MILENA LOPES OLIVEIRA

Ação do 17β -estradiol na síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial em vacas

Pirassununga - SP

2017

MILENA LOPES OLIVEIRA

Ação do 17 β -estradiol na síntese de PGF2 α endometrial em vacas

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

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Mario Binelli

De acordo: _____

Orientador

Pirassununga-SP
2017

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. 3505
FMVZ

Oliveira, Milena Lopes
Ação do 17 β -estradiol na síntese de PGF2 α endometrial em vacas / Milena
Lopes Oliveira. -- 2017.
106 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, Pirassununga,
2017.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Mario Binelli.

Coorientador: Profa. Dra. Cláudia Maria Membrive Bertan

1. Luteólise. 2. Prostaglandina. 3. Endométrio. 4. Bovinos. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ESTUDO DOS MECANISMOS DE AÇÃO PELOS QUAIS O ESTRADIOL ESTIMULA A SÍNTESE DE PGF2 ALFA ENDOMETRIAL EM FÊMEAS BOVINAS", protocolada sob o CEUA nº 4638030915, sob a responsabilidade de **Mario Binelli e equipe; Milena Lopes Oliveira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 05/01/2017.

We certify that the proposal "STUDY MECHANISMS OF ACTION BY WHICH THE ESTRADIOL STIMULATES PGF2 ALPHA SYNTHESIS IN FEMALE BOVINE ENDOMETRIUM", utilizing 50 Bovines (50 females), protocol number CEUA 4638030915, under the responsibility of **Mario Binelli and team; Milena Lopes Oliveira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 01/05/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **01/2015** a **01/2017**

Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Prefeitura do Campus da USP de Pirassununga**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **2 a 4 anos**

N: **50**

Linhagem: **Nelore**

Peso: **350 a 550 kg**

Resumo: Em fêmeas bovinas a liberação de PGF2a pode ser induzida in vivo pelo estradiol (E2), entretanto, o papel do E2 na síntese de PGF2a ainda não foi esclarecido. Considerando que as concentrações plasmáticas de PGF2a aumentam 3,5 horas após a aplicação do E2 in vivo, acredita-se que o E2 ative não somente enzimas, mas também estimule a síntese de proteínas essenciais para a produção de PGF2a. Sabe-se que explantes endometriais bovinos provenientes de animais injetados com E2, e cultivo de células endometriais bovinas (BEND) expostas ao E2, ao serem tratados com ionóforo de cálcio (CI) tiveram um aumento acentuado na liberação de PGF2a quando comparados àqueles que não receberam E2 e aos tratados exclusivamente com E2 ou CI. A hipótese é que o E2 estimule a expressão e/ou a atividade das enzimas PKC e PLA2, ambas dependentes de cálcio para a ativação, envolvidas na síntese de PGF2a endometrial. O objetivo geral deste estudo é verificar a ação do E2 na atividade das proteínas PKC e PLA2 envolvidas na cascata geradora de PGF2? (Experimento 1); identificar grupos de genes envolvidos na síntese de PGF2a endometrial em fêmeas bovinas, cuja expressão seja modulada pelo E2 pela técnica de RT-qPCR (Experimento 2) e posteriormente comprovar as proteínas identificadas como diferenciadas no experimento 2 pela técnica de Western Blotting (Experimento 3). No Experimento 1, células endometriais bovinas (BEND) serão cultivadas e submetidas a presença ou ausência de um inibidor específico de PKC (10uM Bisindolimaldeído I) ou inibidor de PLA2 (20uM, AACOCF3), durante 60 minutos. Amostras de meio de cultivo, no volume de 100uL, serão coletadas 60 minutos após a adição ou não dos diferentes inibidores (Tempo 0). Imediatamente após, será adicionado 100uL de meio sem soro contendo ou não E2 + CI, que será acrescentado aos 900uL restantes nos poços, em quantidade que determine uma concentração final de 10-6M de cálcio ionóforo e 10-13M de estradiol. Amostras de meio, no volume de 100uL, serão coletadas 12 horas após o tratamento ou não com CI (Tempo 12). Os tratamentos serão realizados em triplicata em um total de cinco repetições. As concentrações de PGF2u no meio de cultivo serão mensuradas por radioimunoensaio. A média e erro padrão da média (EPM) para a DIF 12, representada pela diferença de concentração entre o Tempo 12 e o Tempo 0, será comparada entre os diferentes grupos de tratamento. No Experimento 2, fêmeas Nelore cíclicas (n=60), não lactantes, serão pareadas no dia 17 de um ciclo estral sincronizado, injetadas com 0mg (n=30) ou 3mg de 17B-estradiol (n=30) e em seguida serão subdivididas dentro de cada grupo para terem uma biópsia uterina do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo realizada com 2 horas (n=6 para 0mg e n=6 para 3mg de 17B-estradiol) ou 3 horas (n=6 para 0mg e n=6 para 3mg de 17B-estradiol) ou 4 horas (n=6 para 0mg e n=6 para 3mg de 17B-estradiol) ou 5 horas (n=6 para 0mg e n=6 para 3mg de 17B-estradiol) ou 6 horas (n=6 para 0mg e n=6 para 3mg de 17B-estradiol). As amostras teciduais serão avaliadas quanto à expressão de RNAm, pela técnica de RT-qPCR, para algumas proteínas específicas envolvidas na síntese de PGF2a endometrial, dentre estas aldo-keto redutase 1B1, Aldo-keto redutase 1C3, receptor de ocitocina, fosfolipase A24A, PKCa, PKCB, PKCy, ciclooxigenase 1 e ciclooxigenase 2. Neste estudo, espera-se identificar grupos de genes envolvidos na síntese de PGF2a endometrial em fêmeas bovinas, cuja expressão seja modulada pelo E2. No Experimento 3, as proteínas identificadas com diferenciadas no experimento 2 serão comparadas pela técnica de Western Blotting. O esclarecimento deste mecanismo contribuirá para a elaboração de

estratégias anti-luteolíticas que possam diminuir a mortalidade embrionária em fêmeas bovinas entre o 15 e 19º dias de gestação, atualmente responsáveis por expressivas perdas econômicas.

Local do experimento: O experimento será realizado na Universidade de São Paulo, na Faculdade de Medicina Veterinária, no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA), Campus de Pirassununga/SP. O processamento dos materiais biológicos e a avaliação dos tecidos endometriais por RT-qPCR serão realizados no CBRA, especificamente no Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga/SP.

São Paulo, 17 de fevereiro de 2017

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: OLIVEIRA, Milena

Título: **Ação do 17β -estradiol na síntese de PGF 2α endometrial em vacas**

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADEÇO

Primeiramente a Deus, por sempre estar guiando cada passo que dou em minha vida, por sua proteção durante todos esses anos, me dando saúde e força para continuar a vencer os desafios diários. Deus meus sinceros agradecimentos, por colocar muitos anjos em minha vida e me presentear com uma família linda e grandes amigos. Obrigada por essa graça que é trabalhar em um lugar bonito e tranquilo, rodeada de pessoas educadas e gentis.

À minha mãe Maria Helena, essa grande mulher que tenho orgulho imenso em ser filha, sempre foi exemplo de luta, trabalho e dedicação. Agradeço, ao meu pai Edmilson por seu incentivo, sua paciência e sua alegria de viver. Sou grata aos meus pais, por todos os conselhos e esforços realizados para que eu conseguisse alcançar meus objetivos. Grata ao meu irmão Everton, por ser amigo, companheiro e sempre carinhoso comigo. Agradeço a minha linda família, pelo amor, carinho e proteção, que apesar da distância, nunca faltou. Obrigada por entenderem minha ausência, pela alegria e pelo amor que sou recebida em cada retorno. Tudo que eu faço é sempre pensando em vocês. Vocês são a força e a paz para eu seguir.

Ao Professor Dr. Mario Binelli, por oferecer além do necessário ao desenvolvimento deste trabalho, sempre pensando no crescimento dos seus pós-graduandos. Pela disponibilidade, paciência, conselhos e orientações. Por ser um grande exemplo de pesquisador e professor, dedicado, responsável, ético e profissional. Obrigada por me fazer despertar o interesse pela pesquisa. Obrigada pelas oportunidades e confiança.

À professora Dr^a Claudia Maria Membrive Bertan, por toda atenção e por ter me inspirado a gostar das atividades desenvolvidas no LFEM. Dona da minha admiração, por ser esta mulher forte, determinada, perfeccionista e muito dedicada. Agradeço por sua confiança em me conferir a responsabilidade de conduzir este estudo, e por este grande presente de trabalhar juntas. Obrigada pela amizade, conselhos e oportunidades.

Ao Dr. Guilherme Pugliesi, por sua disponibilidade em ajudar, por sua atenção e dedicação. Sou grata por tudo que pude aprender em atividades de campo e de laboratório. Obrigada por seus conselhos, incentivo e principalmente por sua amizade.

Ao grupo LFEM, por toda ajuda durante o experimento, pela troca de conhecimentos e ajuda constante. Especialmente, à Saara Scolari, Ângela Gonella, Bárbara Piffero, Roney Ramos, Guilherme Pugliesi e Thiago Martins que deram suas grandes contribuições neste trabalho.

Aos professores colaboradores, Dr. João Negrão, Dr. Luciano Andrade, Dr. Flávio Meireles, Dr. Felipe Perecin, Dr. Juliano Silveira, Dr. Ricardo Strefezzi, Dr. André Furugen e Dr^a Eneiva Carla Celeghini, Dr. Fernando Mesquita e Dra. Veerle Van Hoeck pela atenção e disponibilidade de seus laboratórios.

Aos professores Milo Wiltbank, Roberto Sartori e Dr^a Aurea Canavessi, pelo transporte de amostras e análises de PGFM.

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal, Ed Hoffmann, Rubens Arruda, Anneliese Traldi e Eneiva Carla Celeghini pela disponibilidade de laboratórios, atenção e carinho.

Aos funcionários, José Maria, Márcio, João, Rildo, Alexandra e vários outros que deram sua grande contribuição no manejo dos animais e no zelo por nosso local de trabalho.

Aos serviços de Harumi Doi Shiraishi e Clayton Costa, muito solícitos e eficientes em suas funções.

Aos pós-graduandos e estagiários do VRA, pelas amizades que fiz, pelo carinho e especialmente pelo que pude aprender com cada um.

À família "Casa do VRA", minha primeira família em Pirassununga. Obrigada pelo companheirismo e amizade.

Às minhas amigas e irmãs de coração, Juliane Diniz, Julianne Naves, Larissa Parazzi e Qui Geraldo. Agradeço sempre a Deus por me dar de presente quatro pessoas tão especiais, amigas-irmãs, companheiras de todas as horas, perto ou longe. Obrigada por todo esse carinho imenso e por me incentivar apoiar em cada passo importante.

À família "kit 521", onde eu aprendi que morar só pode significar morar junto. O lugar em que comemos, rimos e choramos juntos. Obrigada pelo carinho de todos os dias.

À família Lopes e família Oliveira, por toda confiança, amor, incentivo e torcida para meu crescimento profissional.

Às minhas primas e amigas, Dyanara, Caroline, Eliane, Sarah e Mara, pelas conversas, carinho e amizade de longa data.

A todos os meus amigos e familiares, que perto ou longe sempre se fizeram presentes em minha vida, dando apoio e incentivo para a conquista de meus sonhos.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, juntamente ao Departamento de Reprodução Animal, por disponibilizar espaço físico dos laboratórios e animais.

À CAPES pela bolsa concedida.

*Dedico a minha mãe Maria
Helena, meu pai Edmilson e ao
meu irmão Éverton, meus eternos
amores, minha alegria e paz.*

Sou feita de retalhos. Pedacinhos...

Sou feita de retalhos.

*Pedacinhos coloridos de cada vida que passa pela minha e que
vou costurando na alma.*

*Nem sempre bonitos, nem sempre felizes, mas me acrescentam e me
fazem ser quem eu sou.*

Em cada encontro, em cada contato, vou ficando maior...

*Em cada retalho, uma vida, uma lição, um carinho, uma
saúde...*

Que me tornam mais pessoa, mais humana, mais completa.

*E penso que é assim mesmo que a vida se faz: de pedaços de outras
gentes que vão se tornando parte da gente também.*

E a melhor parte é que nunca estaremos prontos, finalizados...

Haverá sempre um retalho novo para adicionar à alma.

*Portanto, obrigada a cada um de vocês, que fazem parte da
minha vida e que me permitem engrandecer minha história com
os retalhos deixados em mim. Que eu também possa deixar
pedacinhos de mim pelos caminhos e que eles possam ser parte das
suas histórias.*

*E que assim, de retalho em retalho, possamos nos tornar, um dia,
um imenso bordado de "nós".*

(Cora Coralina)

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

OLIVEIRA, M. L.: **Ação do 17 β -estradiol na síntese de PGF2 α endometrial em vacas** [17 β -estradiol action on the synthesis of endometrial PGF2 α in cows] 2017. 106 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

O 17 β -E2 estimula a expressão de receptores endometriais, ER e OXTR. A ativação de OXTR induz a ativação da cadeia de síntese de PGF2 α . A hipótese do presente estudo é que as enzimas de síntese de PGF2 α são reguladas pelo 17 β -E2. Objetivou-se determinar os efeitos do 17 β -E2 na expressão gênica e proteica, assim como na localização de proteínas envolvidas na síntese de PGF2 α . Vacas Nelore múltiparas, solteiras e cíclicas foram sincronizadas por aplicação de BE e inserção de dispositivo de P4. Após 8 dias realizou-se a remoção do dispositivo de P4 e aplicação de PGF2 α , seguido por 4 dias de observação de estro (D0=dia do estro). Entre D14 e D27 foram realizadas avaliações diárias da área do CL (cm²), fluxo sanguíneo (%) e concentração plasmática de progesterona (P4). No D15 as vacas foram divididas em três grupos: Controle (C; não tratado; N= 10), Placebo (P; 6mL de etanol 50%; IV; N= 21) e Estradiol (E; 3mg 17 β -E2; 6mL de etanol 50%; IV; N=21). Subsequente aos tratamentos, biópsias uterinas foram coletadas nos tempos 0h (C; N=10); 4h (E4h, N=11 e P4h; N=10) ou 7h (E7h, N=10 e P7h, N=11). Amostras de sangue foram obtidas nos tempos 0h a 7h, para mensuração das concentrações PGFM no D15. O grupo E apresentou acentuada diminuição da área do CL, fluxo sanguíneo e concentração de P4 (P<0,05), comparado ao grupo P. Comparado ao grupo P, as vacas do grupo E anteciparam o dia da luteólise funcional e estrutural em 2 e 3 dias, respectivamente. O grupo E apresentou maior concentração de PGFM nos tempos 4h, 6h e 7h (P<0,05), comparado ao grupo P. A quantificação dos transcritos realizada por qPCR (N=6/grupo). Na hora 4, a abundância dos genes ESR1, ESR2, PRKC α , PRKC β , PLA2G4, AKR1B1 e AKR1C4 foi menor nas amostras E4h, enquanto OXTR foi maior nas mesmas amostras comparando-se com as amostras P4h (P<0,05). A expressão gênica de PTGS2 não diferiu entre os grupos E4h e P4h (P>0,05). Na hora 7, as amostras E7h também apresentaram menor abundância de ESR1, PRKC α , PRKC β , AKR1B1 e AKR1C4 (P<0,05) e houve tendência para menor expressão de ESR2, comparado às amostras P7h. Contudo, não houve diferença na abundância de OXTR, PLA2G4 e PTGS2 entre as amostras

E7h e P7h ($P>0,05$). A abundância da enzima PKC α analisada por Western Blotting (N=3/grupo) foi diminuída tanto nas amostras E4h como nas E7h, em relação às amostras P4h e P7h, respectivamente. Na avaliação por imunohistoquímica (N=5/grupo), o grupo E4h apresentou maior imunomarcção de PGR no epitélio glandular ($P<0,05$) e houve tendência para maior imunomarcção de PKC γ no epitélio luminal, comparado ao grupo P4h ($P=0,08$). Houve tendência para menor imunomarcção de ER α no epitélio glandular do grupo E4h comparado ao grupo E7h ($P=0,1$). Concluí-se que a aplicação do 17 β -E2 levou a redução da maioria dos transcritos das moléculas de síntese de PGF2 α , assim como da abundância de PKC α . O possível mecanismo para a estimulação de PGFM por 17 β -E2 pode incluir o aumento da ativação de enzimas que participam na cascata de síntese de PGF2 α .

Palavras-chave: Luteólise. Prostaglandina. Endométrio. Bovinos.

ABSTRACT

OLIVEIRA, M. L.: **17 β -estradiol action on the synthesis of endometrial PGF2 α in cows** [Ação do 17 β -estradiol na síntese de PGF2 α endometrial em vacas] 2017. 106 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

17 β -E2 stimulates the expression of endometrial receptors, ER and OXTR. Activation of OXTR induces the activation of the synthesis of PGF2 α pathway. The central hypothesis is that the enzymes involved in PGF2 α synthesis are regulated by 17 β -E2. The objective of this study was to determine the effects of 17 β -E2 on gene and protein expression and localization of the enzymes involved in PGF2 α synthesis. Multiparous, non-lactating and cyclic Nelore cows were synchronized by BE application and P4 device insertion. After 8 days the P4 device was removed and a single dose of PGF2 α applied, followed by 4 days of estrus detection (D0 = day of estrus). Daily measurements of CL area (cm²), blood flow (%), and plasma progesterone concentration (P4) were performed between D14 and D27. On D15 cows were divided into three groups: Control (C, untreated, N = 10), Placebo (P; 6mL of ethanol 50%, IV; N = 21) and Estradiol (E; 3mg 17 β -E2; Ethanol 50%, IR; N = 21). After the treatments administration, uterine biopsies were collected at times 0h (C; N = 10); 4h (E4h, N = 11 and P4h, N = 10) or 7h (E7h, N = 10 and P7h, N = 11). Blood samples were obtained from time 0h to 7h for the measurement of the PGFM concentrations on D15. Group E showed a marked decrease in CL area, blood flow, and P4 concentration (P <0.05) compared to group P. Also, when compared to group P, cows from group E anticipated the day of functional and structural luteolysis in 2 and 3 days, respectively. Group E presented higher concentration of PGFM at 4h, 6h and 7h (P <0.05), compared to group P. The transcripts abundance was performed by qPCR (N = 6 / group). The transcripts abundance of ESR1, ESR2, PRKC α , PRKC β , PLA2G4, AKR1B1, and AKR1C4 genes was lower in the E4h samples, while OXTR was higher in the same samples compared to the P4h (P <0.05) samples in the time 4h. The gene expression of PTGS2 did not differ between groups E4h and P4h (P > 0.05). At time 7h, samples E7h also had lower abundance of ESR1, PRKC α , PRKC β , AKR1B1 and AKR1C4 (P <0.05) and there was a tendency for lower ESR2 expres-

sion, compared to samples P7h. Nevertheless, there was no difference in the abundance of OXTR, PLA2G4, and PTGS2 between samples E7h and P7h ($P > 0.05$). The abundance of the PKC α enzyme analyzed by Western Blotting ($N = 3$ / group) was decreased in both the E4h and E7h samples, relative to the samples P4h and P7h, respectively. In the evaluation by immunohistochemistry ($N = 5$ / group), the E4h group presented greater PGR immunostaining in the glandular epithelium ($P < 0.05$) and there was a tendency for a greater immunostaining of PKC γ in the luminal epithelium, compared to the P4h group ($P = 0.08$). There was a tendency for lower ER α immunostaining in the glandular epithelium of the E4h group compared to the E7h group ($P = 0.1$). It was concluded that the application of 17 β -E2 led to the reduction of most of the transcripts of the PGF2 α synthesis molecules, as well as the abundance of PKC α . The possible mechanism for stimulation of PGFM by 17 β -E2 may include increased activation of enzymes that participate in the cascade of PGF2 α synthesis.

Key words: Luteolysis. Prostaglandin. Endometrium. Cattle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo hipotético do efeito do 17 β -estradiol na expressão de moléculas envolvidas na síntese de PGF2 α endometrial	25
Figura 2 - Via de síntese de PGF2 α endometrial durante a fase luteínica em fêmeas bovinas	31
Figura 3 - Protocolo de Sincronização e manejo dos animais	40
Figura 4 - Modelo experimental, tratamento e coleta de amostras de vacas de corte no dia 15 após o estro	43
Figura 5 - Separação dos animais por análise multivariada fatorial da expressão gênica dos grupos Controle (C), Placebo (P4h e 7h) e Estradiol (E4h e E7h).	69
Figura 6 - Imunolocalização do receptor de progesterona (PGR) em tecido endometrial por imuno-histoquímica	73
Figura 7 - Imunolocalização do receptor de estradiol (ESR α) em tecido endometrial por imuno-histoquímica	74
Figura 8 - Imunolocalização da proteína quinase gama (PKC γ) em tecido endometrial por imuno-histoquímica	75
Figura 9 - Imunolocalização da proteína quinase alfa (PKC α), Ciclooxigenase-2 (COX2), Aldo ceto redutase B1 e C3 (AKR1B1; AKR1C3) em tecido endometrial por imuno-histoquímica.	76
Figura 10 - Efeitos do 17 β -estradiol na liberação temporal de PGFM (pg/ML) sobre os componentes moleculares da via de síntese de PGF2 α no endométrio de vacas no dia 15 do ciclo estral, 4 e 7 horas após o tratamento.	78
Figura 11 - Via de sinalização e síntese de PGF2 α , representando o efeito da aplicação do 17 β -estradiol sobre os receptores endometriais, enzimas de sinalização e síntese de PGF2 α no endométrio de vacas no dia 15 após o estro.....	87
Figura 12 - Concentrações plasmáticas de PGFM na circulação sistêmica (pg/mL) de vacas no dia 15 após o estro em animais não tratados (Controle; C).	102

Figura 13 - Concentrações plasmáticas de PGFM na circulação sistêmica (pg/mL) de vacas no dia 15 após o estro, em relação as horas após o tratamento com placebo no grupo P4h.	103
Figura 14 - Concentrações plasmáticas de PGFM na circulação sistêmica (pg/mL) de vacas no dia 15 após o estro, em relação as horas após o tratamento com 17 β -estradiol no grupo E4h.....	104
Figura 15 - Concentrações plasmáticas de PGFM na circulação sistêmica (pg/mL) de vacas no dia 15 após o estro, em relação as horas após o tratamento com placebo no grupo P7h.	105
Figura 16 - Concentrações plasmáticas de PGFM na circulação sistêmica (pg/mL) de vacas no dia 15 após o estro, em relação as horas após o tratamento com 17 β -estradiol no grupo E7h.	106

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Nomenclatura e sequência dos primers forward (F) e reverse (R), identificação representativa (ID) e números de pares de bases (pb) dos produtos de PCR para cada gene testado.....	48
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características das reações de amplificações e da curva padrão para validação dos <i>primers</i>	50
Tabela 2 -	Especificações de marca, clonalidade, imunógeno, espécie que foi sintetizado, e concentração do produto de anticorpos adquiridos para a detecção das proteínas envolvidas na síntese de PGF2 α	52
Tabela 3 -	Dia da luteólise estrutural e luteólise funcional em vacas tratadas com 17 β -estradiol (E) placebo (P) e não tratadas controle (C) no dia 15 após o estro, apresentados por média e erro padrão da média (média $\pm$ EPM)	58
Tabela 4 -	Distribuição e intensidade de marcação de proteínas envolvidas na síntese de PGF2 α , em vacas no dia 15 do ciclo estral	72

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Área do CL (cm ²), porcentagem da área do CL com sinais coloridos do fluxo sanguíneo (%) avaliado por ultrassonografia com Doppler e concentrações plasmáticas de P4 (ng/mL) nos diferentes dias do ciclo estral para os diferentes tratamentos, considerando a administração dos tratamentos no D15.	60
Gráfico 2 -	Proporção de corpo lúteo ativo (%) nos diferentes dias após o estro nos grupos controle (C), placebo (P) e estradiol (E)	61
Gráfico 3 -	Concentrações plasmáticas temporais de PGFM na circulação sistêmica (pg/mL) de vacas no dia 15 após o estro, após o tratamento para os diferentes grupos.....	63
Gráfico 4 -	Abundância de transcritos de componentes moleculares envolvidos na síntese de PGF2 α em vacas durante a fase luteínica (D15) do ciclo estral nos grupos controle C e Placebo (4h e 7h).....	65
Gráfico 5 -	Abundância de transcritos de receptores endometriais envolvidos na síntese de PGF2 α em vacas durante a fase luteínica (D15) do ciclo estral nos grupos placebo (P4h e P7h) e estradiol (E4h e E7h).....	67
Gráfico 6 -	Abundância de transcritos de enzimas envolvidas na síntese de PGF2 α em vacas durante a fase luteínica (D15) do ciclo estral nos grupos placebo (P4h e P7h) e estradiol (E4h e E7h).	68
Gráfico 7 -	Abundância de PRKC α e PKC β , proteínas envolvidas na sinalização e síntese de PGF2 α no endométrio de vacas durante a fase luteínica (D15) do ciclo estral nos grupos (P4h e P7h) e estradiol (E4h e E7h).	70

