.; WOLF, E. Monitoring gene expression changes in bovine oviduct epithelial cells during the oestrous cycle. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 32, p. 449-466, 2004.
- BAUERSACHS, S.; ULBRICH, S. E.; GROSS, K.; SCHMIDT, S. E.; MEYER, H. H.; EINSPANIER, R.; WENIGERKIND, H.; VERMEHREN, M.; BLUM, H.; SINOWATZ, F.; WOLF, E. Gene expression profiling of bovine endometrium during the oestrous cycle: detection of molecular pathways involved in functional changes. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 34, p. 889-908, 2005.
- BAZER, F. W. Uterine protein secretions: Relationship to development of the conceptus. **Journal of Animal Science**, v. 41, p. 1376-1382, 1975.
- BAZER, F.W.; ROBERTS, R.M.; THATCHER, W.W. Actions of hormones on the uterus and effect on conceptus development. **Journal of Animal Science**, v. 49 Suppl 2, p. 35-45, 1979.
- BELTMAN, M. E.; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P; FORDE, N; CROWE, M. A. Evaluation of models to induce low progesterone during the early luteal phase in cattle. **Theriogenology**, v. 72, p.986-992, 2009.
- BETTEGOWDA, A.; PATEL, O. V. ; IRELAND, J. J.; SMITH, G. W. Quantitative analysis of messenger RNA abundance for ribosomal protein L-15, cyclophilin-A, phosphoglycerokinase, beta-glucuronidase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, beta-actin, and histone H2A during bovine oocyte maturation and early embryogenesis in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p. 267-278, 2006.
- BETTERIDGE K. J.; FLÉCHON J. E. The anatomy and physiology of preattachment bovine embryos. **Theriogenology**, v. 29, p. 155-187, 1988.
- BINELLI, M.; HAMPTON, J.; BUHI, W. C.; THATCHER, W. W. Persistent dominant follicle alters pattern of oviductal secretory proteins from cows at estrus. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 127-134, 1999.

CARTER, F.; FORDE, N.; DUFFY, P. ; WADE, M.; FAIR, T.; CROWE, M. A.; EVANS, A. C.; KENNY, D. A.; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P. Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. **Reproduction Fertility and Development**, v. 20, p. 368-375, 2008.

CHAVATTE-PALMER, P.; GUILLOMOT, M. Comparative implantation and placentation. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 64, n. 3, p.166-74, 2007.

CLAUSEN, T.; EVERTS, M. E. Regulation of the Na,K-pump in skeletal muscle. **Kidney International** v. 35, p. 1-13, 1989.

CLEMENTE, M.; FUENTE, J. D. LA; FAIR, T. NAIB, A. A.; ROCHE, J. F.; RIZOS, D. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? **Reproduction**, v. 4, p.507-517, 2009.

DEMETRIO, D. G. B.; SANTOS, R. M.; DEMETRIO, C. G. B.; VASCONCELOS, J. L. M. Factors affecting conception rates following artificial insemination or embryo transfer in lactating holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 11, p.5073-5082, 2007.

DUNNE, L. D.; DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M. Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. **Animal Reproduction Science**, v. 58, p. 39-44, 2000.

FLEMING, T. P. ; KWONG, W. Y.; PORTER, R.; URSELL, E.; FESENKO, I.; WILKINS, A.; MILLER, D. J.; WATKINS, A. J.; ECKERT, J. J.; The embryo and its future. **Biology of reproduction**, v. 71, n. 4, p.1046-54, 2004.

FORDE, N.; CARTER, F.; FAIR, T.; CROWE, M. A.; EVANS, A. C.; SPENCER, T. E.; BAZER, F. W.; MCBRIDE, R.; BOLAND, M. P. ; O'GAORA, P. ; LONERGAN, P. ; ROCHE, J. F. Progesterone-regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced conceptus development in cattle. *Biology of Reproduction*. v. 84, p.784-794, 2009.

FORDE, N.; SPENCER, T. E.; BAZER, F. W.; SONG, G.; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P. Effect of pregnancy and progesterone concentration on expression of genes encoding for transporters or secreted proteins in the bovine endometrium. *Physiological Genomics*, v. 41, p. 53-62, 2010.

FORDE, N.; BELTMAN, M. E.; DUFFY, G. B.; DUFFY, P. ; MEHTA, J. P. ; O'GAORA, P. ; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P. ; CROWE, M. A. Changes in the endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: effect of low circulating progesterone and consequences for conceptus elongation. **Biology of Reproduction**, v. 84, p.266-278, 2011.