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	26
2.1	LUTEÓLISE	26
2.2	PROSTAGLANDINA F2 α	26
2.3	ESTEROIDES NO CONTROLE LUTEOLÍTICO	29
2.4	MECANISMO MOLECULAR DA LUTEÓLISE.....	30
2.5	LUTEÓLISE FUNCIONAL	34
2.6	LUTEÓLISE ESTRUTURAL	35
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1	ANIMAIS.....	39
3.2	MANEJO REPRODUTIVO	39
3.3	AVALIAÇÕES ULTRASSONOGRÁFICAS	41
3.4	TRATAMENTO <i>IN VIVO</i>	41
3.5	COLETA DE AMOSTRAS DE SANGUE	42
3.6	COLETA DE TECIDO ENDOMETRIAL POR BIÓPSIA.....	43
3.7	MENSURAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE P4 POR RADIOIMUNOENSAIO	44
3.8	QUANTIFICAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE PGFM POR ELISA	45
3.9	EXPRESSÃO GÊNICA POR qPCR.....	46
3.10	LOCALIZAÇÃO PROTEICA POR WESTERN BLOTTING.....	50
3.11	LOCALIZAÇÃO PROTEICA POR IMUNO-HISTOQUÍMICA	53
3.12	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	55

4	RESULTADOS	58
4.1	REGRESSÃO LUTEAL	58
4.1.1	Momento da luteólise funcional e estrutural.....	58
4.1.2	Área do corpo lúteo.....	59
4.1.3	Fluxo sanguíneo do corpo lúteo	59
4.1.4	Concentração plasmática de P4.....	59
4.2	CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE PGFM	61
4.3	ABUNDÂNCIA DE RNAm.....	64
4.4	ABUNDÂNCIA PROTEICA.....	69
4.5	LOCALIZAÇÃO PROTEICA	71
4.5.1	PGR.....	72
4.5.2	ER α	73
4.5.3	PKC γ	74
4.5.4	PKC α	75
4.5.5	COX2.....	76
4.5.6	AKR1B1	77
4.5.7	AKR1C3	77
5	DISCUSSÃO	79
6	CONCLUSÕES	88
	REFERÊNCIAS	89
	Apêndices	101

1. INTRODUÇÃO

O ciclo estral corresponde ao período compreendido entre dois estros e em fêmeas bovinas tem duração média de 21 dias (GINTHER; KNOPF; KASTELIC, 1989). Após a ovulação inicia-se a luteinização das células foliculares que originam a estrutura conhecida como corpo lúteo (CL). A regressão funcional e estrutural do CL, ou luteólise, é um evento fisiológico fundamental para o início do novo ciclo estral. Em fêmeas bovinas a regressão do CL ocorre entre os dias 16 e 19 do ciclo estral, considerando o estro como o dia 0 (GINTHER; KNOPF; KASTELIC, 1989). A luteólise é causada pela liberação de pulsos de prostaglandina F₂ α (PGF₂ α) endometrial, conhecida como a principal substância luteolítica em ruminantes (KINDAHL; EDQVIST; GRANSTRISM, 1976; MCCRACKEN; SCHRAMM; OKULICZ, 1984; MCCRACKEN; CUSTER, 1999). Além disso, a síntese de PGF₂ α é regulada por hormônios ovarianos e seus receptores presentes no endométrio de vacas e ovelhas (SPENCER et al., 2007). Por exemplo, o estradiol possui substancial relevância no processo luteolítico. De fato, observou-se que a eletrocauterização de folículos ovarianos de vacas com raio-x (1.500 rads) promoveu atraso na regressão luteínica (VILLA-GODOY et al., 1985). A supressão das secreções foliculares pelo procedimento de eletrocauterização tornou possível constatar que a presença de estradiol é fundamental para o desencadeamento da luteólise espontânea. Adicionalmente, o estímulo farmacológico da síntese de PGF₂ α pela administração de estradiol promove a antecipação da luteólise (THATCHER et al., 1986; PUGLIESI et al., 2011). Além disso, o estímulo de PGF₂ α é dose dependente de estradiol (GINTHER et al., 2010; PUGLIESI et al., 2011). Sendo assim, o aumento das concentrações de estradiol, tanto por mecanismos fisiológicos como farmacológicos, está associado ao desencadeamento da luteólise (SALFEN et al., 1988). Por outro lado, a diminuição das concentrações de estradiol por aspiração folicular atrasa a luteólise de vacas (ARAUJO et al., 2009).

O controle molecular da liberação pulsátil de PGF₂ α é complexo e tem a ativação de receptores endometriais de ocitocina (OXTR) como passo-chave para a luteólise (SPENCER et al., 2007; SILVIA; RAW, 1993; MANN; LAMMING; FRAY, 1995). Relatou-se em estudos que o estradiol controla a expressão de OXTR e

aumenta as concentrações de $\text{PGF2}\alpha$ no endométrio de ruminantes (SPENCER et al., 1995; ASSELIN et al., 1996; VALLET; LAMMING; BATTEN, 1990; FLEMING et al., 2006). As mudanças nas concentrações de hormônios esteroides, estradiol e progesterona (P4), que ocorrem durante o ciclo estral, são fundamentais para coordenar a presença dos receptores endometriais de ocitocina (OXTR), estradiol (ESR) e progesterona (PGR) (JENNER, 1991; SPENCER; BAZER, 1995; OKUMU et al., 2010; BISHOP, 2013). Elevadas concentrações de PGR no diestro inicial inibem a expressão de ESR, e consequentemente, de OXTR no endométrio. O aumento das concentrações de P4 leva a uma gradual diminuição da expressão de PGR, por mecanismo de *feedback* negativo (OKUMU et al., 2010). Adicionalmente, o aumento da expressão de ESR e sua ativação pelo estradiol é fundamental para a transcrição de OXTR e estimulação da síntese de $\text{PGF2}\alpha$ endometrial (FLEMING et al., 2006). Portanto, o aumento da expressão de OXTR é dependente do *feedback* negativo da P4 no PGR, assim como do aumento de estradiol para ativação de ESR e aumento de OXTR. A ligação da ocitocina (OT) ao seu receptor aciona uma complexa via de síntese de $\text{PGF2}\alpha$ (MCCRACKEN; CUSTER; LAMSA, 1999). Os OXTRs são receptores acoplados à proteína $\text{Gq}\alpha$, sua ativação estimula a fosfolipase C (PLC) que atua na membrana celular hidrolisando fosfatidil-inositol bisfosfato em Inositol 1,4,5 trifosfato (IP3) e 1,2 diacilglicerol (DAG) (TYSSELING et al., 1997). O IP3 causa a liberação de Ca^{2+} armazenado no retículo endoplasmático (GIMPL; FAHRENHOLZ, 2001). Algumas enzimas componentes da cascata de síntese de $\text{PGF2}\alpha$, tais como proteínas quinases (PKCs) e fosfolipases A (PLAs) são dependentes do Ca^{2+} para sua ativação. Assim, o DAG na presença de Ca^{2+} leva a uma cascata de ativação de proteínas quinases ($\text{PRKC}\alpha$, $\text{PRKC}\beta$, $\text{PRKC}\gamma$) (MELLOR; PARKER, 1998), proteínas quinases ativadoras de mitógeno (MAPK), quinases reguladas por sinal extracelular (ERK1/2) e fosfolipase A2 (PLA2). Subsequentemente, a PLA2 cliva o ácido araquidônico (AA) da membrana plasmática (GIMPL; FAHRENHOLZ, 2001; TITHOF et al., 2007). Assim, o AA livre no citosol é convertido, pela ação da cicloxigenase 2 (PTGS2), a prostaglandina reduzida (PGH2). As enzimas sintases de $\text{PGF2}\alpha$ (AKR1B1 e AKR1C4) utilizam a PGH2 como substrato para síntese de $\text{PGF2}\alpha$ (FORTIER et al., 2008). Este mecanismo molecular de síntese de $\text{PGF2}\alpha$ realizada pela ativação de componentes moleculares *downstream* ao receptor de OXTR é conhecido. Evidenciou-se que o

estímulo do estradiol na expressão de receptores endometriais de ESR e especialmente de OXTR, é ponto crítico na ativação da via de síntese de PGF2 α (FLEMING et al., 2015). Os efeitos do estradiol sobre outros componentes da via de síntese de PGF2 α endometrial durante a luteólise permanecem desconhecidos.

Atualmente, os efeitos do estradiol na luteólise são restritamente indicados pelo controle dos receptores endometriais ESR e OXTR, porém é provável que o estradiol possua efeitos diretos sobre outros componentes da cascata de síntese de PGF2 α . Membrive et al. (2014) demonstraram o aumento da síntese de PGF2 α pela adição de cálcio ionóforo (Ca²⁺I) *in vitro*, em cultivos de explantes endometrias de vacas tratadas com estradiol *in vivo*. O aumento máximo na síntese de PGF2 α foi obtido com a combinação dos tratamentos estradiol e cálcio ionóforo. Além disso, estes estimuladores utilizados de forma isolada não aumentaram a síntese de PGF2 α . Curiosamente, a síntese de PGF2 α não foi estimulada por melitina (estimulante de PLA2) ou por OT, tanto em explantes de animais tratados como nos de animais não tratados com estradiol (MEMBRIVE et al., 2014). Assim sendo, o aumento de PGF2 α pela combinação de estradiol e Ca²⁺I é uma forte evidência que o E2 promova aumento da abundância ou da atividade de enzimas dependentes de Ca²⁺. Diante desses achados, foi formulada a hipótese geral que 17 β -estradiol estimula diretamente componentes da via de síntese de PGF2 α . A hipótese da presente tese é que a aplicação de estradiol em vacas de corte, no dia 15 do ciclo estral modula a expressão gênica e proteica de moléculas envolvidas na sinalização e síntese de PGF2 α , mais especificamente ESR1, ESR2, OXTR, PRKC, PRKC γ , PLA2G4, PTGS2, AKR1B1, AKR1C3 e AKR1C4, conforme mostrado na Figura 1. Assim sendo, com o presente estudo, objetivou-se avaliar os efeitos da administração sistêmica de 17 β -estradiol (17 β -E2) sobre componentes da cascata de síntese endometrial de PGF2 α em vacas de corte, no dia 15 do ciclo estral. Para testar essa hipótese, foram avaliados os efeitos da administração de 17 β -estradiol sobre: (1) as concentrações plasmáticas de 13,14-diidro-15-ceto-PGF2 α (PGFM); (2) as concentrações plasmáticas de P4 (3) a área e o fluxo sanguíneo por ultrassonografia; (4) quantificação relativa abundância de transcritos de genes relacionados à síntese de PGF2 α pela técnica qPCR; (5) a abundância de proteínas envolvidas na síntese de PGF2 α pela técnica de Western Blotting e (6) a localização de proteínas envolvidas na síntese de PGF2 α por imuno-histoquímica.

Figura 1 – Modelo hipotético do efeito do 17β -estradiol na expressão de moléculas envolvidas na síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial

Fonte: (OLIVEIRA, M.L., 2017) Adaptado de Thatcher et al. (1986), Bertan (2004) e Pugliesi et al. (2011).

Legenda: Curva das concentrações plasmáticas de PGFM em resposta à aplicação de 17β -estradiol (hora 0) em vacas ciclando. Supõe-se que o 17β -estradiol estimula a expressão de componentes da cascata de síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$, promovendo um discreto aumento na abundância dos componentes moleculares de síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ 4 horas após a aplicação de 17β -estradiol, seguido por máxima abundância após 7 horas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LUTEÓLISE

Durante o ciclo estral as células ovarianas passam por modificações estruturais e funcionais. Desta forma, as gônadas são essenciais para o controle do ciclo estral visto que sintetizam hormônios esteróides, especialmente 17β -estradiol e P4 (YOUNG; MCNEILLY, 2010; WEBER et al., 1987). Os folículos ovarianos são compostos por agregados celulares que sustentam e nutrem o ócito e podem ser classificados de acordo com a quantidade e tipos celulares presentes. Além disso, as células da teca e da granulosa possuem a função de síntese do hormônio 17β -estradiol (YOUNG; MCNEILLY, 2010). Após a ovulação ocorre um processo de remodelação tecidual e as células estrogênicas se tornam células luteínicas passando a sintetizar P4 (WEBER et al., 1987). Desta forma, o ciclo estral é dividido em duas fases, fase folicular e luteínica, que são caracterizadas pelo predomínio de elevadas concentrações de E2 e P4, respectivamente. Os esteroides contribuem para o controle da liberação de prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$), principal agente luteolítico nos animais domésticos (WALTERS; SCHAMS; SCHALLENBERGER, 1984), responsável pelo término de cada ciclo. É conhecido que o estradiol estimula a síntese de $PGF2\alpha$ e tem efeito luteolítico, porém os mecanismos moleculares que envolvem tal atuação na liberação de $PGF2\alpha$ ainda não foram esclarecidos.

2.2 PROSTAGLANDINA $F2\alpha$

A $PGF2\alpha$ é um potente agente luteolítico em muitas espécies de animais domésticos. Em bovinos a $PGF2\alpha$ é a principal molécula sintetizada pelo endométrio durante a regressão luteínica (KINDAHL; EDQVIST; GRANSTRISM, 1976; MCCRACKEN; SCHRAMM; OKULICZ, 1984; MCCRACKEN; CUSTER, 1999).

Modelos experimentais envolvendo histerectomias uni e bilaterais instituíram que a presença do corno ipsilateral ao ovário, contendo o CL, é essencial para a

regressão do CL em ruminantes. Em contrapartida, a hemihistectomia do corno ipsilateral ao ovário, contendo o CL, leva persistência do mesmo (GINTHER, 1981). A partir de tais modelos estabeleceu-se que a comunicação direta entre o útero e o ovário é necessária para que a PGF2 α uterina chegue até o CL e promova a luteólise. Desta forma, foi especulado que essa comunicação acontecesse através do contato vascular entre a veia uterina e artéria ovariana. Posteriormente, o transporte local da PGF2 α foi definido como mecanismo de “transporte de PGF2 α por contra-corrente”, mecanismo que consiste no transporte de PGF2 α da veia uterina para artéria ovariana (GINTHER, 1976). Sabe-se que a PGF2 α é rapidamente metabolizada nos pulmões, onde uma única passagem pelo mesmo determina a metabolização 90% e 65% de PGF2 α em bovinos e ovinos, respectivamente (MCCRACKEN; CUSTER; LAMSA, 1999). A importante característica do “transporte contra-corrente” é que a PGF2 α alcança primeiramente os ovários, chegando ao pulmão somente após sua ação no CL (GINTHER, 1976). Além disso, o transporte de PGF2 α é favorecido por transportadores de prostaglandinas pertencentes à família de proteínas “solute carrier” (LEE et al., 2010).

A 13,14-dihidro-15-keto-PGF2 α (PGFM) é o principal metabólito da PGF2 α e possui elevada correlação com a concentração de PGF2 α . A PGF2 α possui curta meia-vida plasmática, sendo de aproximadamente 1 minuto. Entretanto a PGFM, apresenta meia-vida um pouco maior, cerca de oito minutos. Desta forma, em vários estudos utilizou-se a quantificação plasmática de PGFM para indicar concentrações de PGF2 α (KOTWICA et al., 1997; MANN; LAMMING, 1999; SANTOS et al., 2009; GINTHER; SHRESTHA; BEG, 2010). A liberação pulsátil de PGF2 α uterina é determinante para o desencadeamento da luteólise (SILVIA et al., 1991). O aumento da amplitude na liberação pulsátil de PGF2 α ocorre entre os dias 15 e 19 do ciclo estral, evento crucial para a adequada regressão do CL em fêmeas bovinas (MCCRACKEN; CUSTER; LAMSA, 1999). Durante este período, cinco a oito pulsos luteolíticos de PGF2 α são liberados em um intervalo de 48 a 72 horas. Os primeiros pulsos correspondem à liberação de picos com concentrações menores que 100 pg/mL de PGFM e posteriormente aumentam até atingir picos de aproximadamente 500 pg/mL de PGFM, que determinam a regressão funcional e estrutural do CL (KINDAHL et al., 1976; GINTHER et al., 2010).

Análogos de PGF2 α causam regressão do CL e permitem o início de um novo ciclo, portanto, são amplamente empregados para a sincronização do estro de vacas (PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995; PURSLEY; KOSOROK; WILTBANK, 1997). A administração de PGF2 α exógena promove a interrupção da prenhez, a regressão funcional e estrutural do CL e o início de novo ciclo em ruminantes (GINTHER; KNOPF; KASTELIC, 1989; NISWENDER et al., 1994; GINTHER et al., 2009). Durante a metade ou final da fase luteínica, uma única aplicação de PGF2 α promove diminuições nas concentrações de P4 e consequentemente ocasiona a luteólise (GINTHER et al., 2007; SHRESTHA et al., 2011).

A aplicação de uma única dose de PGF2 α antes do 5º dia do ciclo estral não é eficaz em provocar a regressão do CL, ou seja, em vacas durante o início do diestro o CL não é responsivo à ação de PGF2 α (HENRICKS et al., 1974). Contudo, verificou-se que aplicações repetidas de PGF2 α foram capazes de promover a regressão de CL no 4º dia do ciclo estral (HENRICKS et al., 1974). Neste contexto, a ausência de receptores de PGF2 α no CL poderia ser determinante para a não responsividade do CL à PGF2 α . Tais receptores foram encontrados no CL durante os primeiros 4 dias do ciclo estral de vacas (WILTBANK et al., 1995). Em estudos subsequentes, foi evidenciado que os transcritos de mRNA de receptor de PGF2 α não varia durante o ciclo estral de vacas (JUENGEL et al., 1996). Assim, concluiu-se que a baixa resposta da PGF2 α em causar luteólise no início do diestro não ocorre pela ausência de tais receptores. Posteriormente, evidenciou-se que a falta de responsividade do CL à PGF2 α ocorre porque as células luteais adquirem perfis de expressão gênica diferentes no início e no final do ciclo (TSAI; WILTBANK, 1998). A célula luteal responsiva à PGF2 α apresenta maior aporte de genes para a modulação da cascata luteolítica, especialmente da COX2, que apresenta expressão três vezes maior no grupo responsivo (TSAI; WILTBANK, 1997; TSAI; WILTBANK, 1998). Tal aumento na expressão de COX2 sugere um mecanismo de retroalimentação positivo na síntese de PGF2 α nas células luteais grandes (TSAI; WILTBANK, 1997; TSAI; WILTBANK, 1998). Além disso, animais que receberam múltiplas (1 a 4) infusões de PGF2 α para simular pulsos luteolíticos apresentaram diferentes perfis de expressão gênica em células luteais grandes (ATLI et al., 2012). Neste mesmo estudo, avaliou-se a caracterização do perfil gênico de células luteais do primeiro ao quarto pulso. De forma geral, em resposta aos primeiros pulsos de PGF2 α houve maior expressão de genes do sistema imune e de fatores

angiogênicos, enquanto em resposta aos últimos pulsos houve diminuição da transcrição de genes relacionados com a angiogênese e esteroidogênese (ATLI et al., 2012). Assim, a capacidade de resposta luteolítica do CL à PGF2 α depende da capacidade de expressão das células luteais.

2.3 ESTEROIDES NO CONTROLE LUTEOLÍTICO

O 17 β -estradiol e a P4 são importantes hormônios esteróides gonadais que controlam o ciclo estral de mamíferos. Durante o ciclo estral da vaca, o estradiol é amplamente conhecido por promover as manifestações de estro (LYIMO et al., 2000) e a P4 por seus efeitos positivos no desenvolvimento e sobrevivência embrionária (MCNEILL et al., 2006; CARTER et al., 2008). A concentração de ambos, 17 β -estradiol e P4, são determinantes para o controle da luteólise.

A P4 possui efeitos inibitórios sobre a liberação de ácido araquidônico da membrana das células endometriais, sugerindo que a mesma possa promover um acúmulo de ácido araquidônico (principal precursor da PGF2 α) durante a fase luteal (WILSON et al., 1986). A contínua exposição do endométrio à P4 aumenta até oito vezes a expressão gênica endometrial de PTGS2, esta essencial para síntese de PGF2 α (EGGLESTON et al., 1990). Foi observado em novilhas que a permanência de dispositivos de liberação de P4, com maiores concentrações de P4, entre os dias 8 e 21 do ciclo, promoveu maior número de picos de PGF2 α e duração do ciclo (DUCHENS et al., 1995). Em estudos recentes relatou-se que a aplicação de P4 injetável no início do diestro, em vacas de corte, também resulta na antecipação da luteólise (PUGLIESI et al., 2014). Lafrance e Goff (1988) mostraram que os efeitos de 17 β -estradiol e ocitocina na liberação de PGF2 α dependem do tempo de exposição à P4, de forma que maiores períodos de exposição à P4 potencializam os efeitos do estradiol e ocitocina (LAFRANCE; GOFF, 1988). Foi estabelecida a necessidade de um “priming” de oito dias de P4 seguido por uma redução de suas concentrações, condição essencial para o estradiol realizar adequada programação endometrial para síntese de PGF2 α (SPENCER et al., 1995).

O estradiol estimula a expressão de ESR1 e OXTR endometrial, reduz o intervalo de liberação e aumenta a concentração de PGF2 α em ruminantes (ZHANG;

WESTON; HIXON, 1991; BEARD; LAMMING, 1994; SPENCER; BAZER, 2002). A administração de 17β -estradiol estimula a liberação de PGFM desencadeando o pico luteolítico (GINTHER et al., 2010). Além disso, a administração de 17β -estradiol determina um aumento da amplitude e da intensidade dos picos de $\text{PGF}_2\alpha$ durante o processo luteolítico de maneira dose dependente (PUGLIESI et al., 2011).

2.4 MECANISMO MOLECULAR DA LUTEÓLISE

A P4 e o estradiol comandam a expressão de receptores endometriais PGR, ESR e OXTR (SPENCER; BAZER, 1995) que são essenciais para aumento da síntese e amplitude da liberação de pulsos de $\text{PGF}_2\alpha$ (PUGLIESI et al., 2011). A síntese de $\text{PGF}_2\alpha$ por ativação de receptores endometriais de ocitocina resulta de uma cascata de eventos intracelulares, altamente coordenados, por ativação sequencial de várias proteínas: proteína G, PLC, PKC, PLA2, COX2 e PGFS. Contudo, o mecanismo de controle molecular de síntese de $\text{PGF}_2\alpha$ permanece pouco estudado. Assim, faz-se necessário caracterizar os mecanismos moleculares envolvidos no controle da síntese e liberação de pulsos de $\text{PGF}_2\alpha$ durante a fase luteínica.

Os OXTR pertencem a uma família de receptores de membrana acoplados à proteína G que ao serem ativados pela OT estimulam moléculas de sinalização intracelular e proteínas da via de síntese de $\text{PGF}_2\alpha$ (SILVIA; HOMANICS, 1988). Mais especificamente, a ativação de OXTR leva a ativação da proteína G, seguida por ativação de PLC, gerando segundo mensageiros que estimulam a liberação de $\text{PGF}_2\alpha$. A PLC ativada cliva o fosfatidil-inositol bifosfato (PIP2) em inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG) (TYSSELING et al., 1997). O IP3 liga-se aos seus receptores no retículo endoplasmático, promovendo a abertura dos canais de cálcio e elevação das concentrações de cálcio no citosol. O DAG ativa a quinase C (PKC), também dependente de cálcio (TYSSELING et al., 1997). A PKC ativada induz a via das quinases *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK) e *extracellular signal-regulated kinase* (ERK1/2) que fosforila a Fosfolipase A2 citosólica (cPLA2), assim ocorre translocação da cPLA2 para a membrana (STRAKOVA et al., 1998). A PLA2 cliva a fosfatidilcolina da membrana liberando ácido araquidônico (AA) (GIJÓN;

LESLIE, 1999). Finalmente, o AA livre é convertido pela enzima cicloxigenase 2 (COX2) em prostaglandina H2 (PGH2). A PGH2 é convertida à PGF2 α por enzimas sintases específicas (AKR1B1, AKR1C3, AKR1C4, CBR1) (ASSELIN; DROLET; FORTIER, 1997; FORTIER et al., 2008).

Figura 2 – Via de síntese de PGF2 α endometrial durante a fase luteínica em fêmeas bovinas

Fonte: (OLIVEIRA, M.L, 2017). Adaptado de Burns et al. (1997), Spencer et al. (2007) e Fortier et. al. (2008).

Legenda: A presença do receptor de progesterona (PGR) inibe a expressão de receptor 1 de estrógeno (ESR1). O estradiol ativa seus receptores nucleares (ESR1 e ESR2). A ativação de ESR1 pelo hormônio 17 β -estradiol estimula a expressão do receptor de ocitocina (OXTR). A ocitocina se liga ao OXTR que estimula proteína G, desencadeando a ativação de fosfolipase C (PLC). A ativação de PLC leva a liberação de inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG) no citosol. O IP3 promove a abertura dos canais de Ca²⁺ e o DAG estimula uma cadeia sequencial de fosforilação de proteína quinase C (PRKC α , PRKC β e PRKC γ), proteína quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e quinases reguladas por sinal extra-celular (ERK1/2). A ERK1/2 promove ativação de fosfolipase A2 (PLA2G4) que induz a liberação de ácido araquidônico (AA) da membrana fosfolipídica. O AA é utilizado como substrato pela enzima cicloxigenase 2 (PTGS2) para formação de prostaglandina reduzida (PGH2). As prostaglandinas F sintases da família aldo-ceto redutases (AKR1B1, AKR1C3 e AKR1C4) metabolizam a PGH2 em prostaglandina F2 α (PGF2 α).

No endométrio bovino, a ativação da OXTR e, consequentemente, da PKC é primeiro passo na via de sinalização para a síntese da PGF2 α por sinalização de segundo mensageiros. A PKC faz parte de uma família de proteínas quinases que controlam a fosforilação de grupos hidroxila de serina/treonina, que mediante ativação determinam inúmeras respostas intracelulares (KERANEN; DUTIL; NEWTON, 1995). A ativação destas isoenzimas é dependente de cálcio, DAG, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico e forbol éster (MICHIE; NAKAGAWA, 2005). Binelli et al. (2000) observaram que o indutor de PKC, forbol éster (PDBu), estimulou a liberação de PGF2 α pelas células endometriais bovinas (BEND) entre 3 e 12 horas de incubação (BINELLI et al., 2000). Além disso, estudos em linhagens de células de câncer de mama humano mostraram que o estradiol, livre ou ligado a albumina sérica bovina (BSA), induz rapidamente o aumento da atividade PKC. A BSA impede que estradiol passe a membrana plasmática, sugerindo que o aumento da ativação de PKC pelo estradiol decorra independente dos seus receptores nucleares (BOYAN et al., 2003). Baseado nesses achados, o estradiol favorece a atividade de PLC e outros componentes celulares de síntese de PGF2 α .

A ativação de PKC estimula a fosforilação em cadeia de MAPK e ERK1/2. A fosforilação dessas quinases constitui etapa indispensável para a ativação de PLA2. Burns et al. (2001) detectaram concentração de ERK1/2 quatro vezes maior no grupo de explantes endometriais ovinos que receberam ocitocina. Além disso, a secreção de PGF2 α induzida por OT foi bloqueada de maneira dose-dependente por inibidor de ERK1/2 (PD98059) (BURNS et al., 2001). Chen et al. (2004) também observaram que o estradiol aumentou a fosforilação de ERK1/2 e que o inibidor de MAPK e ERK1/2 (PD98059) impediu a fosforilação de ERK1/2 em células endoteliais de artérias uterinas. Adicionalmente, em outro estudo verificou-se que a incubação de células BEND com forbol 12,13 dibutirato (PDBu) induz a síntese de PGF2 α , enquanto que o uso de um inibidor de MAPK (SB203580) ocasiona uma drástica redução da secreção de PGF2 α induzida pelo PDBu (GUZELOGLU et al., 2004). O aumento nas concentrações de ERK1/2 fosforilada foi positivamente correlacionado com o aumento na quantidade de PKC e mobilização de AA (BURNS et al., 2001). Desta forma, o aumento das concentrações e a ativação de PKC, ERK1/2 e MAPK, foram positivamente associadas ao aumento da síntese de PGF2 α .

A maioria das PLA2 é amplamente expressas em diferentes tecidos, onde estão envolvidas em diferentes processos biológicos como inflamação, regeneração de tecido e apoptose (CAPPER; MARSHALL, 2001). A hidrólise na posição sn-2 da membrana glicerofosfolipídica para a remoção do AA é seletivamente realizada pelas cPLA2 (TITHOF et al., 2007). A PKC está associada ao aumento da atividade de PLA2, e consequentemente, ao aumento da síntese de PGF2 α (DANET-DESNOYERS et al., 1995; BURNS et al., 1997). A PLA2G4 é dependente de cálcio e exibe maior seletividade por lipídios contendo AA do que outras PLA2, tendo sido primariamente associada com a geração direta de AA (TITHOF et al., 2007). Além disso, evidenciou-se que a melitina (estimulador da atividade da PLA2), AIF-4 (estimulador de proteína G) e ocitocina promovem a liberação de PGF2 α no endométrio bovino. Contudo, a adição de ácido aristolóquico (inibidor da atividade da PLA2) bloqueou a liberação de PGF2 α induzida por melitina, AIF-4 e OT (BURNS et al., 1997). Sugere-se que a síntese de PGF2 α pela ocitocina ocorra por modulação da ativação de PLA2.

Ao longo dos anos, diferentes grupos de pesquisa vêm estudando os mecanismos de regulação da atividade da PKC na ativação de PLA2 para a síntese de PGF2 α . A síntese de PGF2 α necessita da ativação, sinalização e fosforilação e de um complexo conjunto de moléculas. Ambas as enzimas, quinases e fosfolipases, estão envolvidas na síntese de PGF2 α e dependem de cálcio para serem ativadas (BURNS; HAYES; SILVIA, 1998). O cálcio é importante modulador da sinalização de vias moleculares, regulando a atividade enzimática ao se ligar em sítios específicos. Na presença de cálcio, a DAG ativa as PKCs que desencadeia uma sequencial fosforilação de MAPK, ERK1/2 e PLA2. Neste contexto, o cálcio atua como modulador da ativação de enzimas cálcio-dependentes, especialmente PKC e PLA2 (CLARK et al., 1991). Existem evidências de estímulo do estradiol sob a liberação de cálcio intracelular. Thomas et al. (2006) constataram que o estradiol aumentou a concentração intracelular de cálcio rapidamente e ativou a via de sinalização da síntese de prostaglandina em células MCF-7 humanas (THOMAS et al., 2006). Adicionalmente, o aumento intracelular das concentrações de cálcio em explantes endometriais bovinos tratados com ionóforo de cálcio (Ca²⁺I) *in vitro* resultou em aumento da liberação de PGF2 α (DANET-DESNOYERS et al., 1995; BURNS et al., 1997). A adição de Ca²⁺I ao cultivo de explantes endometriais coletados no dia 17 do ciclo de vacas previamente tratadas *in vivo* com estradiol,

aumenta a síntese de PGF2 α . O mesmo foi observado em experimentos utilizando BEND expostas ao estradiol e Ca²⁺I simultaneamente (MEMBRIVE et al., 2014). Assim, torna-se evidente o papel do cálcio na ativação das enzimas quinases *upstream* PLA2 e na potencialização do estradiol na síntese de PGF2 α durante a luteólise.

Como demonstrado, o 17 β -estradiol atua estimulando co-fatores e enzimas participantes da via de sinalização e síntese de PGF2 α . O estradiol ao se ligar aos seus receptores nucleares ativam fatores de transcrição. Porém para avaliar os efeitos não genômicos do estradiol, utiliza-se o mesmo associado ao BSA (E2-BSA). O BSA impede que o 17 β -estradiol atravesse a membrana celular, sugerindo as atividades não genômicas do mesmo. Schwartz, et al. (2002), utilizaram tamoxifen (inibidor de esteroide) e observaram a inibição de forma dose-dependente a PKC induzida pelo estradiol e pelo E2-BSA. Adicionalmente, ao testarem um antagonista de ER (ICI 182780) e um agonista de ER (dietilestilbestrol), nenhum deles afetou a resposta da PKC estimulada pelo 17 β -estradiol ou pelo E2-BSA nos condrócitos. Assim, evidenciou-se o papel do 17 β -estradiol na ativação de PKC por efeitos não genômicos (SCHWARTZ et al., 2002).

Diante deste contexto, presume-se que a expressão de receptores e de enzimas, assim como a presença de co-fatores são pontos fundamentais para a síntese de PGF2 α . Os efeitos do estradiol na expressão de receptores endometriais são conhecidos. Porém, ainda não são conhecidos os efeitos diretos do estradiol na expressão e localização das proteínas componentes da via de síntese de PGF2 α por ativação de receptores de ocitocina durante a luteólise de vacas.

2.5 LUTEÓLISE FUNCIONAL

O CL sintetiza elevadas concentrações de P4 durante fase luteínica. A diminuição da síntese de P4 pelo CL é indicado como o ponto inicial da regressão do CL (MANN; LAMMING, 2006; GINTHER et al., 2007). A PGF2 α foi descrita em seções anteriores como uma molécula de elevado potencial luteolítico. A administração de PGF2 α promove a redução da síntese de P4 no CL alcançando concentrações menores que 1 ng/mL, desta forma determinando o término da fase

luteínica e do ciclo estral (NETT; MCCLELLAN; NISWENDER, 1976;.GINTHER et al., 2007) Contudo, os mecanismos envolvidos na ação da PGF2 α na redução da síntese de P4 pelo CL durante a luteólise ainda não foram estabelecidos. Assim, propõe-se que a PGF2 α possa exercer atividade luteolítica através da inibição dos mecanismos luteotrópicos e/ou enzimas esteroidogênicas ou por impedir o transporte de substrato para o interior das células luteais.

O colesterol é o principal substrato para a síntese de P4. No interior da mitocôndria o colesterol é convertido à pregnolona pela enzima citocromo P450 *side-chain cleavage* (P450scc) (HANUKOGLU, 1992). A proteína *steroidogenic acute regulatory protein* (STAR) transporta o colesterol para o interior da mitocôndria e pregnolona para o exterior da mitocôndria. A pregnolona é catalizada pela enzima 3-hydroxysteroid dehydrogenase, $\Delta 5\Delta 4$, isomerase (3-HSD) à P4 no retículo endoplasmático liso (HANUKOGLU, 1992; NISWENDER et al., 1994). Especula-se que a ação luteolítica da PGF2 α deva ocorrer por inibição das enzimas esteroidogênicas, P450scc e 3-HSD, fundamentais para a síntese de P4. Por outro lado, existem evidências que a PGF2 α promova bloqueio do transporte do colesterol para o interior da mitocôndria, levando a falta de substrato para a síntese de P4. Assim, a administração de PGF2 α induziu à ausência da expressão gênica de 3-HSD e de STAR, enquanto a P450scc permaneceu expressa (TIAN; BERNDTSON; FORTUNE, 1994; PESCADOR et al., 1996). Assim, sugere-se que a atividade da PGF2 α na inibição da síntese de P4 ocorra por inibição da 3-HSD e/ou por bloqueio do transporte de colesterol por inibição da STAR.

2.6 LUTEÓLISE ESTRUTURAL

Concomitante à luteólise funcional ocorre a luteólise estrutural. A regressão estrutural do CL envolve a regulação de mediadores da luteólise, tais como fatores angiogênicos, peptídeos vasoativos, células imunes, quimiocinas e complexo de histocompatibilidade maior, entre outros. A complexa interação de tais componentes permite a diminuição do volume e do fluxo sanguíneo do CL, consequentemente determinando a luteólise (MIYAMOTO et al., 2005).

A redução do fluxo sanguíneo no CL tem sido indicada como essencial para o início da luteólise (MIYAMOTO et al., 2005). A aplicação de PGF2 α durante o início da fase luteínica, não exerce efeitos sobre o fluxo sanguíneo e a regressão do CL. Contudo, a aplicação de uma dose luteolítica de PGF2 α em vacas que possuem CL após o dia 6 do ciclo estral, resulta em rápido e agudo aumento seguido por progressiva diminuição do fluxo sanguíneo no CL (ACOSTA et al., 2002). Os fatores angiogênicos e vasoativos também apresentam importante papel no aporte sanguíneo do CL, sendo especialmente importantes na foliculogênese, desenvolvimento e regressão do CL (MIYAMOTO; SHIRASUNA; SASAHARA, 2009; BRUNO et al., 2009).

Os fatores angiogênicos tais como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento semelhante à Insulina (IGF) e seus receptores estão presentes no CL de bovinos durante a fase luteínica inicial (SCHAMS; BERISHA, 2004). Os fatores angiogênicos VEGF, FGF, IGF e angiopoetina 1 e 2 (ANGTP-1 e ANGTP-2), se destacam no controle da vascularização durante a fase luteínica. O VEGF e seu receptor VEGFR2 apresentam maior expressão durante período de vascularização, especialmente na fase de desenvolvimento inicial do CL (SAKUMOTO et al., 2000; SCHAMS; BERISHA, 2004). O FGF1 e FGF2 são expressos durante todo o ciclo estral de bovinos, porém FGF1 aumenta na metade da fase luteínica (ZHENG; REDMER; REYNOLDS, 1993). Tanto o VEGF como o FGF são indicados como fatores angiogênicos primários para vascularização inicial do CL, ambos tem suas concentrações diminuídas após a luteólise (NEUVIANS; BERISHA; SCHAMS, 2004). A expressão de IGF1, IGF2 e IGFR1 foi maior durante a fase luteínica inicial, entre os dias 1 e 4 do ciclo estral de bovinos (SCHAMS et al., 2002). A relação dos fatores angiogênicos ANTP-1/ ANTP-2 aumenta no período de formação do CL e na luteólise. Alterações nesta relação parecem ser necessárias para adequada angiogênese e regressão do CL (SCHAMS; BERISHA, 2004). Após a luteólise a expressão dos fatores angiogênicos é diminuída. A aplicação de PGF2 α também leva a diminuição da expressão de VEGF, FGF, IGF1, ANGTP-2 e aumento da relação ANPT1/ANTP2 e proteína 1 de ligação ao fator de crescimento semelhante a insulina (IGFBP1) (NEUVIANS et al., 2003; BERISHA; MEYER; SCHAMS, 2010; NEUVIANS; BERISHA; SCHAMS, 2004). Sendo assim, os fatores angiogênicos

participam da formação, manutenção e regressão do CL (BERISHA; SCHAMS, 2005).

Os fatores vasoativos estão presentes em grande proporção no CL durante a luteólise estrutural. A PGF2 α , além de promover redução do fluxo sanguíneo leva ao aumento de fatores vasoativos como a endotelina 1 (ET-1), angiotensina II (ANG-II) e óxido nítrico sintase (NOS) (SKARZYNSKI et al., 2003; LEE et al., 2009). O NOS é considerado um potente vasodilatador enquanto ET-1 e ANG-II são vasoconstritores (KOBAYASHI et al., 2002). Cultivos de células luteais endoteliais oriundas da metade da fase luteínica (dia 8 ao dia 14 do ciclo estral) aumentam a atividade de NOS duas horas após a adição de PGF2 α . A expressão de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) também é aumentada duas horas após a aplicação de PGF2 α , seguida por diminuição após seis horas (LEE et al., 2009). Assim, a expressão de NOS é maior no início da fase luteínica e horas antes da luteólise, no entanto diminui progressivamente até o final da luteólise (LEE et al., 2009; ROSIANSKY-SULTAN et al., 2006). Contudo, a expressão de ET-1 é menor no início do ciclo estral e aumenta na fase luteínica tardia, permanecendo elevada até a regressão (ROSIANSKY-SULTAN et al., 2006). Desta forma, a expressão de ET-1 é inversa à expressão de NOS, sendo indicativo de uma regulação mútua entre ET-1 e NOS. O aumento das concentrações de PGF2 α durante a luteólise espontânea está associado ao aumento de ET-1, ANG-II e diminuição de P4 (SKARZYNSKI et al., 2003). De forma semelhante, a aplicação de análogos da PGF2 α leva ao aumento de ET-1 e ANG-II e diminuição de NOS no CL de bovinos (SCHAMS et al., 2003). A diminuição das concentrações de P4 é menos acentuada em animais que receberam a infusão do inibidor de NOS (L-NAME) e aplicação de PGF2 α comparado aos animais que receberam apenas PGF2 α (SKARZYNSKI et al., 2003). Evidenciou-se um sinergismo entre NOS e PGF2 α na modulação inicial da luteólise e diminuição das concentrações de P4. Desta forma, a diminuição de NOS e aumento de ET-1 e ANG-II são eventos necessários para o desencadeamento da luteólise estrutural.

As células de resposta imune tais como, macrófagos, monócitos e leucócitos migram e acumulam no CL durante a luteólise (PATE; KEYES, 2001). A proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) é uma quimiocina que tem elevada capacidade de atrair monócitos e linfócitos T. Esta quimiocina é bastante estudada na luteólise, revisada por Penny et al. (2000). A administração de concentrações luteolíticas de PGF2 α leva ao aumento de MCP-1 no CL de ovelhas. Porém neste mesmo

experimento, a expressão de MCP-1 no CL não diferiu ao longo do ciclo estral (HAWORTH et al., 1998). Contudo, evidenciou-se que o aumento de MCP-1 ocorre após a luteólise funcional, sugerindo que a MCP-1 tenha função de estimular a migração de macrófagos durante a luteólise estrutural de bovinos (PENNY et al., 1998). Posteriormente foi demonstrado que expressão de MCP-1 é aumentada no final do ciclo de bovinos (TOWNSON; O'CONNOR; PRU, 2002). Apesar das evidências da participação da MCP-1 na luteólise estrutural ainda não se sabe os mecanismos pelos quais a $PGF2\alpha$ está envolvida na síntese da MCP-1. Cavicchio et. al. (2002) verificaram que citocinas estimulam a síntese de MCP-1 nas células endoteliais do CL de fêmeas bovinas. As citocinas, fatores de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$) e interferon gama ($IFN\gamma$) são produzidos por células imunes e têm sido indicados como indutores do aumento de MCP-1 da regressão estrutural do CL (CAVICCHIO et al., 2002; (MIYAMOTO; SKARZYNSKI; OKUDA, 2000). Em estudos *in vivo* em vacas, utilizando sistema de microdiálise, verificou-se que o $TNF\alpha$ é liberado tanto na luteólise espontânea como na induzida por $PGF2\alpha$ (SHAW; BRITT, 1995). O $TNF\alpha$ foi indicado como o fator de “gatilho” para a luteólise (MIYAMOTO; SKARZYNSKI; OKUDA, 2000). Contudo, o aumento de $TNF\alpha$ ocorre no momento ou após a diminuição das concentrações de P4 (SHAW; BRITT, 1995). Assim, a função do $TNF\alpha$ como “gatilho” para o mecanismo luteolítico permanece contraditória. De fato as quimiocinas, citocinas e células de defesa participam do mecanismo de regressão estrutural. Porém, os mecanismos de controle da síntese das quimiocinas e citocinas ainda não estão estabelecidos.

Desta forma, a presença dos fatores angiogênicos e vasoativos tem importante papel no aporte do fluxo sanguíneo inicial, assim como, para a diminuição do fluxo sanguíneo nos processos finais da luteólise. As quimiocinas e citocinas contribuem para a migração de células imunes que são essenciais para a regressão estrutural. Sendo assim, apesar de grandes avanços científicos no conhecimento dos fatores envolvidos no desencadeamento da luteólise, são necessários mais estudos para esclarecer a interação e o mecanismo deste complexo conjunto de moléculas e seus produtos envolvidos na luteólise.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

O experimento foi realizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no Campus de Pirassununga/SP, Brasil. As práticas envolvendo os animais foram aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ-USP (CEUA Certificado nº 4638030915). A coleta dos materiais biológicos foi realizada em um período de três meses. Foram utilizadas fêmeas Nelore (*Bos taurus indicus*), não prenhez, sem bezerro ao pé, pluríparas, cíclicas, com escore de condição corporal entre 3 e 4, considerando a escala de 1 a 5 (1 muito magra e 5 obesa) (CHARETTE; BIGRAS-POULIN; MARTINEAU, 1996). As fêmeas permaneceram alojadas em piquetes com pastagem braquiária (*Brachiaria decumbens* cv. *Basilisk*) e foram suplementadas com silagem de cana-de-açúcar, concentrado e minerais de forma a atender as exigências de manutenção. Os animais receberam água *ad libitum*.

3.2 MANEJO REPRODUTIVO

Neste estudo 50 fêmeas da raça Nelore foram utilizadas. Para a utilização deste número total de fêmeas, as mesmas foram divididas em três replicatas experimentais. O intervalo entre a primeira e a segunda replicata foi de 3 semanas e o período entre a segunda e a terceira de 4 semanas. A sincronização das ovulações foi realizada pela inserção do dispositivo intravaginal de liberação de P4 (1g; Sincrogest; Ourofino®) e aplicação de 2mg IM de Benzoato de Estradiol (Sincrodiol, Ourofino®). Os dispositivos intravaginais de P4 foram mantidos por oito dias. Na retirada do dispositivo, foi realizada uma nova aplicação de 0,5mg de cloprostenol sódico (Sincrocio; Ourofino®, Cravinhos, Brazil) via intramuscular. Nesta ocasião foi realizada a fixação de um adesivo para identificação do estro (EstroTECT; Heat detector, AccuBreed™). Para a detecção dos estros foram

realizadas duas observações diárias (início da manhã e final da tarde). Nos períodos de detecção também observou-se o escore de marcação do adesivo para identificação do estro (1: fraca marcação = estro negativo; 2: marcação de metade do dispositivo = estro positivo; 3: dispositivo completamente marcado = estro positivo). Os animais que aceitaram a monta e que apresentaram escore do adesivo entre 2 e 3 foram considerados em estro. Utilizou-se neste estudo apenas os animais identificados em estro. O dia zero (D0) foi determinado como o dia do estro.

Figura 3 – Protocolo de sincronização e manejo dos animais

Fonte: (OLIVEIRA, M.L., 2017).

Legenda: O estro dos animais foi sincronizado pela inserção do dispositivo intravaginal de liberação de P4 (1 g; Sincrogest; Ourofino®) e aplicação de 2mg de benzoato de estradiol (BE; Sincrodiol, Ouro fino®). O dispositivo foi retirado após oito dias. Os animais receberam uma dose de PGF2α (0,5mg de cloprostenol sódico®) no momento da retirada do dispositivo. A identificação do estro foi realizada por escore de marcação do adesivo identificador de estro (Estrotech) e observação de estro por 4 dias (*; asteriscos verdes). O dia da identificação do estro foi determinado como D0. Diariamente foram realizadas coletas de sangue e imagens ultrassonográficas doppler entre D14 e D21 (*; asteriscos vermelhos). Quinze dias após a identificação do estro os animais foram divididos em grupos para receber o tratamento estradiol (6 mL de etanol 50%, 3mg de 17β-estradiol), placebo (6mL de etanol 50%, 0mg de 17β-estradiol) ou para não receber o tratamento (Controle). Entre os dias 14 e 21 foram realizadas avaliações ultrassonográficas com doppler e coleta de sangue.