FORDE, N.; LONERGAN, P. Transcriptomic analysis of the bovine endometrium: What is required to establish uterine receptivity to implantation in cattle? **The Journal of reproduction and development**, v. 58, n. 2, p.189-95, 2012.

FORMIGONI, I., B. 2002. Estimacão de valores econmicos para características componentes de índices de seleo em bovinos de corte., Dissertao (Mestrado em Zootecnia) Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. Universidade de São Paulo. Pirassununga., p.179.

FROISSART, R.; PIRAUD, M.; BOUDJEMLINE, A. M.; VIANEY-SABAN, C.; PETIT, F.; HUBERT-BURON, A.; EBERSCHWEILER, P. T.; GAJDOS, V. ; LABRUNE, P. Glucose-6-phosphatase deficiency. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 6, p.27, 2011.

FROLOVA, A. I.; MOLEY, K. H. Glucose transporters in the uterus: an analysis of tissue distribution and proposed physiological roles. **Reproduction**, v. 142, p.211-220, 2011.

GARBARINO, E. J.; HERNANDEZ, J. A.; SHEARER, J. K.; RISCO, C. A.; THATCHER, W. W. Effect of lameness on ovarian activity in postpartum holstein cows. *Journal of Dairy Sciences* v. 87, p. 4123-4131, 2004.

GAO, H.; WU, G.; SPENCER, T. E; JOHNSON, G. A.; BAZER, F. W. Select nutrients in the ovine uterine lumen. II. glucose transporters in the uterus and peri-implantation conceptuses. **Biology of Reproduction**, v. 80, p. 94-104, 2009.

GARDNER, D. K.; LANE, M.; CALDERON, I.; LEETON, J. Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. **Fertility and Sterility**, v. 65, p. 349-353, 1996.

GARRETT, J. E.; GEISERT, R. D.; ZAVY, M. T.; MORGAN, G. L. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 84, p. 437-446, 1988.

GOULD, G. W.; BELL, G. I. Facilitative glucose transporters: an expanding family. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 15, p. 18-23, 1990.

GRAY, C. A.; TAYLOR, K. M.; BAZER, F. W.; SPENCER, T. E. Mechanisms regulating norgestomet inhibition of endometrial gland morphogenesis in the neonatal ovine uterus. **Molecular Reproduction and Development**, v. 57, p. 67-78, 2000.

GRAY, C. A.; BURGHARDT, R. C.; JOHNSON, G. A.; BAZER, F. W.; SPENCER, T. E. Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. **Reproduction**, v. 124, p. 289-300, 2002.

GREEN, M. P. ; SPATE, L. D.; BIXBY, J. A.; EALY, A. D.; ROBERTS, R. M. A comparison of the anti-luteolytic activities of recombinant ovine interferon-alpha and -tau in sheep. **Biology of Reproduction**, v. 73, p. 1087-1093, 2005.

GROEBNER, A. E.; RUBIO-ALIAGA, I.; SCHULKE, K.; REICHENBACH, H. D.; DANIEL, H.; WOLF, E.; MEYER, H. H.; ULBRICH, S. E. Increase of essential amino acids in the bovine uterine lumen during preimplantation development. **Reproduction**. v. 141, p. 685-695, 2011.

HOLMAN, G. D.; KOZKA, I. J.; CLARK, A. E.; FLOWER, C. J.; SALTIS, J.; HABBERFIELD, A. D.; SIMPSON, I. A.; CUSHMAN, S. W. Cell surface labeling of glucose transporter isoform GLUT4 by bis-mannose photolabel. Correlation with stimulation of glucose transport in rat adipose cells by insulin and phorbol ester. **Journal of Biology Chemistry**, v. 265, p. 18172-18179, 1990.

HUGENTOBLE, S. A.; SREENAN, J. M.; HUMPHERSON, P. G.; LEESE, H. J.; DISKIN, M. G.; MORRIS, D. G. Effects of changes in the concentration of systemic progesterone on ions, amino acids and energy substrates in cattle oviduct and uterine fluid and blood.

Reproduction Fertility and Development, v. 22, p. 684-694, 2010.