3.3 AVALIAÇÕES ULTRASSONOGRÁFICAS

Para as avaliações ultrassonográficas utilizou-se o equipamento ultrassom Doppler acoplado à probe linear de 5 MHz modo-B (MyLab30 Vet Gold; Esaote Healthcare, Genova, Italy). Entre os dias -3 (D-3) e 4 (D4) os ovários foram avaliados diariamente, com o objetivo de identificar a presença de folículo dominante (FD; >7,5mm) e determinar a ovulação através do desaparecimento do FD. Entre o D14 ao D27, foram realizadas mensurações da área e fluxo sanguíneo do CL para determinar a % de animais com corpo lúteo ativo. Os corpos lúteos cavitários tiveram a área da cavidade subtraída da área total do CL (KASTELIC, 1990). A porcentagem de animais contendo CLs ativos foi definida por uma curva de sobrevivência baseada em parâmetros de luteólise estrutural. A luteólise estrutural foi definida pela avaliação das variáveis de área e fluxo sanguíneo do CL. O fluxo sanguíneo do CL foi mensurado pela % de pontos coloridos em relação à área do CL (GINTHER et al., 2007). Considerou-se luteólise estrutural e presença de CLs inativos, quando o CL atingiu valor de área inferior a 2 cm² e fluxo sanguíneo do CL menor ou igual a 25% (PUGLIESI et al., 2014). A luteólise funcional foi determinada no dia em que as concentrações de P4 atingiram valores inferiores a 50% da média das concentrações de P4 no dia 14 e 15 após o estro. As análises pertinentes a luteólise, falência estrutural e funcional do CL, foram realizadas em diferentes dias do ciclo estral, tendo como referência inicial o dia do estro (D0). Para as análises de variáveis contínuas como área, fluxo sanguíneo e concentração de P4, levou-se em consideração o dia do estro (D0).

3.4 TRATAMENTO *IN VIVO*

No dia do estro (D0) as vacas foram divididas aleatoriamente e equitativamente em três grupos experimentais: grupo controle (C), estradiol (E) ou placebo (P). Os tratamentos com estradiol ou placebo foram realizados no dia 15 após o estro (D15), às 08h00min. O tempo zero hora (0h) foi definido como o momento em que os animais receberam os tratamentos com placebo ou estradiol,

conforme ilustrado na Figura 4. Os tempos 4h e 7h correspondem ao período após o tratamento. Os animais do grupo estradiol receberam o tratamento intravenoso de 3mg de 17 β -estradiol (3mg de 17 β -estradiol diluído em 6mL de solução contendo 50% etanol; N=21), conforme estabelecido por Thatcher et al. (1986). Concomitantemente, os animais do grupo placebo receberam, via intravenosa, uma solução contendo 50% de etanol (P; 6mL de solução contendo 50% etanol; N=21). Ambos os grupos, estradiol e placebo, receberam o tratamento na veia jugular. Paralelamente, os animais do grupo controle não receberam tratamento (N=10). O momento do tratamento foi definido como o tempo zero hora (0h).

3.5 COLETA DE AMOSTRAS DE SANGUE

Para as mensurações das concentrações plasmáticas de P4 e para a identificação do momento da luteólise funcional, foram coletadas amostras diárias de sangue, de cada vaca, entre o D14 e D21 (Figura 3). Para a quantificação das concentrações plasmáticas de PGFM, no dia 15 após o estro, amostras de sangue foram obtidas por coleta seriada a cada hora do tempo 0 ao tempo 7 horas depois da aplicação do tratamento (Figura 4). Foram escolhidos 5 tempos de coleta para caracterização da liberação de PGFM por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Os tempos escolhidos para análise foram: 0h, 3h, 4h, 6h e 7h. As amostras de sangue foram coletadas por punção da veia jugular, aproximadamente 10mL/animal, com o uso de tubos contendo heparina. Imediatamente após a coleta, as amostras de sangue foram acondicionadas a 4°C. As amostras foram centrifugadas a 1500 g por 30 minutos a 4°C, para obtenção do plasma sanguíneo. O plasma removido do tubo foi imediatamente alíquotado em microtubos e armazenados a -20°C até o momento das análises de quantificação das concentrações P4 e PGFM.

Figura 4 – Modelo Experimental, tratamento e coleta de amostras de vacas de corte no dia 15 após o estro.

Fonte: (OLIVEIRA, M.L., 2017).

Legenda: O momento zero hora (0h) foi definido como o momento da administração dos tratamentos placebo e estradiol. O grupo placebo recebeu 6ml de etanol 50% IV (P; N=21), o grupo estradiol recebeu 3mg de 17 β -estradiol IV diluídos em 6ml de etanol 50% (E; N=21) e o grupo controle não recebeu tratamento (C; N=10). Os grupos placebo e estradiol foram divididos em subgrupos para a coleta de biópsia endometrial no tempo 4 horas ou 7 horas. Cada animal foi submetido à coleta de amostras de biópsias endometriais. As biópsias dos grupos Placebo e Estradiol foram coletadas nos tempos 4h (P4h; N=10 e E4h; N=11) ou 7h (P7h; N=11 e E7h; N=10). As amostras de biópsias do grupo controle foram coletadas apenas no tempo 0h (C; N=10). Amostras de sangue foram coletadas, em todos os grupos, simultaneamente nos tempos 0, 3, 4, 6 e 7 horas.

3.6 COLETA DE TECIDO ENDOMETRIAL POR BIÓPSIA

Para a obtenção das biópsias, os animais receberam anestesia epidural por aplicação de 0,06g de cloridrato de lidocaína (Lidovet, Bravet, Rio de Janeiro, Brasil)

As biópsias endometriais foram realizadas por via transcervical utilizando uma pinça de biópsia Forceps Yeoman (Hauptner, Solingen, Germany) (PUGLIESI et al., 2014). A coleta foi realizada no corno uterino ipsilateral ao ovário contendo o CL. Os tecidos coletados por biópsia apresentaram aproximadamente 4 mm x 4 mm. Cada vaca foi submetida à obtenção de dois fragmentos consecutivos de biópsia uterina em apenas um momento (0h, 4h ou 7h). O primeiro fragmento obtido foi armazenado em criotubo e conservado em nitrogênio líquido (-196°C) e posteriormente foi armazenado a -80°C, para análises de expressão gênica e proteica. O segundo fragmento foi armazenado em tubo contendo formalina tamponada (4%) para análise por Imuno-histoquímica. As biópsias uterinas dos animais que não receberam tratamento (grupo controle; C; N=10) foram coletadas apenas no momento 0h, após a primeira coleta de sangue. Já os animais que receberam tratamento com placebo ou estradiol tiveram as biópsias coletadas no tempo 4h (início do aumento de PGFM) ou 7h (máxima concentração de PGFM = pico) baseado em observações de Thatcher et al. (1986). Desta forma, o grupo estradiol (E; N=21) foi subdividido para a coleta de biópsias uterinas nos tempos 4h (EB-4h; N=11) ou 7h (EB-7h; N=10) após o tratamento. Da mesma forma, os animais tratados com placebo (P; n=21) foram subdivididos em subgrupos para coleta de biópsias nos tempos 4h (PB-4h; N=10) ou 7h (PB-7h; N=11).

3.7 MENSURAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE P4 POR RADIOIMUNOENSAIO

As concentrações de P4 foram mensuradas nas amostras usando um kit comercial (Coat-A-Count®; Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, USA), previamente validado para amostras de plasma bovino (Garbarino et al., 2004). Foram obtidos os coeficientes de variação alto (CA) e baixo (CB) tanto para variações intraensaio como interensaio. As variações intraensaio para o CA e CB foram de 7,78% e 0,21%; respectivamente. As variações interensaios foram de 7,46% e 5,38% para CA e CB; respectivamente.

3.8 QUANTIFICAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE PGFM POR ELISA

A quantificação de PGFM foi realizada nas amostras de plasma segundo a metodologia proposta por Ginther et al. (2010). Os padrões foram preparados utilizando-se 1mg PGFM (# catálogo N° 4143; PGFM Sigma-Aldrich Chemical Co.; MO), diluída em 200µl de dioxano (Fisher Cientific Fair Law, NJ), seguido pela adição de 5µL de tributilamina (Sigma Aldrich) e 2,6 µL de cloroformato de isobutil (Sigma Aldrich) e prosseguido pela incubação a 15°C por 1h. A horseradish peroxidase (HRP; 15mg; Tipo 1; Sigma Aldrich) foi preparada por uma solução com proporção de 1:1 de dioxano e 0,5% de bicarbonato de sódio para a obtenção de um volume final de 700µL. Os 200µL de solução contendo PGFM foram adicionados vagarosamente em 700µL da solução de HRP e incubados por 2 horas a 4°C para a preparação da solução PGFM-HRP. Plasma de bovino tratado com banamine, isento de PGFM, foi utilizado como matriz para diluição da curva padrão, onde utilizou-se a concentração de 19,5 a 10000 pg/mL de PGFM. Todas as amostras foram submetidas à extração. As amostras tiveram o pH ajustado para 3,0 e utilizou-se 2 mL de éter para extração, seguido por agitação em vórtex durante 1 minuto e evaporação durante a noite. Após a evaporação do éter, 250 µL de tampão foram adicionados a cada tubo, seguido por agitação em vórtex por 2 minutos e incubação por 1 hora em temperatura ambiente. O tampão carbonato de sódio (0,5 M; pH 9,6) foi utilizado para a diluição do anticorpo secundário (2µg/mL). A placa contendo anticorpo secundário permaneceu em incubação durante a noite. No dia seguinte foi preparado o tampão para o ensaio de ELISA, contendo: MOPS (0,04 M), cloreto de sódio (0,12 M), EDTA (0,01 M), Tween 20 (0,05%), digluconato de clorexidina (0,005%) em pH 7,4 e gelatina (0,1%) . Todos os poços da placa foram lavados com tampão de lavagem por três vezes. Diluiu-se o anticorpo primário (cedido gentilmente pelo Prof. Dr. W. W. Thatcher, University of Florida) em tampão de ensaio de ELISA (1:2000) que foi colocado em todos os poços, exceto *non specific binding* (NSB). A placa permaneceu sob incubação por 1,5 horas em temperatura ambiente. Após a incubação, lavou-se novamente a placa por 3 vezes com tampão de lavagem. Em seguida foram adicionados 100µL de amostras, controle e padrão e realizou-se incubação por 30 minutos. Em seguida, 50µL de PGFM-HRP foram

adicionados em cada poço da placa que foi mantida em temperatura ambiente e incubada por 1 hora. A placa foi lavada 4 vezes, posteriormente adicionou-se 125 µL de substrato colorimétrico (HRP) que permaneceu em incubação por 20 minutos a 37 °C. A reação da HRP determina a cor azul. Foi utilizado 50µL de solução contendo 0,5 M de ácido sulfúrico para cessar a reação. A densidade óptica foi quantificada por ondas com 450 e 600 nm de comprimento. Os valores CV intra e inter-ensaio foram de 3,99% e 9,75%, respectivamente.

3.9 EXPRESSÃO GÊNICA POR qPCR

A expressão gênica foi avaliada nos grupos C, P4h, P7h, E4h e E7h, utilizando um total de 6 vacas por grupo. A abundância de transcritos de nove genes (Quadro 1) foi avaliada nos grupos tratados com placebo (P4h e P7h) comparados aos grupos tratados com estradiol (E4h e E7h).

Para a extração de RNA, o tecido endometrial obtido pelas biópsias uterinas foi previamente macerado. Para isso, as biópsias foram submersas em nitrogênio líquido e maceradas segundo a metodologia descrita por Oliveira et al. (2015). Em seguida, foi realizada a extração de RNA das amostras utilizando-se “*AllPrep DNA/RNA Micro Kit*” (catálogo: 80204, Quiagen Laboratories, Valência, CA, Estados Unidos) de acordo com instruções do fabricante. As amostras de RNA foram tratadas com *DNase* (Cat. No. 12185, PureLink™ DNase, Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.) durante o procedimento de extração, conforme indicações do fabricante. O referido kit possibilitou a separação de RNA, DNA e proteína.

As amostras de RNA foram diluídas para obtenção 1µg de RNA/µL em um volume de 8 µL. Em seguida adicionou-se 1 µl de 10X *DNase I Reaction Buffer* e 1 µl de *DNase I, Amp Grade*, 1 U/ µl (Deoxyribonuclease I, Amplification Grade; Invitrogen Cat. No. 18068-015) chegando ao volume final de 10µL de amostra. Utilizou-se ‘*High Capacity cDNA Reverse Transcription*’ *Transcriptont kit*’ (Life Technologies™, Frederick, Maryland, USA) para o preparo de 10µL da solução *Master Mix* de Transcrição Reversa (RT) para cada amostra. Os 10µL de solução *Master Mix* de RT foram adicionados aos 10µL da solução contendo a amostra de RNA. A transcrição reversa foi realizada em termociclador com gradiente (Ref.

4375786; Thermal Cycler; Applied Biosystems). Todas as amostras contendo *Master Mix RT* foram submetidas com os seguintes ciclos de temperatura: 25°C (5 min), 37°C (120 min), 85°C (5min) e 4°C (aproximadamente 1 hora). Em seguida, as amostras foram armazenadas a -20°C.

Os *primers* utilizados foram obtidos da literatura científica ou desenhados por programa específico disponível *on-line* conforme descrito no Quadro 1. Os dois pares de *primers* que não foram obtidos na literatura foram desenhados pelo software *PrimerQuest* disponível no site *Integrated DNA Technologies* (IDT) (<http://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>). As sequências obtidas para todos os *primers* foram conferidas quanto a sua especificidade pela ferramenta *on-line BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Para a avaliação, foram utilizadas todas as sequências de primers descritas no Quadro 1.

A diluição dos primers foi realizada por adição de água *DEPC* (livre de nucleases) para obtenção de soluções de estoque com concentração de 100 mM. As soluções de trabalho com concentração de 20mM foram preparadas por diluição das soluções de estoque. Ambas soluções foram armazenadas a -20°C.

Cada poço da placa foi composto por 4µL de amostras de cDNA diluídas na proporção de 1:80. Tais amostras foram adicionadas a 16µL de solução *Master Mix* (Power SYBR® Green PCR Master Mix, Life Technologies Corporation, Frederick, Maryland, USA) contendo *primers* senso, anti-senso e água, totalizando volume final de 20µL. Para o controle negativo foi substituído a solução de 4,0 µL cDNA por 4,0 µL de água *DEPC*.

Utilizou-se o termociclador *Step One Plus™ Real Time System* (Applied Biosystems® Life Technologies Corporation, Frederick, Maryland, USA) para reações de polimerização em cadeia em tempo real (qPCR), com programação de ciclos de temperatura de 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Logo após a amplificação, a placa permaneceu a 95°C por 15 minutos, passando a 60°C por 1 minuto e voltando a 95°C por 15 minutos, para a obtenção da curva de dissociação (“melting”).

Quadro 1 - Nomenclatura, sequência dos primers forward (F) e reverse (R), identificação representativa (ID) e números de pares de bases (pb) dos produtos de PCR para cada gene testado.

Nomenclatura do Gene	Símbolo do Gene	Sequência 5'-3'	ID	PB
Aldo-ceto redutase família 1, membro B1 ^A	AKR1B1_F	ATACAAGCCGGCGGTAAAC	NM_001012519	188
	AKR1B1_R	TGTCTGCAATCGCTTTGATC		
Aldo-ceto redutase family1, member C4 ^B	AKR1C4_F	TCCTGTCCTGGGATTTGGAACCTT	NM_181027.2	166
	AKR1C4_R	ATCGGCAATCTTGCTTCGAATGG C		
Receptor de estrógeno 1 ^C	ESR1_F	CAGGCACATGAGCAACAAAG	NM_001001443.1	82
	ESR1_R	TCCAGCAGCAGGTCGTAGAG		
Receptor de estrógeno 2 ^D	ESR2_F	GTAGAGAGCCGCCATGAATAC	NM_174051.3	159
	ESR2_R	CAATGGATGGCTAAAGGAGAGA		
Receptor de ocitocina ^E	OXTR_F	AAGATGACCTTCATCGTCGTG	NM_174134.2	175
	OXTR_R	CGTGAAGAGCATGTAGATCCAG		
Peptidilpropil isomerase A (ciclofilina A) ^F	PPIA_F	GCCATGGAGCGCTTTGG	NM_178320.2	63
	PPIA_R	CCACAGTCAGCAATGGTGATCT		
Fosfolipase A2, grupo IV ^G	PLA2G4_F	GATGCCGCTGTCGCAGATCCTG	NM_001075864.1	96
	PLA2G4_R	TGTGAGGCCACTGTCCACCACAT		
Prostaglandina endoperoxído sintase 2 ^B	PTGS2_F	CCAGAGCTCTTCCTCCTGTG	NM_174445.2	161
	PTGS2_R	GGCAAAGAATGCAAACATCA		
Proteína quinase C alfa ^G	PRKCα_F	TGCAAAGGGCTGATGACCAAGCA	NM_174435.1	110
	PRKCα_R	AGCTTCTCCCAGTCGATCCTCCG		
Proteína quinase C Beta ^G	PRKCβ_F	GGGAGAGGAGAGCACCGTGCG	NM_174587.1	151
	PRKCβ_R	CTTCCCGAAGCCCCAGATGAAGT C		

Fonte: (OLIVEIRA; M.L.,2017).

Legenda: ^AUlbrich et al. 2009; ^BOliveira et al. 2015; ^CGonela et. al 2015; ^DMesquita et al., 2014; ^EKrishnaswamy et. al, 2009; ^FBettrgowda et al 2006; ^GPrimerQuest.

Cada primer foi testado em concentrações de 150 ou 300 nM para cada par de *primer* (senso e anti-senso), e quando necessário, concentrações maiores ou menores foram testadas. Cada concentração foi testada em duplicata e com um poço usado como controle negativo. A melhor concentração de primers foi escolhida com base na ausência de amplificação no controle negativo, único pico na curva de *melting* e menor ciclo limiar (*cycle threshold*; CT).

Depois de escolhida a concentração do primer, foi realizada uma curva padrão composta por cinco pontos de "*pool*" de cDNA diluído em série de 1:20 a 1:320. Cada ponto da curva foi testado em duplicata. A eficiência de amplificação foi calculada pela seguinte equação: $\text{Eficiência} = -1 + 10^{(-1/\text{inclinação})}$. Foram consideradas validadas as curvas padrão com eficiência entre 85 e 110% e coeficiente de determinação (R^2) próximo a 1, conforme descrito por Oliveira et al. (2015). Os dados referentes a validação de cada primer se encontram na Tabela 1.

Para as comparações de cada *amplicon*, avaliou-se as amostras com cDNA (N= 5 animais por grupo) e os controles negativos em triplicata. Foi utilizado o gene endógeno (ciclofilina) para a quantificação relativa de transcritos das amostras de cada vaca pelo método delta-delta CT ajustado para a eficiência de amplificação, segundo descrito por Pfaffl (2001).

Todos os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% para verificar se os produtos da reação de PCR continham aplicons únicos e com o peso molecular esperado. Os procedimentos utilizados na eletroforese e obtenção das imagens das bandas dos produtos de PCR foram realizados conforme Oliveira et al. (2012). Todos os primers utilizados foram considerados validados por apresentar *aplicons* únicos e com o peso molecular esperado na amostra positiva na altura e ausência de banda no controle negativo.

A concentração dos produtos de PCR purificados foi quantificada utilizando-se espectrofotômetro modelo *NanoVue* (GE Healthcare, Life Sciences, Freiburg, German) e em seguida foram purificados utilizando-se *kit QIAquick*® (PCR Purification Kit; Qiagen Laboratories, Valência, CA, Estados Unidos). Amostras de produtos de PCR (7,5 µL) contendo produtos de PCR purificados (concentração 10 ng/µL) e seus respectivos *primers* (5 µM; senso ou anti-senso) foram enviadas para o sequenciamento. O *software Chromas* (<http://technelysium.com.au/>) foi utilizado para a verificação da sequência de nucleotídeos. Cada sequência foi avaliada pelo

software *BLAST*. Os produtos de PCR cujas sequências foram correspondentes às dos transcritos-alvo específicos foram aprovados.

Tabela 1 - Características das reações de amplificações e da curva padrão para validação dos *primers*

Nomenclatura Gene	Gene	R ²	Eficiência Curva-padrão (%)
Aldo-ceto redutase, família1, membro B1	AKR1B1	1,00	93,9
Aldo-ceto redutase, família 1, membro C3	AKR1C3	0,94	102,2
Fosfolipase A2, grupo IV	PLA2G4	0,99	105,8
Peptidilpropil isomerase A (ciclofilina A)	PPIA	0,99	97,9
Prostaglandina endoperoxide sintase 2	PTGS2	0,97	100,8
Proteína quinase C alfa	PRKCA	0,98	97,2
Proteína quinase C beta	PRKCB	0,92	104,4
Receptor de estrógeno 1	ESR1	0,99	93, 5
Receptor de estrógeno 2	ESR2	1,00	98,3
Receptor de ocitocina	OXTR	0,99	103,5

Fonte: (OLIVEIRA, M. L., 2017).

3.10 EXPRESSÃO PROTEICA POR WESTERN BLOTTING

A quantificação da abundância proteica das enzimas PKC α e AKR1C3, ambas envolvidas na síntese de PGF2 α foi realizada nos grupos C, P4h, P7h, E4h e E7h pelo emprego da técnica de *Western Blotting*, utilizando-se três vacas por grupo. Os grupos tratados com placebo ou 17 β -estradiol foram comparados nos tempos 4 e 7 horas. Os tecidos endometriais, armazenados em nitrogênio líquido, foram macerados e imediatamente submetidos a extração de proteínas utilizando-se “*AllPrep DNA/RNA Micro Kit*” (catálogo: 80204, Quiagen Laboratories, Valência, CA, Estados Unidos) de acordo com instruções do fabricante. As amostras foram suspendidas em solução de SDS 10% (dodecil sulfato de sódio a 10%).

Para a análise da quantidade e integridade das proteínas, todos os extratos proteicos foram avaliados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% *SDS-PAGE*.

Os géis foram corados com *Comassie Blue 1%* para avaliação. Todas as amostras foram ranqueadas em ordem decrescente de acordo com o tamanho da banda de albumina observada no gel. Dentro de cada tratamento, as três amostras com maior banda de albumina foram escolhidas para as comparações.

Por incompatibilidade entre os reagentes no tampão de extração e os métodos de quantificação de proteína disponíveis, a concentração de proteína dos extratos proteicos não pode ser estimada. Assim, um volume fixo de extrato de cada amostra (15 µL) foi utilizado nas análises subsequentes. A 15µL de cada extrato proteico, adicionou-se 15µL de tampão da amostra, contendo 10% de β-mercaptoetanol (Laemmli Sample Buffer 4x; cat #161-0737; BIO RAD, Hercules, USA) que foram incubados a 95°C por 5min. As proteínas foram separadas por eletroforese em géis de poliacrilamida 10%. A cada gel, foi adicionado 6µL de padrão de peso molecular (Precision Plus Protein™, Dual Color Standards, Cat # 1610374, BIO RAD, Carlsbad, USA) no primeiro poço. Em seguida uma amostra de cada grupo foi colocada na seguinte sequência: C, P4h, P7h, E4h e E7h. No último poço do gel foi adicionado uma amostra de referência. A amostra de referência corresponde à amostra de *pool* de endométrio no dia 17, onde utilizou-se a mesma concentração em todos os géis. As corridas de todos os géis foram realizadas em cuba de eletroforese vertical com capacidade para quatro géis. Os géis foram submetidos a corrida de eletroforese sob campo elétrico de 140 volts (V), 400 Miliamperagem (mA) e 100 Watts (W) por 1h40min. Logo após o término da corrida, as proteínas do gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose. A transferência das proteínas para os géis foi realizada em aparelho de transferência semi-úmida (TE70X Semi-Dry Transfer Units, Hoefer, Holliston, EUA). Para a transferência, o campo elétrico foi controlado por fonte programada com 25V, 100mA, 100W, durante 1h30min. Após a transferência, as membranas foram lavadas em solução de Tampão Tris Salina contendo 1% de Tween 20 (TBS-T). Posteriormente, as membranas foram colocadas em solução de bloqueio (TBS-T diluído em solução de leite desnatado 5%) durante 1 hora.

Após o bloqueio, as membranas foram lavadas novamente com TBS-T e incubadas com anticorpo primário na diluição 1:1000 por 1h:30min, em temperatura ambiente. Os anticorpos primários utilizados foram anti-PKCα, 80 kDa (Cat # 0074203- 208, Santa Cruz, Paso Robles, USA) e anti-AKR1C3, 36 kDa (cat #84327; Abcam, Cambridge, USA). As especificações dos anticorpos estão informadas na

Tabela 2. Após a incubação com anticorpo primário, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com anticorpo secundário anti-coelho marcado com HRP na diluição 1:10.000. Novamente as membranas foram lavadas com TBS-T e em seguida foram incubadas com substrato *Enhanced chemiluminescence* (ECP; cat # 170-5060, Clarity Western ECL Substrate, Cambridge, USA) para reagir com substratos conjugados à HRP.

Tabela 2 - Especificações de marca, clonalidade, imunógeno, espécie que foi sintetizado, e concentração do produto de anticorpos adquiridos para a detecção das proteínas envolvidas na síntese de PGF2 α .

Proteína detectada	Nº de catálogo	Clonalidade	Imunógeno	Espécie	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
AKR1B1 ^{AB}	AB175394	Policlonal	Anti-AKR1B1 humano	Coelho	1000
AKR1C3 ^{AB}	AB84327	Policlonal	Anti-AKR1C3 humano	Coelho	500
COX-2 ^{SC}	SC-7951	Policlonal	Anti-COX-2 humano	Coelho	200
cPLA2 ^{SC}	SC-454	Monoclonal	Anti-CPLA2 humano	Camundongo	200
ER α ^{SC}	SC-787	Monoclonal	Anti-ER α bovino	Camundongo	200
OXTR ^{AB}	AB115664	Policlonal	Anti-OXTR humano	Coelho	20
PGR ^{BC}	PNIM1546	Monoclonal	Anti-PGR humano	Camundongo	100
P-PKC α ^{SC}	SC-377565	Monoclonal	Anti-P-PKC- α humano	Camundongo	200
PKC- γ ^{SC}	SC-211	Policlonal	Anti-PKC- γ camundongo	Coelho	200

Fonte: (OLIVEIRA, M.L., 2017).

Legenda: ^{AB} Anticorpos da Marca Abcam, ^{SC} Anticorpos da marca Santa Cruz, ^{BC} Anticorpos da marca Beckman Coulter.

O anticorpo monoclonal anti-beta-actina conjugado à peroxidase (A3854; Sigma Aldrich, St Louis, EUA) na diluição 1:200.000, sintetizado em camundongo, foi utilizado como controle endógeno. A utilização de anticorpo conjugado elimina a necessidade de incubação com anticorpo secundário. Desta forma, o procedimento

da corrida dos géis, transferência e bloqueio foi o mesmo realizado nos demais anticorpos, porém não é realizada incubação com anticorpo secundário.

A detecção das bandas foi realizada no aparelho *Chemi Doc™ Imaging System* (170-8280; Bio-Rad Laboratories), que permite o adequado posicionamento da membrana e a otimização da obtenção dos dados. O peso das bandas em kilodaltons (Kd) foi determinado pela localização da banda na membrana, tendo como base a marcação das bandas do padrão de peso molecular (PPM). A densidade óptica das imagens obtidas foram analisadas *por software Image Lab 5.2* (Bio-Rad Laboratories). A amostra referência sempre apresentou a banda de maior densidade óptica. A mesma área de densidade óptica da amostra de referência foi utilizada para detecção da densidade óptica dos demais *blots*. O valor da densidade óptica de cada animal foi ajustado pela amostra de referência (densidade de cada animal foi dividido pela densidade óptica da amostra de referência). Posteriormente, a densidade óptica de cada animal foi dividida pela densidade óptica de beta-actina, nas respectivas amostras. As diferenças entre os grupos foram avaliadas com base na média da densidade óptica dos animais de cada grupo.

3.11 LOCALIZAÇÃO PROTEICA POR IMUNO-HISTOQUÍMICA

Utilizou-se a técnica de imuno-histoquímica para fazer a localização e semi-quantificação da abundância de proteínas específicas relacionadas com a sinalização e síntese de PGF2 α . Análises de imuno-histoquímica foram realizadas em amostras de biópsia obtidas no dia 15 do ciclo estral nos grupos C, P4h, E4h, P7h e E7h.

Tecidos endometriais coletados por biópsia foram fixados em formalina tamponada (4%) durante 24 horas. Posteriormente, os tecidos foram transferidos para cassetes de plástico onde foram desidratados em concentrações crescentes de etanol e xilol. Em seguida a parafina líquida foi colocada em moldes dos blocos e as amostras das biópsias foram introduzidas e orientadas na parafina. Os blocos sólidos foram armazenados em temperatura ambiente até o preparo das lâminas. Os tecidos incluídos em blocos de parafina foram cortados com auxílio de um micrótomo. Foram realizados cortes de 5 μ m de espessura e montados em lâminas

silanizadas (Star Frost, Knittel Glass, Braunschweig, Germany). Os cortes permaneceram em uma estufa a 45°C por uma hora e foram desparafinizados em xilol e reidratados em uma série de diluições crescentes de etanol. Posteriormente, foi realizada a etapa de recuperação dos antígenos, para melhor exposição dos epítomos. Utilizou-se tampão citrato 10nM (pH 6,0) por 5 ciclos de 5 min no micro-ondas como método padrão para recuperação de antígenos. Foi necessária etapa adicional para recuperação antigênica apenas para o anticorpo COX-2. Nesse caso, as lâminas ficaram submersas em solução de ácido clorídrico (HCl 29%) em banho maria a 38°C durante 20 min. Logo após a recuperação antigênica, as lâminas foram lavadas 3 vezes em tampão fosfato-salino com Triton (PBS-Triton; PBS 1M; 0,3% de Triton; pH 7,4). A seguir, realizou-se o bloqueio da atividade da peroxidase endógena por tratamento dos tecidos com quantidades saturantes de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ao submergir os tecidos em 250mL de solução de metanol contendo 3mL H₂O₂, sob agitação, durante 30 min seguido de lavagem tripla em PBS-Triton. O bloqueio de marcação inespecífica foi realizado por imersão dos tecidos em solução de leite desnatado 1% em câmara úmida, durante 15 min. As informações das características dos anticorpos, fabricante e as concentrações de validação dos anticorpos estão ilustradas na Tabela 2. Após o bloqueio, os cortes de tecido foram incubados com o anticorpo primário durante toda a noite, em câmara úmida a 4°C. Os controles negativos foram preparados por soros de IgG da mesma espécie do anticorpo primário utilizado e na mesma concentração, para avaliar a especificidade da marcação antígeno-anticorpo. Foram utilizados anticorpos secundários marcados com *horseradish peroxidase* (HRP). No dia seguinte, os tecidos foram submetidos a três lavagens com PBS-Triton e incubados com a Solução Universal Biotinylated Link (DK0690, Dako) em câmara úmida à temperatura ambiente durante 15 minutos. As lâminas foram lavadas novamente com PBS-Triton e incubadas com o complexo Estreptavidina-peroxidase (Streptavidin-HRP, K0690, DAKO) em câmara úmida a temperatura ambiente, durante 15 minutos. Em seguida, os tecidos foram incubados com o corante 3,3'-diaminobenzidina tetracloreto (DAB, K3468, DAKO) por 5 minutos. Posteriormente os tecidos foram lavados três vezes em água destilada e finalmente as amostras foram contra-coradas com hematoxilina, lavadas em água corrente por 10 min, desidratadas em diluições decrescentes de etanol e clareadas em xilol antes de serem montadas as lamínulas. As imagens foram obtidas por câmera acoplada ao

microscópio vertical (Nikon Eclipse Ni-U 80i). As imagens dos tecidos foram julgadas por três avaliadores que não conheciam a origem dos tratamentos das imagens avaliadas. O padrão para avaliação da intensidade de marcação utilizou escore de 0 a 3 (0 = sem marcação, 1 = marcação fraca, 2 = marcação mediana e 3 = marcação forte). A moda da intensidade de marcação dos três avaliadores foi utilizada para as análises estatísticas.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o SAS (versão 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) considerando a vaca como unidade experimental e um delineamento inteiramente casualizado.

As variáveis dependentes contínuas (área e fluxo do CL, concentrações de PGFM e P4) foram analisadas como medidas repetidas no tempo utilizando o PROC MIXED e o comando REPEATED. Primeiramente, se determinou o efeito da administração de Placebo, isto é, etanol 50%, sobre essas variáveis. Para isso, consideraram-se como efeito fixo, as variáveis independentes: grupo (controle, placebo + biópsia às 4h e placebo + biópsia às 7h), dia (dias da coleta) e sua interação. O efeito aleatório de vaca dentro de grupo foi utilizado como erro termo para se determinar o efeito Placebo. Depois disso, para análise do efeito da administração de 17β -estradiol considerou-se como efeito fixo um arranjo fatorial de tratamentos: tratamento (administração de placebo ou 17β -estradiol), momento da biópsia (biópsia às 4h ou 7h), dia e todas as interações possíveis. O efeito aleatório de vaca dentro da interação tratamento*biópsia foi utilizado como erro termo para se determinar o efeito da administração do 17β -estradiol. Em ambos os modelos avaliou-se as estruturas de variância-covariância CS, CSH, UN (1), TOEP, AR(1), VC, TOEP(2), ARH(1), ARMA(1,1), FA(1), HF, ANTE (1), TOEPH e UNR. Dentre todas testadas, selecionou-se aquela com o menor valor do critério de informação corrigido de Akaike (AICC). A premissa de normalidade do resíduo foi checada pelos gráficos de diagnóstico do PROC MIXED e pelo teste Shapiro-Wilk do PROC UNIVARIATE utilizando o resíduo estudentizado (output do PROC MIXED). Todas as variáveis analisadas atenderam a premissa.

A variável dependente contínua momento da luteólise (estrutural e funcional) foi analisada utilizando o PROC MIXED. Primeiramente foi realizada a análise do efeito placebo. Para análise do efeito do tratamento com 17β -estradiol, considerou-se no modelo como efeito fixo as variáveis, tratamento, momento da biópsia e sua interação (fatorial 2 X 2). As premissas foram checadas e quando necessário às variâncias residuais foram modeladas ou os dados foram transformados. Adicionalmente, os dados de luteólise estrutural foram selecionados para análise de distribuição do momento da luteólise. Para isso, foi feita uma análise de curva de sobrevivência utilizando PROC LIFETEST para estabelecer o efeito dos grupos controle, estradiol e placebo sobre a incidência de luteólise entre os dias 15 e 27. Desconsiderou-se o efeito biópsia nessa análise, porque este fator não afetou o momento da luteólise. As curvas de sobrevivência foram comparadas pelo teste de Wilcoxon utilizando o ajuste Sidak.

As variáveis dependentes contínuas abundâncias de transcritos e proteica foram analisadas utilizando o PROC MIXED. Na análise do efeito Placebo, considerou-se a variável grupo (2 graus de liberdade; GL) como efeito fixo. Houve efeito de grupo para quatro genes e uma proteína. Comparado ao grupo Controle, a administração de etanol 50% causou distintos estímulos nas amostras coletadas por biópsia as 4 e 7 horas. Por causa desses efeitos, a análise do efeito do 17β -estradiol utilizando um modelo fatorial 2 x 2 (fator 1: tratamento e fator 2: momento da biópsia) foi descartada, pois poderia haver confundimentos na interpretações das interações. Portanto, foram feitas duas análises, uma para o momento 4h e outra para o momento 7h. Para ambas as análises considerou-se como efeito fixo apenas a variável tratamento (1 GL; placebo ou 17β -estradiol). O grupo controle foi utilizado como normalizador para todos os genes e proteína. Dessa forma, para cada gene ou proteína, a média da abundância do grupo Controle foi subtraída da abundância de cada vaca. As premissas de normalidade do resíduo e homogeneidade das variâncias, teste de Levene do PROC GLM, foram checadas. Quando não atendidas, as variâncias residuais eram primeiramente modeladas utilizando a opção GROUP=Tratamento do comando REPEATED. Logo após, procedia-se a checagem do AICC, quanto menor melhor, e das premissas. Persistindo o problema, os dados eram transformados utilizando Log, raiz quadrada e inversa, sendo então reanalisados.

A opção Kenward-Roger de ajuste dos graus de liberdade do denominador foi incorporada em todos os modelos do PROC MIXED. Os efeitos das variáveis independentes no PROC MIXED foram determinados pelo teste F utilizando a soma de quadrados tipo III. Quando necessário, as médias entre os tratamentos foram comparadas utilizando o Teste T protegido (opção DIFF do comando LSMEANS) e o comando slice foi adicionado ao procedimento, para identificar o efeito de tratamento em momentos específicos. Os resultados foram reportados como LSMEANS $\pm$ EPM. Em todos os casos uma probabilidade $\leq 0,05$ indicou que a diferença foi significativa e entre $0,05 > P \leq 0,10$ indicou tendência para diferença ser significativa.

A análise dos escores de marcação pela técnica de imuno-histoquímica foi executada pelo PROC NPAR1WAY utilizando o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Os dados foram reportados por medianas, atribuídas por três diferentes avaliadores. Primeiramente, foi analisado o efeito do placebo. Subsequentemente, foram feitas duas análises para avaliar o efeito do 17β -estradiol, uma no momento 4h e outra 7h.

A análise multivariada fatorial foi realizada pelo programa Minitab. Buscou-se com essa análise descrever a estrutura de dependência existente entre o conjunto de genes avaliados pela criação de 2 fatores (não observados) capazes de determinar construtos (combinação de vários fatores) representativos de cada tratamento.

4. RESULTADOS

4.1 REGRESSÃO LUTEÍNICA

4.1.1 Momento da luteólise funcional e estrutural

Neste estudo, o 17β -estradiol foi administrado com a expectativa de estimular e antecipar a regressão luteal, tanto funcional como estrutural. De acordo com o esperado, o dia da luteólise, estrutural e funcional, foi antecipado no grupo estradiol quando comparado aos grupos placebo e controle (Tabela 3; $P < 0,05$). O grupo tratado com estradiol apresentou uma antecipação na luteólise funcional em 2,5 dias comparado ao grupo placebo e 2,2 dias comparado ao controle. O grupo estradiol também apresentou luteólise estrutural antecipada em relação aos grupos placebo e controle, em aproximadamente 2,4 dias e 3 dias respectivamente (Tabela 3; $P < 0,05$).

Tabela 3 – Dia da luteólise estrutural e luteólise funcional em vacas tratadas com 17β -estradiol (E) placebo (P) e não tratadas controle (C) no dia 15 após o estro (média $\pm$ EPM).

Grupos	Controle (N)	Placebo (N)	Estradiol (N)
Luteólise Funcional ^{LF}	20 $\pm$ 0,87 ^B (7)	20,35 $\pm$ 0,53 ^B (13)	17,80 $\pm$ 0,43 ^A (18)
Luteólise Estrutural ^{LE}	21,78 $\pm$ 0,9 ^B (10)	21,11 $\pm$ 0,7 ^B (21)	18,71 $\pm$ 0,3 ^A (21)

Fonte: (OLIVEIRA, M.L., 2017).

Legenda: Diferentes letras maiúsculas sobrescritas correspondem a diferenças significativas ($P > 0,05$) do dia da luteólise estrutural e funcional entre os grupos Estradiol, Placebo e Controle. Diferenças encontradas por ANOVA (LSMeans; DiFF).

^{LF}: Dia do ciclo estral em que as concentrações de P4 atingiram valores inferiores a 50% da concentração mensurada no dia 14 e 15.

^{LE}: Dia do ciclo em que a área do CL foi menor que 2 cm² e o fluxo sanguíneo foi $\leq$ 25 % (mensurado pela quantidade de pontos coloridos do CL em imagens obtidas por ultrassonografia doppler).

4.1.2 Área do corpo lúteo

Houve efeito de tratamento, dia e interação tratamento por dia para a área do CL. Para os grupos P e E houve diminuição progressiva da área do CL do D15 ao D20. Quando comparado ao grupo placebo, o grupo estradiol apresentou acentuada diminuição da área de CL entre os dias 18 e 20 (Gráfico 1 A; $P < 0,05$).

4.1.3 Fluxo sanguíneo no corpo lúteo

As probabilidades para efeito de tratamento, dia e interação entre tratamento e dia foram significativas para a variável fluxo sanguíneo no CL. O fluxo sanguíneo do CL no grupo estradiol e placebo foram semelhantes no dia 15 (Gráfico 1 B; $P > 0,05$). Entretanto, do dia 16 ao 20 o grupo estradiol apresentou menor fluxo sanguíneo comparado ao controle e placebo (Gráfico 1 B; $P < 0,05$). Adicionalmente, no dia 20 nenhum dos animais tratados com estradiol estava com CL ativo (Gráfico 2; $P > 0,01$).

4.1.4 Concentrações plasmáticas de P4

As análises de luteólise funcional levam em consideração as concentrações plasmáticas de P4. As probabilidades para efeito de tratamento, dia e interação entre tratamento e dia foram significativas nas análises das concentrações de P4. Entre D16 e D20, os grupos placebo e estradiol apresentaram um decréscimo progressivo nas concentrações de P4, sendo significativamente mais acentuado no grupo estradiol (Gráfico 1 C; $P > 0,01$). Desta forma, verificou-se que os animais tratados com estradiol apresentam luteólise estrutural e funcional antecipada comparada ao grupo placebo (Gráfico 1; $P < 0,01$).

Gráfico 1 – Área do CL (cm^2), porcentagem da área do CL com sinais coloridos do fluxo sanguíneo (%) avaliado por ultrassonografia com doppler e concentrações plasmáticas de P4 (ng/mL) nos diferentes dias do ciclo estral para os diferentes tratamentos, considerando a administração dos tratamentos no D15.

Legenda: Luteólise estrutural determinada através da mensuração da área do corpo lúteo (CL) em cm^2 (A) e porcentagem da área luteal com sinais coloridos do fluxo sanguíneo (B); média ($\pm$ EPM) de vacas que foram tratadas com placebo (P; 6mL de etanol 50%; N=21) ou estradiol (E; 6mL de etanol 50% + 3mg de 17β -estradiol; N=21) ou não tratadas (C; N=10) no dia 15 pós-estro. Luteólise funcional determinada pela concentração de progesterona, média ($\pm$ EPM) de vacas que foram tratadas com placebo (P; 6mL de etanol 50%; N=13) ou estradiol (E; 6mL de etanol 50% + 3mg de 17β -estradiol; N=18) ou não tratadas (C; N=10) no dia 15 pós-estro. Os efeitos principais de tratamento, dia e da interação tratamento e dia foram indicados.

* $P < 0,05$ diferenças significativas entre as médias dos grupos.

** $P < 0,01$ diferenças significativas entre as médias dos grupos.

$0,05 < P < 0,10$ tendência diferenças significativas entre as médias dos grupos.

Gráfico 2 – Proporção de corpo lúteo ativo (%) nos diferentes dias após o estro nos grupos controle (C), placebo (P) e estradiol (E).

Legenda: Porcentagem de vacas com CL ativo nos grupos tratados com Placebo (P; N=21), 17 β -estradiol (E; N=21) e não tratadas (C; N=10) durante o ciclo estral.

4.2 CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE PGFM

As concentrações de PGFM foram mensuradas nos tempos 0, 3, 4, 6 e 7 horas, em amostras de plasma sanguíneo dos grupos C, P4h, P7h, E4h e E7h. Tal mensuração teve como objetivo verificar se o tratamento com estradiol estimularia a liberação de PGFM na circulação sistêmica. Primeiramente, avaliou-se a ação da solução de etanol 50% administrada nos grupos placebo (P4h e P7h) na liberação de PGFM. Para tanto, os grupos P4h e P7h foram comparados ao grupo controle. Em relação à hora 0, os grupos controle e P4h apresentaram aumento na concentração de PGFM de aproximadamente 20pg/mL para valores discretos próximos a 40pg/mL ($P < 0,001$; Gráfico 3 A). No grupo controle houve aumento significativo da concentração de PGFM nos tempos 3h e 4h, seguido pela diminuição nos tempos 6h e 7h ($P < 0,001$; Gráfico 3 A). Também houve estímulo na liberação de PGFM no grupo P4h, que apresentou pico no tempo 6h e diminuição no 7h ($P < 0,01$;

Gráfico 3 A). Não houve estímulo na liberação de PGFM no grupo P7h, permanecendo as concentrações basais, por volta de 20pg/mL em todas as avaliações ($P>0,001$ Gráfico 3 A). Desta forma, verificou-se que o etanol 50% não estimulou o aumento de PGFM no grupo P7h. Porém, o aumento da concentração de PGFM tanto no grupo C como no grupo P4h ocorreu após o momento da realização da biópsia, nos tempos 0h e 4h, respectivamente.

Não foi possível verificar aumento nas concentrações de PGFM após a realização da biópsia do grupo P7h, pois a última coleta de sangue foi realizada no momento 7h. Desta forma, os resultados comprovam a ausência de estímulo do etanol 50% na liberação de PGFM. Paralelamente, pode-se inferir que o estímulo nas concentrações de PGFM dos grupos C e P4h provavelmente resultam do procedimento de coleta de biópsias nos tempos 0 e 4h, respectivamente (Gráfico 3 A).

Em virtude do aumento nas concentrações de PGFM nos grupos C e P4h após a coleta de biópsias, compararam-se as concentrações de PGFM entre os animais que tiveram a biópsia realizada no tempo 4h (B4h) com as dos animais que tiveram a biópsia realizada no tempo 7h (B7h). Assim, para avaliação de B4h foram agrupados os dados de concentração de PGFM de animais dos grupos P4h e E4h e o grupo B7h reuniu a quantificação de PGFM dos grupos P7h e E7h. O grupo de animais B4h apresentou maior estímulo de PGFM comparado ao grupo B7h ($P<0,001$; Gráfico 3 B). Por fim, avaliou-se se o tratamento com estradiol estimulou a liberação de PGFM na circulação sistêmica. Desta forma, foram comparados os animais que receberam placebo (P; P4h e P7h) vs. animais que receberam 17 β -estradiol (E; E4h e E7h). Como esperado, o grupo E apresentou maior estímulo na liberação de PGFM comparado ao grupo P ($P<0,01$; Gráfico 3 C). O grupo E apresentou aumento da concentração de PGFM no tempo 4h e atingiu pico 6h após a administração de 17 β -estradiol ($P<0,01$; Gráfico 3 C). Comparado ao grupo controle, o tratamento com 17 β -estradiol aumentou 38,3% no tempo 4h e chegou ao máximo aumento no tempo 6h, 119,83%. O aumento de PGFM no grupo P foi discreto comparado ao grupo E, e não significativo ($P>0,05$; Gráfico 3 C).

Gráfico 3 – Concentrações plasmáticas temporais de PGFM na circulação sistêmica (pg/mL) de vacas no dia 15 após o estro, após o tratamento para os diferentes grupos.

Legenda: Média ($\pm$ EPM) da concentração plasmática de PGFM nos tempos 0, 3, 4, 6 e 7h em vacas que foram tratadas com placebo (P; 6mL de etanol 50%; N=20) estradiol (E; 6mL de etanol e 3mg 17 β -estradiol; 21), ou não tratados (C; Controle; 9). A) Liberação de PGFM no grupo controle (C; N= 9) e placebo (P4h; N=10 e P7h; N=10) após o tratamento. B) Liberação de PGFM em vacas submetidas à biópsia nas horas 4 (B4h; N=20) ou 7 (B7h; N=21). C) Liberação de PGFM em animais tratados com estradiol (E; N=21) ou placebo (P; N=20).

Letras minúsculas diferentes (a; b) diferenças significativas ($P < 0,001$) entre os grupos. Letra y corresponde a tendência ($0,05 < P < 0,10$) para diferença entre os grupos.

* $P < 0,01$ diferenças significativas entre as médias dos grupos.

** $P < 0,001$ diferenças significativas entre as médias dos grupos.

4.3 ABUNDÂNCIA DE RNAm

A expressão relativa de nove genes foi comparada entre os grupos placebo e estradiol nos tempos 4 horas e 7 horas. Visto que o etanol 50% administrado no grupo placebo (P4h) não estimulou a liberação de PGFM ($P > 0,001$; Gráfico 3 A), também era esperada a ausência do efeito do placebo na expressão gênica. Assim, foram realizadas comparações entre o grupo controle (C) e placebo (P4h e P7h) para identificar se houve efeito do etanol 50% na abundância de transcritos de todos os genes alvo estudados.