KAESTNER, K. H.; CHRISTY, R. J.; MCLENITHAN, J. C.; BRAITERMAN, L. T.; CORNELIUS, P. ; PEKALA, P. H.; LANE, M. D. Sequence, tissue distribution, and differential expression of mRNA for a putative insulin-responsive glucose transporter in mouse 3T3-L1 adipocytes. **Proceedings of the Natinal Academy of Sciences**, v. 86, p. 3150-3154, 1989.

KANE, M. T.; MORGAN, P. M.; COONAN, C. Peptide growth factors and preimplantation development. **Human Reproduction Update**, v. 3, p. 137-157, 1997.

KIM, J. H.; FUNAHASHI, H.; NIWA, K.; OKUDA, K. Glucose requirement at different developmental stages of in vitro fertilized bovine embryos cultured in semi-defined medium. **Theriogenology**, v. 39, p. 875-886, 1993.

LEESE, H. J.; BARTON, A. M.; 1984. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 72, p. 9-13, 1984.

MAMO, S.; MEHTA, J. P. ; FORDE, N.; MCGETTIGAN, P. ; LONERGAN, P. Conceptus-Endometrium Crosstalk During Maternal Recognition of Pregnancy in Cattle. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 1, p.6-6, 2012.

MANN, G. E. 2009. Corpus luteum size and plasma progesterone concentration in cows. **Animinal Reproduction Science**, v. 115, p. 296-299, 2009.

MANN, G. E.; FRAY, M. D.; LAMMING, G. E. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon-tau production in the cow. **The Veterinary Journal**, v. 171, p. 500-503, 2006.

MATSUYAMA, S.; SAKAGUCHI, Y.; KIMURA, K. Relationship between Plasma Progesterone Concentration and Number of Conceptuses and Their Growth in Superovulated Cattle. **Journal of Reproduction and Development**, v. 58, p.609-614, 2012.

MEHLMANN, L. M. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. **Reproduction**, v. 130, p. 791-799, 2006.

MILLER, B. G.; MOORE, N. W. Effects of progesterone and oestradiol on RNA and protein metabolism in the genital tract and on survival of embryos in the ovariectomized ewe. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 29, p. 565-573, 1976.

MOLEY, K. H.; CHI, M. M.; KNUDSON, C. M.; KORSMEYER, S .J.; MUECKLER, M. M. Hyperglycemia induces apoptosis in pre-implantation embryos through cell death effector pathways. **Nature Medicine**, v. 4, p. 1421-1424, 1998.

MUÑOZ, P. ; CHILLARÓN, J.; CAMPS, M.; CASTELLÓ, A.; FURRIOLS, M.; TESTAR, X.; PALACÍN, M.; ZORZANO, A. Evidence for posttranscriptional regulation of GLUT4

expression in muscle and adipose tissue from streptozotocin-induced diabetic and benfluorex-treated rats. **Biochemical Pharmacology**, v. 52, p. 1665-1673, 1996.

OLIVEIRA, D, J, G, C, 2007. **Inseminação Artificial em Tempo Fixo: Uma biotecnologia a serviço do empresário rural**, Dispon[ível em http://www.infobibos.com/Artigos/2007_4/inseminacao/index.htm, acesso em 30/03/2012.

PEIPPO, J.; MACHATY, Z.; PETER, A. Terminologies for the pre-attachment bovine embryo. **Theriogenology**, v. 76, n. 8, p.1373-9, 2011.

PFEIFER, L. F. M.; MAPLETOFT, R. J.; KASTELIC, J. P. ; SMALL, J. A. Effects of low versus physiologic plasma progesterone concentrations on ovarian follicular development and fertility in beef cattle. **Theriogenology**, v. 72, p.1237-1250, 2009.

POLYCHRONAKOS, C. Gene expression as a quantitative trait: what about translation? **Journal of Medical Genetics**, v. 49, p.554-557, 2012.

RALPHE, J. C.; NAU, P. N.; MASCIO, C. E.; SEGAR, J. L.; SCHOLZ, T. D. Regulation of myocardial glucose transporters GLUT1 and GLUT4 in chronically anemic fetal lambs. **Pediatric Research**, v. 58, p.713-718, 2005.

RIEGER, D.; LOSKUTOFF, N. M.; BETTERIDGE, K. J. Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and co-cultured in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 95, n. 2, p.585-95, 1992.

RIEGER, D.; GRISART, B.; SEMPLE, E.; VAN LANGENDONCKT, A.; BETTERIDGE, K. J.; DESSY, F. Comparison of the effects of oviductal cell co-culture and oviductal cell-conditioned medium on the development and metabolic activity of cattle embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 105, p.91-98, 1995.