Desta forma, verificou-se que dos nove genes alvo estudados, houve efeito do etanol 50% (placebo) na expressão de quatro genes: ESR1, ESR2, PRKC β e PTGS2. Foi observado que o efeito do etanol 50% na modulação da expressão gênica aconteceu de maneira distinta entre os grupos P4h e P7h. Assim sendo, a abundância dos transcritos ESR1 foi aumentada no grupo P4h ($P < 0,05$; Gráfico 4). e diminuída no P7h ($P < 0,05$; Gráfico 4), comparadas ao grupo C. Enquanto o ESR2 apresentou menor abundância de transcritos em ambos os grupos P4h ($P < 0,05$; Gráfico 4) e P7h ($P < 0,01$; Gráfico 4), em relação ao grupo C. Tanto os transcritos de PRKC β como os de COX2 apresentaram maior abundância no grupo P4h ($P < 0,05$; Gráfico 4) comparado ao grupo C, e não houve diferenças entre o grupo C e P7h ($P > 0,05$; Gráfico 4). Devido ao inesperado efeito do etanol 50% na expressão desses 4 genes, o efeito de tratamento (placebo vs. estradiol) foi testado independentemente nos tempos 4 horas e 7 horas.

O momento 4 horas após a administração de estradiol é caracterizado pelo início do aumento das concentrações de PGFM. Enquanto o momento 7 horas é determinado como o momento de máxima concentração de PGFM. A liberação temporal de PGFM por aplicação de 17 β -estradiol determinou momento da coleta das biópsias nos tempos 4h e 7h após o tratamento com Estradiol e Placebo. Assim, a expressão gênica de nove genes foi avaliada em tecidos endometriais coletados 4 horas após administração de 17 β -estradiol ou placebo, especialmente para comparações entre E4h e P4h. Os mesmos genes também foram avaliados em amostras de tecido endometrial coletadas no tempo 7h, com a finalidade de comparar os grupos E7h e P7h.

Para que o estradiol exerça seus efeitos é essencial a presença dos seus receptores ESR1 e ESR2. A expressão de ESR1 foi diminuída tanto no grupo E4h e no grupo E7h comparado ao grupo placebo P4h ($P<0,0001$; Gráfico 5) e P7h ($P<0,05$; Gráfico 5), respectivamente. Semelhante aos efeitos encontrados do E2 na expressão de ESR1, a expressão de ESR2 também foi reduzida no grupo E4h comparado ao grupo P4h ($P<0,0001$; Gráfico 5). Porém, houve tendência para diminuição da expressão de ESR2 no grupo E7h em relação ao grupo P7h ($P=0,08$; Gráfico 5). De forma geral, o efeito do E2 na redução dos seus receptores está de acordo com o esperado, visto que hormônios esteroides em elevadas concentrações possuem a função de regular seus próprios receptores.

Gráfico 4 – Abundância de transcritos de componentes moleculares envolvidos na síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em vacas durante a fase luteínica (D15) do ciclo estral nos grupos controle C e Placebo (4h e 7h).

Legenda: Abundância de transcritos para ESR1, ESR2, PRKCβ e PTGS2 em relação ao gene endógeno (PPIA). Média ($\pm$ EPM) da expressão gênica em vacas que foram tratadas com placebo (P4h e P7h; 6mL de etanol 50 %; N=6 / grupo) ou não tratadas (C; Controle). Foram consideradas diferenças significativas para valor de $P<0,05$.

O receptor de ocitocina é componente essencial para estimular a cascata de síntese de PGF2 α durante a luteólise de ruminantes. Os transcritos de OXTR foram aumentados no grupo E4h comparado ao grupo P4h ($P < 0,05$; Gráfico 5). Contudo, não houve diferença na expressão gênica de OXTR 7 horas após o tratamento, ou seja, a abundância de transcritos de OXTR não diferiu entre os grupos E7h e P7h ($P > 0,05$; Gráfico 5). O estímulo da expressão de OXTR observado no tempo 4h era aguardado, pois é conhecido que o estradiol estimula a expressão de OXTR.

As proteínas quinases são enzimas sinalizadoras de respostas celulares que são ativadas via proteína G, por estímulo de OXTR, para a síntese de PGF2 α . Devido ao potencial do E2 em estimular a liberação de PGFM, nossa hipótese era o E2 levasse ao aumento dos transcritos de proteínas envolvidas na sinalização e síntese de PGF2 α . Contudo, a PRKC α apresentou redução da abundância dos transcritos nos grupos E4h e E7h, comparado aos grupos P4h e P7h ($P < 0,01$; Gráfico 6). Da mesma forma, os grupos E4h e E7h apresentaram menor abundância dos transcritos de PRKC β que nos grupos P4h e P7h ($P < 0,01$; Gráfico 6), respectivamente. Contrário ao esperado, as enzimas PKC α e PKC β apresentaram redução da abundância de transcritos nos grupos tratados com 17 β -estradiol em comparação com grupos tratados com placebo ($P < 0,01$; Gráfico 6).

Do mesmo modo, esperávamos que o estradiol levasse ao aumento da expressão de enzimas envolvidas na síntese de PGF2 α (PLA2G4, PTGS2, AKR1B1 e AKR1C4). A PLA2 e PTGS2 são essenciais para a liberação e conversão de AA, principal precursor das prostaglandinas. Os transcritos de PLA2G4 foram reduzidos no grupo E4h comparado ao grupo P4h ($P < 0,001$; Gráfico 6). Contudo, não houve diferenças na expressão gênica de PLA2G4 entre os grupos E7h e P7h ($P > 0,05$; Gráfico 6). Não houve diferença na abundância de PTGS2 entre os grupos E4h vs. P4h e E7h vs. P7h. Ambas PGFS apresentaram o mesmo perfil de expressão gênica nos tempos 4h e 7h. Sendo assim, as principais enzimas sintases de PGF2 α , AKR1B1 e AKR1C4, apresentaram diminuição significativa na abundância dos seus respectivos transcritos nos grupos E4h e E7h, comparado aos grupos que receberam placebo P4h ($P < 0,01$; Gráfico 6) e P7h ($P < 0,05$; Gráfico 6). De maneira abrangente, o 17 β -estradiol levou a redução de ambas as enzimas de síntese de PGF2 α , exceto de PTGS2.

Gráfico 5 – Abundância de transcritos de receptores endometriais envolvidos na síntese de PGF2 α em vacas durante a fase luteínica (D15) do ciclo estral nos grupos placebo (P4h e P7h) e estradiol (E4h e E7h).

Legenda: Abundância de transcritos ESR1, ESR2 e OXTR, calculada pela expressão relativa ao gene endógeno (PPIA) e ajustada à expressão do grupo controle. As barras indicam a média ($\pm$ EPM). Diferenças entre as médias dos grupos placebo e estradiol são mostradas nos tempos 4 e 7 horas após o tratamento (N=6 / grupo).

* $P < 0,05$ diferenças significativas entre as médias dos grupos.

** $P < 0,0001$ diferenças significativas entre as médias dos grupos.

$0,05 < P < 0,10$ tendência diferenças significativas entre as médias dos grupos.

Gráfico 6 – Abundância de transcritos de enzimas envolvidas na síntese de PGF2 α em vacas durante a fase luteínica (D15) do ciclo estral nos grupos placebo (P4h e P7h) e estradiol (E4h e E7h)

Legenda: Abundância de transcritos de PKC α , PKC β , PLA2G4, PTGS2, AKR1B1 e AKR1C4, calculada pela expressão relativa ao gene endógeno (PPIA) e ajustada à expressão do grupo controle. As Barras indicam a média e erro padrão da média ($M \pm EPM$), respectivamente. Diferenças as médias do placebo e estradiol são mostradas nos tempos 4 e 7 horas após o tratamento (N=6 / grupo).

* $P < 0,05$ diferenças significativas entre as médias dos grupos.

** $P < 0,01$ diferenças significativas entre as médias dos grupos

A mensuração da abundância de transcritos dos nove genes possibilitou a realização da análise multivariada, observando-se a nítida separação dos grupos. O grupo estradiol está agrupado nos quadrantes do lado esquerdo, enquanto os grupos placebo e controle encontram-se nos quadrantes localizados do lado direito (Figura 7).

Figura 5 – Separação dos animais por análise multivariada fatorial da expressão gênica dos grupos Controle (C), Placebo (P4h e 7h) e Estradiol (E4h e E7h).

Legenda: Separação dos grupos por expressão gênica do tecido endometrial no dia 15 do ciclo estral de animais tratados com placebo (ponto preto; P4h, N=6 e P7h, N=6), estradiol (ponto cinza; E4, N=6 e E7h, N=6) e controle (ponto branco; C).

4.4 ABUNDÂNCIA PROTEICA

Duas enzimas envolvidas na sinalização e síntese de $\text{PGF2}\alpha$, $\text{PKC}\alpha$ e AKR1C3 , foram escolhidas para análise de expressão proteica. Semelhante ao realizado na expressão gênica, primeiramente o grupo C foi comparado aos grupos P4h e P7h para avaliar se houve efeito do etanol 50% na expressão proteica de $\text{PKC}\alpha$ e AKR1C3 . Em seguida, os grupos controle e placebo foram comparados nos tempos 4 e 7 horas.

Houve tendência para efeito do etanol 50% sob a expressão $\text{PKC}\alpha$ no tempo 4h ($P=0,087$; Gráfico 7). Observou-se menor abundância de $\text{PKC}\alpha$ no grupo E4h

comparado ao grupo P4h. Porém, houve efeito do etanol 50% na expressão de PKC α ($P < 0,05$; Gráfico 7) no tempo 7 horas, observando-se maior abundância de PKC α comparado ao grupo C. Não houve efeito de etanol 50% na expressão de AKR1C3, ou seja, a expressão proteica de AKR1C3 no grupo C não diferiu dos grupos P4h e P7h ($P > 0,05$; Gráfico 7). Considerando que foram encontrados efeitos do etanol 50% sob a expressão de PRKC α , as comparações de expressão proteica também foram realizadas separadamente nos tempos 4h e 7h.

Gráfico 7 – Abundância de PRKC α e PKC β , proteínas envolvidas na sinalização e síntese de PGF2 α no endométrio de vacas durante a fase luteínica (D15) do ciclo estral nos grupos (P4h e P7h) e estradiol (E4h e E7h).

Legenda: Abundância de PKC α e AKR1C3 relativa à da proteína endógena (β -actina). A) Abundância de PKC α e B) abundância de AKR1C3 no grupo controle comparado ao grupo placebo 4 e 7 horas (P4h e P7h; N= 3 por grupo). C) Abundância de PKC α e D) abundância de AKR1C3 em animais tratados com estradiol ou placebo são mostradas nos tempos 4h (E4h; N=3 vs. P4h; N=3) e 7h (E7h; N=3 vs. P7h; N=3) após o tratamento. As barras indicam a média ($\pm$ EPM).

* $P < 0,05$ diferenças significativas entre as médias dos grupos.

$0,05 < P < 0,10$ tendência diferenças significativas entre as médias dos grupos.

Era esperado que o 17 β -estradiol também levasse ao aumento das enzimas de síntese e sinalização de PGF2 α . Porém de maneira semelhante ao encontrado na expressão gênica, a abundância de PKC α foi diminuída nos grupos E4h e E7h comparado aos grupos P4h e P7h, respectivamente ($P < 0,05$; Gráfico 7). A expressão de AKR1C3 não diferiu entre os grupos E4h e P4h, assim como entre E7h e P7h ($P > 0,05$; Gráfico 7). Portanto, o estradiol não modulou a abundância proteica de AKR1C3 nos tempos 4h e 7h ($P > 0,05$; Gráfico 7). Por fim, os grupos tratados com 17 β -estradiol tiveram a expressão gênica e proteica de PKC α diminuídas 4 e 7 horas após o tratamento ($P < 0,05$; Gráfico 7), em relação ao grupo placebo. Contudo, o tratamento com 17 β -estradiol não modulou a expressão de AKR1C3 ($P > 0,05$; Gráfico 7).

4.5 LOCALIZAÇÃO PROTEICA

As proteínas ER α , PGR, PKC α , PKC γ , COX2, AKR1B1 e AKR1C3 foram avaliadas por imuno-histoquímica para determinar a intensidade de imunomarcção em células do epitélio luminal, epitélio glandular e estroma, representado na Tabela 4. A intensidade de marcação do anticorpo correspondente a cada proteína foi avaliada em uma escala de 0 a 3 (grau 0 = nenhuma marcação; grau 1 = marcação fraca; grau 2 = marcação moderada e grau 3 = marcação forte). Com base na nossa hipótese era esperado que os grupos tratados com 17 β -estradiol levassem ao aumento da imunomarcção de todas proteínas analisadas, exceto dos receptores de estradiol. O efeito do etanol 50% foi previamente avaliado por comparações entre o grupo controle (C) e placebo (P4h e P7h), em todas as proteínas estudadas. Posteriormente, foram realizadas comparações da intensidade de marcação dos grupos placebo e estradiol em biópsias coletadas nos tempos 4 horas (P4h vs. E4h) e 7 horas (P7h vs. E7h) após o tratamento. Estas comparações foram realizadas por região, mais especificamente no epitélio luminal, epitélio glandular e estroma. As proteínas que não diferiram quanto à intensidade de marcação foram caracterizadas quanto a sua intensidade de marcação e localização nas mesmas regiões anteriormente citadas (Tabela 4 e Figura 9).

Na figura 10 podemos observar de maneira sintética os efeitos do tratamento com 17β -estradiol na expressão dos componentes de síntese de $\text{PGF}2\alpha$ no endométrio de vacas no dia 15 do ciclo estral.

Tabela 4 – Distribuição e intensidade de marcação de proteínas envolvidas na síntese de $\text{PGF}2\alpha$, 4 horas após a administração de 17β -estradiol em vacas, no dia 15 do ciclo estral.

	PGR	ERα	COX2	PKCγ	PKCα	AKR1B1	AKR1C3
EL	- (P=1,00)		+ (P=0,33)	++ (P=0,08)	+++ (P=0,76)		+++ (P=1,00)
EG	+++ (P=0,04)	- (P=1,00)	++ (P=0,51)	++ (P=0,60)	++ (P=0,50)	+++ (P=0,54)	+++ (P=0,32)
E	- (P=0,40)		- (P=0,37)	+ (P=0,77)	- (P=0,31)	- (P=0,51)	++ (P=0,57)

Legenda: Intensidade de marcação ausente (Grau 0; -), fraca (Grau1; +), moderada (Grau 2; ++), forte (grau 3; +++) no tecido endometrial de vacas no dia 15 do ciclo estral em biópsias coletadas 4h em animais do grupo placebo e estradiol (N=5 por grupo). Epitélio Luminal (EL), Epitélio glandular (EG) e Estroma (E).

4.5.1 PGR

Em maior frequência os animais apresentaram marcação do epitélio glandular independente de tratamento (Grau 3). Entretanto, foi observada fraca intensidade de marcação no luminal e estroma na maioria dos animais (grau 0). A expressão de PGR não diferiu no epitélio luminal e estroma, entre os grupos P4h e E4h, assim como entre P7h e E7h ($P>0,05$; Figura 6). Além disso, a imunomarcação de PGR no epitélio glandular foi maior no grupo E4h (grau 3) comparado ao grupo P4h (grau 2; Figura 6; $P<0,05$). Contudo, não houve diferenças significativas na expressão de PGR entre os grupos E7h e P7h no epitélio glandular ($P>0,05$).

Figura 6 – Imunolocalização proteica do receptor de progesterona (PGR) em tecido endometrial por imuno-histoquímica.

Legenda: Marcação do epitélio luminal (EL), epitélio glandular (EG) e estroma (E) nos grupos controle (C) , placebo (P4h), estradiol (E4h) e controle negativo da técnica (CN; N=5 por grupo). Barra preta no canto direito de cada imagem corresponde à escala de 100µm.

4.5.2 ER α

Em uma abrangente visão de todos os grupos observamos que o ER α apresentou fraca expressão em células do epitélio luminal e glandular (Figura 7). Além disso, não houve imunomarcacão de ESR α no estroma de nenhuma das amostras avaliadas de todos os grupos (Figura 7). Contudo, ER α apresentou diminuição da intensidade de marcação no epitélio glandular do grupo E4h (grau 0), comparado ao grupo P4h (Grau 1; Figura 7; $0,1 > P > 0,5$). Ademais, não houve diferenças entre os grupos E7h e P7h na expressão de ESR α no epitélio luminal, glandular e estroma (Figura 7; $P < 0,5$).

Figura 7 – Imunolocalização proteica do receptor de estradiol (ESR α) em tecido endometrial por imuno-histoquímica.

Legenda: Marcação do epitélio luminal (EL), epitélio glandular (EG) e estroma (E) nos grupos controle (C), placebo (P4h), estradiol (E4h) e controle negativo da técnica (CN; N=5 por grupo). Barra preta no canto direito de cada imagem corresponde à escala de 100 μ m.

4.5.3 PKC γ

Independente de tratamento a imunomarcção de PKC γ foi moderada no epitélio luminal e glandular (Figura 9). Entretanto, houve fraca imunomarcção do estroma na maioria dos tecidos analisados (Tabela 4). Houve tendência para aumento da imunomarcção na intensidade de marcação de PKC γ no epitélio luminal do grupo E4h comparado ao P4h (Figura 8; $P=0,08$). No entanto, não houve diferenças na imunomarcção de PKC γ no epitélio luminal, glandular e estroma dos grupos E7h e P7h (Figura 8; $P>0,5$).

Figura 8 – Imunolocalização proteica da proteína quinase gama (PKC γ) em tecido endometrial por imuno-histoquímica.

Legenda: Marcação do epitélio luminal (EL), epitélio glandular (EG) e estroma (E) nos grupos controle (C= N=4), placebo (P4h; N=5), estradiol (E4h; N=5) e controle negativo da técnica (CN; N=4). Barra preta no canto direito de cada imagem corresponde à escala de 100 μ m.

4.5.4 PKC α

De maneira geral, a enzima PKC α apresentou moderada marcação do epitélio luminal e glandular, respectivamente. Contudo, houve fraca marcação do estroma na maioria dos tecidos avaliados em todos os grupos (Figura 9). Não houve diferença entre os grupos E4h e P4h na expressão de PKC α no epitélio luminal, glandular e estroma (Figura 9, $P > 0,05$). O mesmo foi observado em comparações entre os grupos E7h e P7h ($P > 0,05$; Figura 9).

Figura 9 – Imunolocalização proteica de proteína quinase alfa (PKC α), ciclooxigenase-2 (COX2), aldo-ceto redutase B1 e C3 (AKR1B1; AKR1C3) em tecido endometrial por imunohistoquímica.

Legenda: Marcação do epitélio luminal (EL), epitélio glandular (EG) e estroma (E) nos grupos controle (C), placebo (P4h), estradiol (E4h) e controle negativo da técnica (CN; N=5 por grupo). Barra preta no canto direito e esquerdo de cada imagem corresponde à escala de 100 μ m.

4.5.5 COX2

De maneira geral houve grande variabilidade na intensidade de marcação no epitélio luminal, e baixa intensidade de marcação no estroma de todos os grupos. O epitélio glandular apresentou baixa expressão de COX2 na maioria dos tecidos avaliados (Figura 9). Além disso, a intensidade de marcação de COX2 nas células epitélio luminal, glandular e estroma não diferiram entre os grupos P4h e E4h ($P>0,05$; Figura 9). Da mesma forma, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos E7h e P7h na imunomarcação de COX2 nos mesmos tipos celulares ($P>0,05$).

4.5.6 AKR1B1

Independente de tratamento, a enzima de síntese de $\text{PGF2}\alpha$, AKR1B1, apresentou forte intensidade de marcação no epitélio luminal e glandular (Figura 9). O estroma apresentou fraca intensidade de marcação independente do grupo (Figura 9). A expressão de AKR1B1 no epitélio glandular e estroma não diferiu significativamente tanto no tempo 4h (P4h vs. E4h) como em 7h (P7h vs. E7h).

4.5.7 AKR1C3

A AKR1C3, sintase de $\text{PGF2}\alpha$, apresentou forte intensidade de imunomarcação no epitélio luminal e glandular na maioria das amostras avaliadas, independente de tratamento (Figura 9). Além disso, foi observada fraca intensidade de imunomarcação de AKR1C3 no estroma (Figura 9). Não houve diferença na intensidade de marcação de AKR1C3 entre os grupos E4h vs. P4h e E7h vs. P7h.

Figura 10 – Efeitos do 17β -estradiol na liberação temporal de PGFM (pg/mL) sobre os componentes moleculares da via de síntese de $\text{PGF}_2\alpha$ no endométrio de vacas no dia 15 do ciclo estral, 4 e 7 horas após o tratamento.

Fonte: (OLIVEIRA, M. L., 2017)

Legenda: Expressão dos componentes moleculares da via de síntese de $\text{PGF}_2\alpha$ endometrial, 4 e 7 horas após o tratamento com 17β -estradiol. A administração de 17β -estradiol causou diminuição dos transcritos dos receptores de estradiol (ESR1; ESR2), proteína quinase (PRKC α ; PRKC β), fosfolipase A (PLA2G4), prostaglandina F sintase (AKR1B1; AKR1C4) e aumento dos transcritos do receptor de ocitocina (OXTR). A modulação do 17β -estradiol sobre a expressão dos componentes moleculares de síntese de $\text{PGF}_2\alpha$ 7 horas após o tratamento foi semelhante ao encontrado 4h horas após. A expressão gênica de ESR1, PRKC α , PRKC β , AKR1B1 e AKR1C3 foi significativamente menor 7 horas após o tratamento com 17β -estradiol. Os transcritos de ESR2 e PLA2G4 apresentaram tendência para a diminuição 7 horas após o tratamento com 17β -estradiol. O 17β -estradiol não modulou a abundância da expressão de OXTR sete horas após o tratamento. A abundância de proteína PKC α foi reduzida 4 e 7 horas após a administração de 17β -estradiol. A imunomarcação de PGR aumentou no epitélio glandular 4 horas após o tratamento com 17β -estradiol. O 17β -estradiol tendeu a diminuir a imunomarcação de ER α no epitélio glandular, e aumentar PKC γ no epitélio luminal.

Setas de cor preta representam abundância de transcritos
 Seta de cor azul representa abundância de proteína
 Setas de cor vermelha representam intensidade de imunomarcação

5. DISCUSSÃO

No presente estudo permitiu-se observar pela primeira vez os efeitos *in vivo* do 17 β -estradiol na modulação da expressão de genes e proteínas envolvidas na síntese de PGF2 α endometrial em vacas de corte. O modelo experimental utilizado foi efetivo, pois resultou em progressivo aumento das concentrações de PGFM, iniciando 4 horas e chegando ao máximo 6 horas após o tratamento com 17 β -estradiol. Como esperado, a aplicação de 17 β -estradiol induziu maior liberação de PGF2 α e antecipou a luteólise funcional e estrutural. O 17 β -estradiol modulou a expressão de oito genes avaliados, a abundância de uma das proteínas e a localização de uma das proteínas investigadas por imunohistoquímica. A modulação da expressão gênica dos ESR e OXTR ocorreu conforme o esperado, tendo havido nos animais tratados uma diminuição aguda nos ESR1 e ESR2) e aumento de OXTR. Inesperadamente, a abundância dos transcritos das enzimas de sinalização intracelular (PKC α e PKC β) e síntese de PGF2 α (PLA2G4, AKR1B1 e AKR1C4) foi reduzida pelo tratamento com 17 β -estradiol, exceto a PTGS2 que não foi modulada. O efeito negativo do estradiol na expressão gênica das enzimas-chaves da cascata de síntese de PGF2 α não impossibilitou seus efeitos estimulatórios sobre a liberação de PGFM e a antecipação da regressão funcional e estrutural do CL. Portanto, inferimos que o estímulo do 17 β -estradiol sobre os OXTRs é passo essencial, atuando como “gatilho” de ativação da cascata de síntese de PGF2 α .

A mensuração de PGFM foi utilizada para indicar as concentrações de PGF2 α , conforme realizado por diversos estudos clássicos relativos ao entendimento da síntese de PGF2 α endometrial (KINDAHL et al., 1976; VIGHIO; LIPTRAP, 1986; KOTWICA et al., 1998; GINTHER et al., 2007). O início do aumento da liberação de PGFM ocorreu 4 horas após a aplicação de estradiol, seguido por máxima concentração após 7 horas, exatamente como descrito previamente na literatura (THATCHER et al., 1986; BERTAN, 2004; PUGLIESI et al., 2011). O perfil de liberação de PGFM foi analisado em todos os grupos: Controle (C), Placebo (P4h; P7h) e Estradiol (E4h; E7h). Diferente do esperado houve um discreto estímulo na liberação de PGFM nos grupos C e P4h. Contudo, o grupo P7h apresentou concentrações plasmáticas basais de PGFM em todos os tempos analisados, como esperado. O etanol 50% foi utilizado como placebo, visto que este veículo não

antecipa a luteólise (BARROS et al., 2010). Devido à ausência de estímulo de liberação de PGFM no grupo P7h, admitimos que o etanol 50% não estimulou a liberação de PGF2 α . Além disso, observamos que o aumento de PGFM ocorreu entre 3 e 4 horas após a coleta das biópsias, no grupo P4h e no grupo C, respectivamente. A PGF2 α é conhecida por sua função de mediar processos pró-inflamatórios em lesões teciduais (WILLIAMS; PECK, 1977). Portanto, esses resultados sugerem que a coleta da biópsia possa ter estimulado a liberação de PGF2 α , devido ao estímulo inflamatório local. Ainda, é possível deduzir que a PGFM tenha aumentado no grupo P7h por volta de 3h após a coleta da biópsia. Infelizmente, não é possível demonstrar esse aumento, pois não foram coletadas amostras de sangue após o tempo 7h. Baseado nesses resultados, inferimos que o discreto aumento de PGFM nos grupos C e P4h foi causado pelo procedimento de execução da biópsia, e não pela ação do etanol 50%. Além disso, o aumento de PGFM nos grupos C e P4h foi inferior a 50 pg/mL. Estudos prévios permitiram evidenciar que concentrações de PGFM inferiores a 50 pg/mL não são capazes de afetar as concentrações de progesterona comparadas às observadas por picos mais proeminentes, >150 pg/mL (PUGLIESI et al., 2011). O modelo experimental foi adequado, visto que o tratamento com 17 β -estradiol resultou em maior amplitude das concentrações de PGFM comparado ao grupo placebo. Tal observação é consistente com o observado em experimentos que avaliaram os efeitos do estradiol em concentrações fisiológicas e supra-fisiológicas, em que maiores concentrações de 17 β -estradiol levaram à maior amplitude do pico de PGFM à redução das concentrações plasmáticas de P4 (PUGLIESI et al., 2011).

O aumento das concentrações de PGF2 α é essencial para que ocorra a luteólise (KINDAHL; EDQVIST; GRANSTRISM, 1976; GINTHER et. al 2010; GINTHER et. al. 2012). A máxima concentração de PGFM ocorreu 6 horas após o tratamento de vacas com 17 β -estradiol e atingiu valores 2,5 vezes maiores comparado aos animais que receberam placebo, evidenciando que o estradiol estimulou a síntese de PGF2 α . A PGF2 α promove a luteólise estrutural e funcional por seus conhecidos efeitos na diminuição das concentrações plasmáticas de P4 e do fluxo sanguíneo (GINTHER et al., 2007). A progressiva e acentuada redução do fluxo e da concentração de P4 iniciou um dia após a aplicação de 17 β -estradiol, enquanto no grupo placebo estas iniciaram-se 3 dias após o tratamento.

Consistentemente, a redução da área do CL foi mais intensa 3 dias após o tratamento com 17β -estradiol, enquanto para o grupo placebo foi de 4 dias. Sendo assim, o estradiol promoveu o aumento de PGFM e consequentemente a antecipação da luteólise funcional e estrutural, como esperado. Os animais tratados com estradiol apresentaram luteólise antecipada em dois dias em relação aos grupos não tratados. De forma semelhante, em vacas que receberam 0,1mg de estradiol por via IM, a luteólise também foi antecipada em dois dias (PUGLIESI et al., 2011). A antecipação da luteólise, causada pelo 17β -estradiol, é fator adicional que assegura que o placebo não estimulou liberação de concentrações mínimas de PGFM necessárias para o estímulo da luteólise. Diante deste contexto, pode-se afirmar que este modelo é adequado para o estudo dos efeitos do estradiol na modulação dos componentes moleculares de síntese e liberação de $\text{PGF}_2\alpha$ no endométrio de vacas.

Todos dados de expressão gênica e proteica foram analisados para verificar se houve efeito do placebo nas concentrações de transcritos e proteínas. Inesperadamente, comparado ao grupo controle, o tratamento com placebo alterou a expressão de quatro genes: ESR1, ESR2, $\text{PKC}\beta$ e COX2. Além disso, foi observada uma variação entre o grupo P4h e P7h na expressão destes quatro genes, em comparações com o grupo controle. Por exemplo, o gene ESR1 teve sua expressão aumentada no grupo P4h e diminuída no P7h em relação ao grupo controle. Os transcritos de ESR2 e COX2 foram diminuídos tanto no grupo P4h como no grupo P7h comparado ao controle. A expressão de $\text{PKC}\gamma$ foi aumentada no grupo P4h comparado ao C, porém não diferiu entre P7h e C. Ou seja, o tratamento com etanol afetou a transcrição desses genes. Os genes que apresentaram efeito do placebo em relação ao grupo controle também já foram modulados pelo etanol em células de outros sistemas. Por exemplo, foi observado que o tratamento com etanol, aumentou a expressão gênica e proteica de receptores de estradiol (ESR1, ESR2, $\text{ER}\alpha$ e $\text{ER}\beta$) em cultivos de células osteoblásticas de ratos (CHEN et al., 2009). Nesta mesma abordagem a utilização de inibidores seletivos, de ESR1 e ESR2, causou atenuação dos efeitos do etanol, sugerindo efeito direto do etanol sobre a expressão dos receptores (CHEN et al., 2009). O efeito do etanol sobre a expressão de PKC também foi observado em outros cultivos celulares. Há indícios que cultivos de células de linhagens neuronais, PC12, expostas ao etanol leva ao aumento da abertura dos canais de cálcio por intermédio da PKC (MESSING;

SNEADE; SAVIDGE, 1990). Também foi evidenciado que o etanol (200 ou 400mg/dL) aumenta atividade da COX2 (PTGS2) e causa aumento da síntese de PGE2 em astrócitos (LUO et al., 2001). Os efeitos do etanol sobre esses genes ou suas respectivas proteínas ocorreram em tipos celulares distintos ao nosso estudo. Assim, se torna complexa a conclusão dos efeitos do etanol no presente estudo. Contudo, devido ao possível efeito do etanol sobre estes componentes da cascata de síntese de PGF2 α , e também por que tais efeitos do etanol variaram entre 4 e 7 horas, as comparações entre os grupos P e E foram realizados separadamente nos tempos 4h (P4h vs. E4h) e 7h (P7h vs. E7h).

A aplicação de baixas doses de 17 β -estradiol (50 μ g) em ovelhas ovariectomizadas estimulou a expressão gênica e proteica de ESR (ING; TORNESI, 1997). Tal estímulo está associado à diminuição da concentração de P4 e aumento de estradiol. Contudo, elevadas concentrações fisiológicas de estradiol promovem a regulação negativa em seus próprios receptores no período ovulatório (SPENCER; BAZER, 1995). No presente experimento, a abundância de transcritos para ESR1 e ESR2, foi diminuída 4h e 7h após a administração de 17 β -estradiol. Além da expressão gênica, também podemos observar que a imunomarcagem para ESR1 foi diminuída no epitélio glandular do grupo E4h. Sugerimos que a aplicação de 3mg de 17 β -estradiol em vacas tenha levado a um “*downregulation*” de seus receptores. Tal observação está de acordo com a conhecida habilidade que os hormônios esteroides possuem de controlar a expressão dos seus próprios receptores (WATHES et al., 1996). O estradiol também possui a capacidade de causar aumento de PGR. Esse aumento é considerado mais tardio comparado ao ESR (ING; TORNESI, 1997), fundamentando a diminuição da imunomarcagem de ESR α e aumento de PGR, ambos efeitos observados no epitélio glandular do grupo E4h. Assim, o estradiol aplicado no presente estudo cumpriu com os efeitos esperados na expressão de ESRs e PGR.

Além dos receptores de estradiol e P4, também foram avaliados OXTR. O aumento da concentração de OXTR é ponto crítico para o desencadeamento da luteólise (JENNER et al., 1991; ROBINSON et al. 2001; MANN, LAMMING, et al. 2006). Além disso, a ocitocina tem associação positiva com ativação de PLC e PLA2, e com a síntese de seus próprios receptores, portanto é considerado componente chave para a síntese de PGF2 α endometrial (BURNS et al., 1997).

Assim sendo, nossos resultados estão de acordo com os achados de pesquisas anteriores, pois o presente estudo mostra os efeitos positivos do estradiol no aumento da expressão de OXTR e estímulo na liberação de PGFM no grupo tratado com estradiol. Desta forma, o tratamento com estradiol modulou a expressão dos receptores endometriais, ESR1, ESR2, PGR e OXTR, conforme o esperado.

McCracken et al. (1984), propuseram um mecanismo para o controle uterino da secreção de PGF2 α endometrial. Neste modelo, o estradiol estimula a síntese de OXTR em algumas horas, enquanto o estímulo enzimático “*downstream*” do OXTR ocorre rapidamente, em minutos (MCCRACKEN; SCHRAMM; OKULICZ, 1984). Sugerindo que o mecanismo de estímulo lento ocorra por intermédio da expressão dos receptores endometriais (ESR e OXTR). Já os mecanismos de controle rápido sucedem da ativação em cascata das enzimas envolvidas na síntese de PGF2 α , tais como PKCs, PLAs e PGFS (AKRs) (MCCRACKEN; SCHRAMM; OKULICZ, 1984). Assim, especula-se que a indução do pico farmacológico do estradiol tenha levado ao “*downregulation*” de ESR e aumento OXTR. A nossa hipótese foi aceita quanto à expressão dos receptores endometriais ESR1, ESR2, PGR e OXTR. Contudo, diferente da nossa hipótese, a abundância de transcritos das enzimas de síntese de PGF2a foi reduzida pelo tratamento com estradiol.

Este é o primeiro estudo *in vivo* que mostra os efeitos do 17 β -estradiol na modulação da expressão gênica e proteica dos componentes moleculares de síntese de PGF2 α endometrial. A maior parte dos trabalhos mostra os efeitos do estradiol sobre a atividade de enzimas que participam da síntese de PGF2 α em modelos de estudo *in vitro*. Estes estudos mostram que as proteínas quinases são importantes sinalizadores celulares na síntese de PGF2 α por contribuírem na ativação de PLA2 (BURNS et al., 1997; TYSSELING et al., 1997; BINELLI et al., 2000; GUZELOGLU et al., 2004). A utilização de indutor de PKC, forbol 12,13 dibutirato (PDBu), leva ao aumento da secreção de PGF2 α em cultivos de células epiteliais endometriais bovinas (BEND) (BINELLI et al., 2000), enquanto que os efeitos do estradiol sobre a ativação de PKC são inibidos por tamoxifen, inibidor dos ESRs (SCHWARTZ et al., 2002). Além disso, estradiol tem sido alvo de pesquisas envolvendo vias alternativas de sinalização que levam à resposta rápida na ativação de PKC (BOYAN et al., 2003; SEGARS; DRIGGERS, 2014). Devido aos efeitos do 17 β -estradiol estarem associados à ativação de PKC e esta à síntese de PGF2 α ,

nossa hipótese era que o estradiol levaria ao aumento da expressão de PKC. Porém, os isotipos PRKC α e PRKC β tiveram a expressão gênica reduzida em biópsias coletadas 4 e 7 horas após o tratamento com estradiol. Anteriormente, Alves Júnior et. al., (2011) mostraram que o tratamento *in vivo* com 17 β -estradiol não modulou a quantidade de proteína total, verificado em explantes de endométrio coletados duas horas após o tratamento. Também não houve modulação na abundância de proteínas de peso molecular por volta de 80 kDa, compatível ao peso molecular das PKCs (ALVES JUNIOR et al., 2011). No entanto, foi observado aumento de proteínas com menor e maior peso molecular que as PKCs, entre 108-110 kDa e 75-76 kDa, respectivamente (ALVES JUNIOR et al., 2011). Desta forma, outras enzimas que não foram avaliadas no presente estudo podem ter importância na modulação da síntese de PGF2 α por estímulo do 17 β -estradiol. Além disso, no presente estudo verificamos que o 17 β -estradiol modulou de maneira oposta os isotipos de PKCs, aumentando PKC γ no epitélio luminal e diminuindo a abundância de transcritos e proteína PKC α . Este efeito do 17 β -estradiol pode indicar que os diferentes subtipos de PKCs podem regular a síntese de PGF2 α de forma específica.

A síntese de PGF2 α por estímulo de OXTR é associada à atividade de PLA2, assim como, a utilização de estimulador de PLA2 leva ao aumento da síntese de PGF2 α em cultivos de explantes endometriais (BURNS et al., 1997). Implantes uterinos de estradiol promoveram o aumento da atividade de PLA2 no útero de ratas, correspondendo a uma elevação 167 vezes maior comparado ao placebo. Além do aumento da atividade de PLA2 também houve aumento da síntese de PGF2 α (PAKRASI; CHENG; DEY, 1983). Assim, esperávamos que o estradiol além de aumentar transcritos de receptores de ocitocina, também levasse ao aumento dos transcritos de PLA2. Contudo, em nosso estudo o estradiol causou a redução dos transcritos de PLA2G4. Mesmo com a redução dos transcritos PRKC α , PRKC β e PLA2G4, o 17 β -estradiol aumentou a concentração de PGFM e antecipou a luteólise. Este fato indica que a redução da transcrição destas enzimas não foi fator limitante para a síntese de PGF2 α estimulada por estradiol, nem a produção de PGF2 α responsável pela luteólise. Além disso, a maior parte dos estudos mostra o aumento da atividade destas enzimas em benefício da síntese de PGF2 α (BURNS et al., 1997, BURNS et al., 1998; BINELLI et al., 2000, GUZELOGLU et al 2004).

Porém atividades enzimáticas não foram avaliadas no presente estudo. Sabe-se que a ativação das enzimas PKCs e PLA2 é dependente da presença de Ca^{2+} (COLBRAN; SODERLING, 1990; CLARK et al., 1991; BURNS; HAYES; SILVIA, 1998). Membrive et al. (2014) demonstraram que os efeitos do estradiol sobre a síntese de $\text{PGF2}\alpha$ são potencializados pela adição *in vitro* de ICa^{2+} em cultivos de explantes endometriais coletados no dia 17 do ciclo estral de vacas (MEMBRIVE et al., 2014). Sendo assim, o Ca^{2+} é elemento essencial para a síntese de $\text{PGF2}\alpha$. Os OXTRs são receptores acoplados a proteína G, e quando ativados estimulam a liberação de DAG e IP3 (TYSSELING et al., 1996). O IP3 se liga aos receptores no retículo endoplasmático para a liberação de Ca^{2+} (BERRIDGE; IRVINE, 1984). Paralelamente DAG dá início a cascata de fosforilação de PKCs para a síntese de $\text{PGF2}\alpha$. O estímulo da ocitocina na liberação de Ca^{2+} é ponto-crítico para a síntese de $\text{PGF2}\alpha$ (ASSELIN et al. 1997). Desta forma, a ativação de OXTR promove ativação da cascata de síntese de $\text{PGF2}\alpha$, pelo aumento de Ca^{2+} livre e pela ativação de PKCs e PLA2 (BURNS; HAYES; SILVIA, 1998). Assim sendo, apesar da redução destes componentes enzimáticos, o aumento da abundância de OXTR pelo tratamento com 17β -estradiol beneficiou a ativação da cascata de síntese de $\text{PGF2}\alpha$.

A COX-2 é uma enzima chave na síntese de $\text{PGF2}\alpha$ em vários tecidos. A COX-2 tem associação positiva com a síntese de $\text{PGF2}\alpha$. Na tuba uterina de camundongos o estradiol estimula o aumento de COX-2 (MARTÍNEZ et al., 2006). Consistentemente, essa enzima é inibida por tamoxifen, sugerindo um importante estímulo do estradiol via seus receptores na expressão de COX-2 (MARTÍNEZ et al., 2006). Apesar das evidências que o estradiol estimule a COX-2, no presente estudo tal tratamento não estimulou o aumento dos transcritos de COX-2 comparado aos animais que receberam placebo. Grupos de vacas que apresentam maiores concentrações de esteroides, estradiol e P4, representados por vacas com maior FD e maior CL também não modularam a expressão de COX-2, comparadas às vacas com menores concentrações de esteroides, no dia 7 do ciclo estral (OLIVEIRA et al., 2015). As enzimas prostaglandinas sintases possuem papel essencial na síntese de $\text{PGF2}\alpha$. As enzimas AKR1B1 e AKR1C4 são responsáveis pela síntese final de $\text{PGF2}\alpha$. Assim sendo, devido à capacidade do 17β -estradiol estimular a liberação de PGFM, era esperado o aumento das enzimas sintases de $\text{PGF2}\alpha$. Porém, mais uma vez, de forma contraditória à nossa hipótese, o estradiol levou à diminuição da

expressão gênica de ambas as sintases, AKR1B1 e AKR1C4. A expressão gênica de enzimas sintases de PGF2 α (AKR1C3 e AKR1C4) e PGE2 (PTGES1) aumentou no grupo de vacas com ambiente uterino sob influência de maiores concentrações de esteroides (OLIVEIRA et al., 2015). Contudo o aumento da expressão gênica destas sintases não resultou em aumento de seus respectivos metabólitos no lavado uterino e no tecido endometrial (OLIVEIRA et al., 2015). Sendo assim, a abundância de transcritos é um ponto entre vários outros possíveis, para verificar o efeito do estradiol sobre a via de síntese de PGF2 α . A abundância e atividade de proteínas são pontos importantes para definir mecanismos de modulação de vias moleculares. No presente estudo foi avaliada a abundância de apenas 2 proteínas, impossibilitando a associação entre expressão gênica e proteica. Além disso, não foram realizados ensaios para verificação de atividade de proteína. A expressão proteica foi realizada com número pequeno de animais tanto em análises por imuno-histoquímica como por Western Blotting, o que diminuiu a chance de encontrar diferenças na abundância proteica entre os grupos. Portanto, os nossos resultados são baseados principalmente em dados de expressão gênica. Além disso, a via de síntese e sinalização de PGF2 α é composta por uma vasta gama de moléculas. Desta forma, é possível que o 17 β -estradiol possa aumentar outros componentes da via de síntese de PGF2 α que não foram avaliados neste estudo.

Propõe-se a seguinte cronologia para os eventos moleculares descritos na presente tese: sabe-se que a presença de elevada quantidade OXTR é primordial para que ocorra a luteólise. O tempo entre a aplicação de estradiol e o início da síntese de PGF2 α é de aproximadamente 4 horas. Portanto, 4 horas deve ser o tempo necessário para os processos de transcrição e tradução de OXTR por estímulo do E2. Desta forma, parece que no tempo 4 horas há quantidade suficiente de OXTR para o início do estímulo da síntese de PGF2 α . Assim, pelo aumento progressivo da concentração de PGFM, entre 4 e 7 horas devem ocorrer estímulos endócrinos iniciados pela OT que resultam na produção de PGF2 α . Por outro lado, os subprodutos da ativação de OXTRs tem a peculiar habilidade de aumentar a liberação de Ca²⁺ e de ativar proteínas dependentes de Ca²⁺, tais como PKCs e PLA2. Portanto, especula-se que mesmo com reduzida abundância de PKCs e PLAs, a grande quantidade de OXTR ativado leva ao aumento das concentrações de Ca²⁺ que por sua vez causa substancial ativação destas enzimas resultando na

elevação das concentrações de PGFM observada (Figura 11). Nossos resultados permanecem restritos à expressão gênica, fazendo-se necessário a realização de mais estudos para verificar os efeitos do 17β -estradiol na liberação de Ca^{2+} e na ativação de PKCs, PLAs e AKRs.

Figura 11 – Modelo hipotético da via de sinalização e síntese de $\text{PGF}_2\alpha$, representando o efeito da aplicação do 17β -estradiol sobre os receptores endometriais, enzimas de sinalização intracelular e síntese de $\text{PGF}_2\alpha$ no endométrio de vacas no dia 15 após o estro.

Fonte: (OLIVEIRA, M. L., 2017)

Legenda: A aplicação de 17β -estradiol em fêmeas bovinas no dia 15 após o estro promoveu:

- 1) Diminuição da abundância dos transcritos de receptores de estradiol (ESR1 e ESR2);
- 2) Aumento da expressão gênica de receptores endometriais de ocitocina (OXTR);
- 3) Diminuição da abundância de transcritos da proteína quinase C (PRKCα, PRKCβ) e de proteína (PKCγ).
- 4) Diminuição da expressão gênica de PLA2G4 e
- 5) Diminuição da expressão gênica de $\text{PGF}_2\alpha$ (AKR1B1 e AKR1C4).
- 6) Aumento da síntese de $\text{PGF}_2\alpha$ (PGFM).

A aplicação de 17β -estradiol leva ao aumento da síntese de $\text{PGF}_2\alpha$, apesar do seu efeito negativo sobre a expressão da maioria dos transcritos de enzimas envolvidas na síntese de $\text{PGF}_2\alpha$. Estes resultados indicam que o aumento da abundância de receptores endometriais de ocitocina leva aumento de Ca^{2+} e ativação da cascata de síntese de $\text{PGF}_2\alpha$, mesmo em condições de menor abundância de transcritos de enzimas envolvidas na síntese de $\text{PGF}_2\alpha$.

Setas de cor preta representam abundância de transcritos

Seta de cor azul representa abundância de proteína

6 CONCLUSÃO

Os principais achados do presente estudo foram que o 17 β -estradiol promoveu diminuição da abundância de transcritos de enzimas de síntese de PGF2 α (PRKC α , PRKC β ; PLA2G4; AKR1B1; AKR1C4) e aumento OXTR. O 17 β -estradiol também levou a redução da abundância de proteína PRKC α . Apesar da redução da transcrição das enzimas envolvidas na síntese de PGF2 α , houve aumento das concentrações de PGFM e antecipação da luteólise em vacas tratadas com 17 β -estradiol. Este fato é indicativo que houve ativação das enzimas de PGF2 α e que o aumento da abundância de receptores de ocitocina é o ponto-chave do mecanismo pelos quais o estradiol estimula a síntese de PGF2 α . O possível mecanismo para a estimulação de PGFM por 17 β -E2 pode incluir, efeitos transduccionais antes do momento 4 horas que promove feed back negativo em níveis transcrpcionais, ou ainda, o 17 β -estradiol pode ter promovido o aumento da ativação de enzimas pré-existentes que participam na cascata de síntese de PGF2 α .

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, T. J.; YOSHIKAWA, N.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F_{2α} injection in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 3, p. 651–8, 2002.
- ALVES JUNIOR, S. S.; SOARES, N.; CASTRO, F. C.; THOMAZ, F.; PEREIRA, V.; BALIEIRO, J. C. C.; MUNIN, S. F.; CESAR, M. C.; BINELLI, M.; MEMBRIVE, C. M. B. Estradiol-17β altera expressão proteica endometrial em fêmeas bovinas tratadas no 17º dia do ciclo estral. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 48, n. 17, p. 27–37, 2011.
- ARAUJO, R. R.; GINTHER, O. J.; FERREIRA, J. C.; PALHÃO, M. M.; BEG, M. A.; WILTBANK, M. C. Role of follicular estradiol-17β in timing of luteolysis in heifers. **Biology of reproduction**, v. 81, n. 2, p. 426–37, 2009.
- ASSELIN, E.; DROLET, P.; FORTIER, M. Cellular mechanisms involved during oxytocin-induced prostaglandin F_{2α} production in endometrial epithelial cells in vitro: role of cyclooxygenase-2. **Endocrinology**, v. 138, n. 11, p. 4798–4805, 1997.
- ASSELIN, E.; GOFF, K.; BERGERON, H.; FORTIER, M. Influence of sex steroids on the production of prostaglandins F_{2α} and E₂ and response to oxytocin in cultured epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. **Biology of Reproduction**, v. 54, n. 2, p. 371–9, 1996.
- ATLI, M. O.; BENDER, R. W.; MEHTA, V.; BASTOS, M. R.; LUO, W.; VEZINA, C. M.; WILTBANK, M. C. Patterns of gene expression in the bovine corpus luteum following repeated intrauterine infusions of low doses of prostaglandin F_{2α}. **Biology of Reproduction**, v. 86130, n. 4, p. 1–13, 2012.
- BEARD, P.; LAMMING, G. E. Oestradiol concentration and the development of the uterine oxytocin receptor and oxytocin-induced PGF_{2α} release in ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 100, n. 2, p. 469–475, 1994.
- BERISHA, B.; MEYER, H. H. D.; SCHAMS, D. Effect of prostaglandin F_{2α} on local luteotropic and angiogenic factors during induced functional luteolysis in the bovine corpus luteum. **Biology of reproduction**, v. 82, n. 5, p. 940–7, 2010.
- BERISHA, B.; SCHAMS, D. Ovarian function in ruminants. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, n. 2, p. 305–317, 2005.
- BERRIDGE, michael J.; IRVINE, R. F. Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. **Nature**, v. 312, p. 315–321, 1984.
- BERTAN, C. M. **Mecanismos endócrinos e moleculares pelos quais o estradiol estimula a síntese de prostaglandina F_{2α} no endométrio de fêmeas bovinas**. 2004. 180f. Tese (doutorado em Ciências Animais) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

BINELLI, M.; GUZELOGLU, a; BADINGA, L.; ARNOLD, D. R.; SIROIS, J.; HANSEN, T. R.; THATCHER, W. W. Interferon-tau modulates phorbol ester-induced production of prostaglandin and expression of cyclooxygenase-2 and phospholipase-A2 from bovine endometrial cells. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 2, p. 417–24, ago. 2000.