RILEY, J. K.; MOLEY, K. H. Glucose utilization and the PI3-K pathway: mechanisms for cell survival in preimplantation embryos. **Reproduction** v. 131, p. 823-835, 2005.

ROBERTS, R. M.; BAZER, F. W. The functions of uterine secretions. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 82, p.875-892, 1988.

SATTERFIELD, M. C.; SONG, G.; KOCHAN, K. J.; RIGGS, P. K.; SIMMONS, R. M.; ELSIK, C. G.; ADELSON, D. L.; BAZER, F. W.; ZHOU, H.; SPENCER, T. E. Discovery of candidate genes and pathways in the endometrium regulating ovine blastocyst growth and conceptus elongation. **Physiological Genomics**, v. 39, p. 85-99, 2009.

SATTERFIELD, M. C.; GAO, H.; LI, X.; WU, G.; JOHNSON, G. A.; SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Select nutrients and their associated transporters are increased in the ovine uterus following early progesterone administration. **Biology of Reproduction**, v. 82, p.224-231, 2010.

SHIMIZU, T.; KREBS, S.; BAUERSACHS, S.; BLUM, H.; WOLF, E.; MIYAMOTO, A. Actions and interactions of progesterone and estrogen on transcriptome profiles of the bovine endometrium. **Physiological Genomics**, v. 42A, p.290-300, 2010.

SMITH, R. J.; DEAN, W.; KONFORTOVA, G.; KELSEY, G. Identification of novel imprinted genes in a genome-wide screen for maternal methylation. **Genome Research**, v. 13, p.558-569, 2003.

SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Uterine and placental factors regulating conceptus growth in domestic animals. **Journal of Animal Science**, v. 82 E-Suppl, E4-13, 2004.

SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BAZER, F. W.; BURGHARDT, R. C.; PALMARINI, M. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. **Reproduction Fertility and Development**, v. 19, p.65-78, 2007.

SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BURGHARDT, R. C.; BAZER, F. W. Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. *Biology of Reproduction*, v. 1, p.2-10, 2004.

STRONGE, A. J.; SREENAN, J. M.; DISKIN, M. G.; MEE, J. F.; KENNY, D. A.; MORRIS, D. G. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. **Theriogenology**, v. 64, p.1212-1224, 2005.

THATCHER, W. W.; BARTOL, F. F.; KNICKERBOCKER, J. J.; CURL, J. S.; WOLFENSON, D.; BAZER, F. W.; ROBERTS, R. M. Maternal recognition of pregnancy in cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 67, p. 2797-2811, 1984.

THORENS, B.; MUECKLER, M. Glucose transporters in the 21st Century. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 298, p.E141-145, 2010.

ULDRY, M.; THORENS, B. The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. **Pflugers Archiv**, v. 447, p.480-489, 2004.

VASCONCELOS, J. L.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H. N.; GUENTHER, J. G.; WILTBANK, M. C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, 56, 307-314, 2001.

WANG, H. Y.; O'DOHERTY, G. A. Modulators of Na/K-ATPase: a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 22, p.587-605, 2012.

WOOD, I. S.; TRAYHURN, P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. **British Journal of Nutrition**, v. 89, p. 3-9, 2003.

WRIGHT, E. M.; TURK, E. The sodium/glucose cotransport family SLC5. **Pflugers Archiv**, v. 447, p.510-518, 2004.

WU, G.; BAZER, F. W.; DATTA, S.; JOHNSON, G. A.; LI, P. ; SATTERFIELD, M. C.; SPENCER, T. E. Proline metabolism in the conceptus: implications for fetal growth and development. **Amino Acids**, v. 35, p.691-702, 2008.

ZAVY M. T. Embryonic mortality in cattle. In: Geisert RD, Zavy MT (eds), *Embryonic Mortality in Domestic Species*. **CRC Press**, p.99–140, 1994.

APÊNDICE A - GRÁFICOS REFERENTES A VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL

Validação da técnica de PCR em tempo real para mensuração da abundância relativa de transcritos do gene que codifica a SLC2A1 em endométrio de vacas Nelore no dia 7 após a indução da ovulação. A) Curvas de amplificação das amostras da curva padrão; B) Curvas de dissociação das amostras da curva padrão; C) Plotagem da curva padrão; D) Curvas de amplificação das amostras dos animais analisados.

Validação da técnica de PCR em tempo real para mensuração da abundância relativa de transcritos do gene que codifica a SLC2A3 em endométrio de vacas Nelore no dia 7 após a indução da ovulação. A) Curvas de amplificação das amostras da curva padrão; B) Curvas de dissociação das amostras da curva padrão; C) Plotagem da curva padrão; D) Curvas de amplificação das amostras dos animais analisados.

Validação da técnica de PCR em tempo real para mensuração da abundância relativa de transcritos do gene que codifica a SLC2A4 em endométrio de vacas Nelore no dia 7 após a indução da ovulação. A) Curvas de amplificação das amostras da curva padrão; B) Curvas de dissociação das amostras da comparação; C) Plotagem da curva padrão; D) Curvas de amplificação das amostras dos animais analisados.

Validação da técnica de PCR em tempo real para mensuração da abundância relativa de transcritos do gene que codifica a SLC2A5 em endométrio de vacas Nelore no dia 7 após a indução da ovulação. A) Plotagem da curva padrão; B) Curvas de dissociação das amostras da comparação; C) Curvas de amplificação das amostras dos animais analisados.

Validação da técnica de PCR em tempo real para mensuração da abundância relativa de transcritos do gene que codifica a SLC5A1 em endométrio de vacas Nelore no dia 7 após a indução da ovulação. A) Curvas de amplificação das amostras da curva padrão; B) Curvas de dissociação das amostras da curva padrão; C) Plotagem da curva padrão; D) Curvas de amplificação das amostras dos animais analisados.

Validação da técnica de PCR em tempo real para mensuração da abundância relativa de transcritos do gene que codifica a SLC37A4 em endométrio de vacas Nelore no dia 7 após a indução da ovulação A) Curvas de amplificação das amostras da curva padrão; B) Curvas de dissociação das amostras da curva padrão; C) Plotagem da curva padrão; D) Curvas de amplificação das amostras dos animais analisados.

Validação da técnica de PCR em tempo real para mensuração da abundância relativa de transcritos do gene que codifica a ATP1A2 em endométrio de vacas Nelore no dia 7 após a indução da ovulação. A) Curvas de amplificação das amostras da curva padrão; B) Curvas de dissociação das amostras da curva padrão; C) Plotagem da curva padrão; D) Curvas de amplificação das amostras dos animais analisados.

Validação da técnica de PCR em tempo real para mensuração da abundância relativa de transcritos do gene que codifica a ATP1B2 em endométrio de vacas Nelore no dia 7 após a indução da ovulação. A) Curvas de amplificação das amostras da curva padrão; B) Curvas de dissociação das amostras da curva padrão; C) Plotagem da curva padrão; D) Curvas de amplificação das amostras dos animais analisados.

APÊNDICE B- FÓRMULAS DAS REGRESSÕES DAS SLCS EM RELAÇÃO A CONCENTRAÇÕES DE PROGESTERONA

$$\text{Expressão de SLC2A1} = 1,664 + 0,3701 (\text{P4 no D7}) + 0,04630 (\text{P4 no D7})^2$$

$$\text{Expressão de SLC2A1} = 1,585 + 0,3417 (\text{P4 no D7} - \text{P4 no D1}) + 0,04432 (\text{P4 no D7})^2$$

$$\text{Expressão de SLC2A4} = 1,821 + 0,5220 (\text{P4 no D7}) + 0,08104 (\text{P4 no D7})^2$$

$$\text{Expressão de SLC2A4} = 1,754 + 0,5045 (\text{P4 no D7} - \text{P4 no D1}) + 0,08212 (\text{P4 no D7})^2$$

$$\text{Expressão de SLC2A5} = 4,586 - 3,263 (\text{P4 no D7}) + 0,08500 (\text{P4 no D7})^2 - 0,06658 (\text{P4 no D7})^3$$

$$\text{Expressão de SLC2A5} = 4,167 - 0,3417 (\text{P4 no D7} - \text{P4 no D1}) + 0,8404 (\text{P4 no D7})^2 - 0,06822 (\text{P4 no D7})^3$$

$$\text{Expressão de ATP1B2} = 1,836 + 0,5425 (\text{P4 no D7}) + 0,08346 (\text{P4 no D7})^2$$

$$\text{Expressão de ATP1B2} = 1,740 + 0,5086 (\text{P4 no D7} - \text{P4 no D1}) + 0,08247 (\text{P4 no D7})^2$$