BISHOP, C. V. Progesterone inhibition of oxytocin signaling in endometrium. **Frontiers in Neuroscience**, v. 7, n. 7 AUG, p. 1–6, 2013.

BOYAN, B. D.; SYLVIA, V. L.; FRAMBACH, T.; LOHMANN, C. H.; DIETL, J.; DEAN, D. D.; SHWARTZ, Z. Estrogen-dependent rapid activation of protein kinase C in estrogen receptor-positive MCF-7 breast cancer cells and estrogen receptor-negative HCC38 cells is membrane-mediated and inhibited by tamoxifen. **Endocrinology**, v. 144, n. 5, p. 1812–1824, 2003.

BRUNO, J. B.; MATOS, M. H. T.; CHAVES, R. N.; CELESTINO, J. J. H.; SARAIVA, M. V. a. Angiogenic factors and ovarian follicle development. **Animal Reproduction**, v. 6, n. 2, p. 371–379, 2009.

BURNS, P. D.; GRAF, G. A.; HAYES, S. H.; SILVIA, W. J. Cellular mechanisms by which oxytocin stimulates uterine PGF2 α synthesis in bovine endometrium: Roles of phospholipases C and A2. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 14, n. 3, p. 181–191, 1997.

BURNS, P. D.; HAYES, S. H.; SILVIA, W. J. Cellular mechanisms by which oxytocin mediates uterine prostaglandin F2 α synthesis in bovine endometrium: Role of calcium. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 15, n. 6, p. 477–487, 1998.

BURNS, P. D.; MENDES JR., J. O.; YEMM, R. S.; CLAY, C. M.; NELSON, S. E.; HAYES, S. H.; SILVIA, W. J. Cellular mechanisms by which oxytocin mediates ovine endometrial prostaglandin F2 α synthesis: role of G(i) proteins and mitogen-activated protein kinases. **Biology of reproduction**, v. 65, n. 4, p. 1150–1155, 2001.

CAPPER, E. A.; MARSHALL, L. A. Mammalian phospholipases A2: Mediators of inflammation, proliferation and apoptosis. **Progress in Lipid Research**, v. 40, n. 3, p. 167–197, 2001.

CARTER, F.; FORDE, N.; DUFFY, P.; WADE, M.; FAIR, T.; CROWE, M. A.; EVANS, A. C. O.; 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, n. 3, p. 368–375, 2008.

CAVICCHIO, V. A.; PRU, J. K.; DAVIS, B. S.; DAVIS, J. S.; RUEDA, B. R.; TOWNSON, D. H. Secretion of monocyte chemoattractant protein-1 by endothelial cells of the bovine corpus luteum: Regulation by cytokines but not prostaglandin F2 α . **Endocrinology**, v. 143, n. 9, p. 3582–3589, 2002.

CHARETTE, R.; BIGRAS-POULIN, M.; MARTINEAU, G. P. Body condition evaluation in sows. **Livestock Production Science**, v. 46, n. 2, p. 107–115, 1996.

CHEN, J. R.; LAZARENKO, O. P.; HALEY, R. L.; BLACKBURN, M. L.; BADGER, T. M.; RONIS, M. J. Ethanol impairs estrogen receptor signaling resulting in accelerated activation of senescence pathways, whereas estradiol attenuates the effects of ethanol in osteoblasts. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 24, n. 1523–4681, p. 221–230, 2009.

CLARK, J. D.; LIN, L. L.; KRIZ, R. W.; RAMESHA, C. S.; SULTZMAN, L. A.; LIN, A. Y.; MILONA, N.; KNOPF, J. L. A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca^{2+} -dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. **Cell**, v. 65, n. 6, p. 1043–1051, 1991.

COLBRAN, R. J.; SODERLING, R. Calcium / Calmodulin-independent Autophosphorylation Sites of Calcium / Calmodulin-dependent Autophosphorylation Protein Kinase II. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 19, p. 11213–11219, 1990.

DANET-DESNOYERS, G.; MEYER, M. D.; GROSS, T. S.; JOHNSON, J. W.; THATCHER, W. W. Regulation of endometrial prostaglandin synthesis during early pregnancy in cattle: Effects of phospholipases and calcium In vitro. **Prostaglandins**, v. 50, n. 5–6, p. 313–330, 1995.

BARROS, F. R. O.; BERTAN, C. M.; DIAS, L. O. P.; FANTINI, D. A.; AYRES, G. R.; MARQUES, V. B.; MIGUEZ, P. H. P.; BINELLI, M. Effects of ethanol on synthesis of prostaglandin F2 α in bovine females. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 5, p. 846–850, 2010.

DUCHENS, M.; KINDAHL, H.; FORSBERG, M.; GUSTAFSSON, H.; RODRÍGUEZ-MARTÍN, H. Influence of low plasma progesterone concentrations on the release of prostaglandin F2 α during luteolysis and oestrus in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 40, n. 4, p. 261–268, 1995.

EGGLESTON, D. L.; WILKEN, C.; VAN KIRK, E. A.; SLAUGHTER, R. G.; JI, T. H.; MURDOCH, W. J. Progesterone induces expression of endometrial messenger RNA encoding for cyclooxygenase (sheep). **Prostaglandins**, v. 39, n. 6, p. 675–683, 1990.

FLEMING, J. G. W.; SPENCER, T. E.; SAFE, S. H.; BAZER, F. W. Estrogen regulates transcription of the ovine oxytocin receptor gene through GC-rich SP1 promoter elements. **Endocrinology**, v. 147, n. 2, p. 899–911, 2006.

FORTIER, M. A.; KRISHNASWAMY, K.; DANYOD, G.; BOUCHER-KOVALIK, S.; J.A. CHAPDELAINE, P. A postgenomic integrated view of prostaglandins in reproduction: implications for other body systems. **Prostaglandins**, p. 65–89, 2008.

GIJÓN, M. A.; LESLIE, C. C. Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A2 activation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 65, n. 3, p. 330–336, 1999.

GIMPL, G.; FAHRENHOLZ, F. The Oxytocin Receptor System: Structure, Function and Regulation. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 2, p. 629–683, 2001.

GINTHER, O.J. Local Versus Systemic Uteroovarian Relationships in Farm Animals. **Acta Veterinaria Scandinavica**. V. 77, p. 103-115, 1981.

GINTHER, O.J. Comparative anatomy of uteroovarian vasculature. **Veterinary scope** V.20, p. 1-26, 1976.

GINTHER, O. J.; ARAUJO, R. R.; RODRIGUES, B. L.; BEG, M. A. Luteal function and blood flow during intravenous infusion of prostaglandin F2 α in heifers. **Animal Reproduction**. v. 1, n.1, p. 400–408, 2009.

GINTHER, O. J.; KHAN, F. A.; HANNAN, M. A.; BEG, M. A. Temporal interrelationships at 15-min intervals among oxytocin, LH, and progesterone during a pulse of a prostaglandin F2 α metabolite in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 133, n. 1 – 2, p.63– 70, 2012.

GINTHER, O. J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, n. 1, p. 223–230, 1989.

GINTHER, O. J.; SHRESTHA, H. K.; BEG, M. A. Circulating hormone concentrations within a pulse of a metabolite of prostaglandin F2 α during preludeolysis and early luteolysis in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 122, n. 3–4, p. 253–258, 2010.

GINTHER, O. J.; SHRESTHA, H. K.; FUENZALIDA, M. J.; IMAM, S.; BEG, M. A. Stimulation of pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF2 α (PGFM) with estradiol-17 β and changes in circulating progesterone concentrations within a PGFM pulse in heifers. **Theriogenology**, v. 74, n. 3, p. 384–392, 2010.

GINTHER, O. J.; SILVA, L. a; ARAUJO, R. R.; BEG, M. A. Temporal associations among pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF2 α , luteal blood flow, and luteolysis in cattle. **Biology of reproduction**, v. 76, n. 3, p. 506–513, 2007.

GUZELOGLU, A.; BINELLI, M.; BADINGA, L.; HANSEN, T.R.; THATCHER, W.W. Inhibition of phorbol ester-induced PGF2 α secretion by IFN- τ is not through regulation of protein kinase C. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**, v.74, p. 87–99, 2004.

GUZELOGLU, A.; SUBRAMANIAM, P.; MICHEL, F.; THATCHER, W. W. Interferon-tau induces degradation of prostaglandin H synthase-2 messenger RNA in bovine endometrial cells through a transcription-dependent mechanism. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 1, p. 170–176, 2004.

HANUKOGLU, I. Steroidogenic Enzymes: Structure, Function, and Role in Regulation of Steroid Hormone Biosynthesis. **Steroid Biochem. Molec. Biol**, v. 43, n. 8, p. 779–804, 1992.

HAWORTH, J. D.; ROLLYSON, M. K.; SILVA, P.; MCINTUSH, E. W.; NISWENDER, G. D. Messenger ribonucleic acid encoding monocyte chemoattractant protein-1 is expressed by the ovine corpus luteum in response to prostaglandin F2 α . **Biology of Reproduction**, v. 58, n. 1, p. 169–174, 1998.

HENRICKS, D. M.; LONG, J. T.; HILL, J. R.; DICKEY, J. F. The effect of prostaglandin F2 α during various stages of the oestrous cycle of beef heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 41, n. 1, p. 113–120, 1974.

ING, N. H.; TORNESI, M. B. Estradiol up-regulates estrogen receptor and progesterone receptor gene expression in specific ovine uterine cells. **Biology of Reproduction**, v. 56, n. 5, p. 1205–1215, 1997.

JENNER, L. J.; PARKINSON, T. J.; LAMMING, G. E. Uterine oxytocin receptors in cyclic and pregnant cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 91, p. 49-58, 1991.

JUENGEL, J. L.; WILTBANK, M. C.; MEBERG, B. M.; NISWENDER, G. D. Regulation of steady-state concentrations of messenger ribonucleic acid encoding prostaglandin F2 α receptor in ovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 54, n. 5, p. 1096–1102, 1996.

KASTELIC, J.P.; PIERSON, R. A.; GINTHER, O.L. Ultrasonic morphology of corpora lutea and central luteal cavities during the estrous cycle and early pregnancy in heifers. **Theriogenology**, v. 34, n. 3, p. 487–498, 1990.

KERANEN, L. M.; DUTIL, E. M.; NEWTON, A. C. Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. **Current Biology**, v. 5, n. 12, p. 1394–1403, 1995.

KINDAHL, H.; EDQVIST, L. E.; GRANSTRISM, E.; BANE, A. The release of prostaglandin F2 α as reflected by 15-keto-13,14-dihydroprostaglandin in the peripheral circulation during normal luteolysis in heifers. **Prostaglandins**, v. 11, n. 5, 1976.

KOBAYASHI, S. I.; ACOSTA, T. J.; OZAWA, T.; HAYASHI, K.; BERISHA, B.; OHTANI, M.; SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A. Intraluteal Release of Angiotensin II and Progesterone In Vivo During Corpora Lutea Development in the Cow: Effect of Vasoactive Peptides. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 1, p. 174–179, 2002.

KOTWICA, J.; SKARZYNSKI, D.; JAROSZEWSKI, J.; WILLIAMS, G. L.; BOGACKI, M. Uterine secretion of prostaglandin F2 α stimulated by different doses of oxytocin and released spontaneously during luteolysis in cattle. **Reproduction, Nutrition, Development**, v. 38, n. 3, p. 217–226, 1998.

KOTWICA, J.; SKATZYNSKI, D.; BOGACKI, M.; MELIN, P.; STAROSTKAL, B. The use of an oxytocin antagonist to study the function ovarian during luteolysis in cattle. **Theriogenology**, n. 97, p. 1287–1299, 1997.

JENNER, L. J.; PARKINSON T. J.; LAMMING, G. E. Uterine oxytocin receptors in

cyclic and pregnant cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 91, p. 49–58, 1991.

LAFRANCE, M.; GOFF, A. K. Effects of progesterone and oestradiol-17 β on oxytocin- induced release of prostaglandin F2 α in heifers. 1988. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 82, p. 429–436, 1988.

LEE, J.; MCCRACKEN, J. A.; BANU, S. K.; RODRIGUEZ, R.; NITHY, T. K.; AROSH, J. A. Transport of prostaglandin F2 α pulses from the uterus to the ovary at the time of luteolysis in ruminants is regulated by prostaglandin transporter-mediated mechanisms. **Endocrinology**, v. 151, n. 7, p. 3326–3335, 2010.

LEE, S.-H.; ACOSTA, T. J.; YOSHIOKA, S.; OKUDA, K. Prostaglandin F2 α regulates the nitric oxide generating system in bovine luteal endothelial cells. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 55, n. 4, p. 418–424, 2009.

LUO, J.; LINDSTRÖM, C. L. B.; DONAHUE, A.; MILLER, M. W. Differential effects of ethanol on the expression of cyclo-oxygenase in cultured cortical astrocytes and neurons. **Journal of Neurochemistry**, v. 76, n. 5, p. 1354–1363, 2001.

LYIMO, Z. C.; NIELEN, M.; OUWELTJES, W.; KRUIP, T. A. M.; VAN EERDENBURG, F. J. C. M. Relationship among estradiol, cortisol and intensity of estrous behavior in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 53, n. 9, p. 1783–1795, 2000.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. The Influence of Progesterone During Early Pregnancy in Cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 34, p. 269–274, 1999.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Timing of prostaglandin F2 α release episodes and oxytocin receptor development during luteolysis in the cow. **Animal Reproduction Science**, v. 93, n. 3–4, p. 328–336, 2006.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E.; FRAY, M. D. Plasma Estradiol and Progesterone during Early-Pregnancy in the Cow and the Effects of Treatment with Buserelin. **Animal Reproduction Science**, v. 37, n. 2, p. 121–131, 1995.

MARTÍNEZ, S. P.; HERMOSO, M.; FARINA, M.; RIBEIRO, M. L.; RAPANELLI, M.; M. ESPINOSA; VILLALÓN, M.; FRANCHI, A. 17- β -estradiol upregulates COX-2 in the rat oviduct. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 80, p. 155–164, 2006.

MCCRACKEN, J. .; SCHRAMM, W.; OKULICZ, W. Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF2 α from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation in early pregnancy. **Animal Reproduction Science**, v. 7, p. 31–55, 1984.

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

MCCRACKEN, J. A; GLEW, M. E.; SCARAMUZZI, R. J. Corpus luteum regression induced by prostagland in F2 α . **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 30, n. 4, p. 544–6, 1970.

MELLOR, H.; PARKER, P. J. The extended protein kinase C superfamily. **The Biochemical Journal**, v. 332, n. 2, p. 281–92, 1998.

MEMBRIVE, C. M. B.; DA CUNHA, P. .; MEIRELLES, F. .; BINELLI, M. Calcium potentiates the effect of estradiol on PGF2 α production in the bovine endometrium. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 25, 2014.

MESSING, R. O.; SNEADE, A. B.; SAVIDGE, B. Protein kinase C participates in up-regulation of dihydropyridine- sensitive calcium channels by ethanol. **Journal of Neurochemistry**, v. 55, p. 1383–1389, 1990.

MICHIE, A. M.; NAKAGAWA, R. The link between PKC α regulation and cellular transformation. **Immunology Letters**, v. 96, n. 2, p. 155–162, 2005.

MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K.; SASAHARA, K. Local regulation of corpus luteum development and regression in the cow: Impact of angiogenic and vasoactive factors. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 37, n. 3, p. 159–169, 2009.

MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K.; WIJAYAGUNAWARDANE, M. P. B.; WATANABE, S.; HAYASHI, M.; YAMAMOTO, D.; MATSUI, M.; ACOSTA, T. J. Blood flow: A key regulatory component of corpus luteum function in the cow. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, n. 2, p. 329–339, 2005.

MIYAMOTO, Y.; SKARZYNSKI, D. J.; OKUDA, K. Is Tumor necrosis factor α a trigger for the Initiation of endometrial prostaglandin F2 α release at luteolysis in Cattle? **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 1109–1115, 2000.

NETT, T. M.; MCCLELLAN, M. C.; NISWENDER, G. D. Effects of prostaglandins on the ovine corpus luteum: blood flow, secretion of progesterone and morphology. **Biology of reproduction**, v. 15, n. 1, p. 66–78, 1976.

NEUVIANS, T. P.; BERISHA, B.; SCHAMS, D. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Fibroblast Growth Factor (FGF) expression during induced luteolysis in the bovine corpus luteum. **Molecular Reproduction and Development**, v. 67, n. 4, p. 389–395, 2004.

NEUVIANS, T. P.; PFAFFL, M. W.; BERISHA, B.; SCHAMS, D. The mRNA expression of the members of the IGF-system in bovine corpus luteum during induced luteolysis. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 25, n. 4, p. 359–372, 2003.

NISWENDER, G. D.; JUENGEL, J. L.; MCGUIRE, W. J.; BELFIORE, C. J.; WILTBANK, M. C. Luteal function: the estrous cycle and early pregnancy. **Biology of reproduction**, v. 50, n. 2, p. 239–247, 1994.

OKUMU, L. A.; FORDE, N.; FAHEY, A. G.; FITZPATRICK, E.; ROCHE, J. F.; CROWE, M. A.; LONERGAN, P. The effect of elevated progesterone and pregnancy status on mRNA expression and localisation of progesterone and oestrogen receptors in the bovine uterus. **Reproduction**, v. 140, n. 1, p. 143–153, 2010.

OLIVEIRA, M. L.; HOECK, V. Van; MESQUITA, F. S.; MEMBRIVE, C. M. B. peri-

ovulatory endocrine regulation of the prostanoid. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, p. 544–556, 2015.

PAKRASI, P. L.; CHENG, H. C.; DEY, S. K. Prostaglandins in the uterus: modulation by steroid hormones. **Prostaglandins**, v. 26, n. 6, p. 991–1009, dez. 1983.

PATE, J. L.; KEYES, P. L. Immune cells in the corpus luteum: friends or foes? **Reproduction**, v. 122, n. 5, p. 665–676, 2001.

PENNY, L. A.; ARMSTRONG, D. G.; BAXTER, G.; HOGG, C.; KINDAHL, H.; BRAMLEY, T.; WATSON, E. D.; WEBB, R. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in the bovine corpus luteum around the time of natural luteolysis. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 6, p. 1464–1469, 1998.

PESCADOR, N.; SOUMANO, K.; STOCCO, D. M.; PRICE, C. A.; MURPHY, B. D. Steroidogenic acute regulatory protein in bovine corpora lutea. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 2, p. 485–491, 1996.

PUGLIESI, G.; BEG, M. A.; CARVALHO, G. R.; GINTHER, O. J. Effect of dose of estradiol-17 beta on prominence of an induced 13,14-dihydro-15-keto-PGF₂ α (PGFM) pulse and relationship of prominence to progesterone, LH, and luteal blood flow in heifers. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 41, n. 2, p. 98–109, 2011.

PUGLIESI, G.; OLIVERIA, M. L.; SCOLARI, S. C.; LOPES, E.; PINAFFI, F. V.; MIAGAWA, B. T.; PAIVA, Y. N.; MAIO, J. R. G.; NOGUEIRA, G. P.; BINELLI, M. Corpus luteum development and function after supplementation of long-acting progesterone during the early luteal phase in beef cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 1, p. 85–91, 2014.

PURSLEY, J. R.; KOSOROK, M. R.; WILTBANK, M. C. Reproductive Management of Lactating Dairy Cows Using Synchronization of Ovulation. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 2, p. 301–306, 1997.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF₂ α and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 915–923, 1995.

ROBINSON, R. S.; MANN, G. E.; LAMMING, G. E.; WATHES, D. C. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. **Reproduction**, v. 122, n. 6, p. 965–979, 2001.

ROSIANSKY-SULTAN, M.; KLIPPER, E.; SPANEL-BOROWSKI, K.; MEIDAN, R. Inverse relationship between nitric oxide synthases and endothelin-1 synthesis in bovine corpus luteum: Interactions at the level of luteal endothelial cell. **Endocrinology**, v. 147, n. 11, p. 5228–5235, 2006.

SAKUMOTO, R.; BERISHA, B.; KAWATE, N.; SCHAMS, D.; OKUDA, K. Tumor necrosis factor- α and its receptor in bovine corpus luteum throughout the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 1, p. 192–9, 2000.

SALFEN, B. E.; CRESSWELL, J. R.; XU, Z. Z.; BAO, B.; GARVERICK, H. A. Effects of the presence of a dominant follicle and exogenous oestradiol on the duration of the luteal phase of the bovine oestrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.115, p. 15-21, 1988.

SANTOS, R. M.; GOISSIS, M. D.; FANTINI, D. A.; BERTAN, C. M.; VASCONCELOS, J. L. M.; BINELLI, M. Elevated progesterone concentrations enhance prostaglandin F₂ α synthesis in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 114, n. 1–3, p. 62–71, 2009.

SCHAMS, D.; BERISHA, B. Regulation of corpus luteum function in cattle - An overview. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, n. 4, p. 241–251, 2004.

SCHAMS, D.; BERISHA, B.; KOSMANN, M.; AMSELGRUBER, W. M. Expression and localization of IGF family members in bovine antral follicles during final growth and in luteal tissue during different stages of estrous cycle and pregnancy. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 22, n. 1, p. 51–72, 2002.

SCHAMS, D.; BERISHA, B.; NEUVIANS, T.; AMSELGRUBER, W.; KRAETZL, W. D. Real-time changes of the local vasoactive peptide systems (angiotensin, endothelin) in the bovine corpus luteum after induced luteal regression. **Molecular Reproduction and Development**, v. 65, n. 1, p. 57–66, 2003.

SCHWARTZ, Z.; SYLVIA, V. L.; GUINEE, T.; DEAN, D. D.; BOYAN, B. D. Tamoxifen elicits its anti-estrogen effects in growth plate chondrocytes by inhibiting protein kinase C. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 80, n. 4–5, p. 401–410, 2002.

SEGARS, J. H.; DRIGGERS, P. H. Estrogen action and cytoplasmic signaling cascades. Part I: membrane-associated signaling complexes. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 13, n. 8, p. 349–354, 2014.

SHAW, D. W.; BRITT, J. H. Concentrations of tumor necrosis factor alpha and progesterone within the bovine corpus luteum sampled by continuous-flow microdialysis during luteolysis in vivo. **Biology of Reproduction**, v. 53, n. 4, p. 847–54, 1995.

SHRESTHA, H. K.; PUGLIESI, G.; BEG, M. a; GINTHER, O. J. Role of luteinizing hormone in changes in concentrations of progesterone and luteal blood flow during the hours of a simulated pulse of 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F α (PGFM) in heifers. **Biology of Reproduction**, v. 85, n. 3, p. 482–9, 2011.

SILVIA, W. J.; HOMANICS, G. E. role of phospholipase c in mediating oxytocin - induced release of prostaglandin f 2 α from ovine endometrial tissue. **Journal of Animal Science** v. 35, n. 4, 1988.

SILVIA, W. J.; LEWIS, G. S.; MCCracken, J. a; THATCHER, W. W.; WILSON, L. Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F₂ alpha during luteolysis in ruminants. **Biology of reproduction**, v. 45, n. 5, p. 655–663, 1991.

SILVIA, W. J.; RAW, R. E. Regulation of pulsatile secretion of prostaglandin F2 α from the ovine uterus by ovarian steroids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, n. 2, p. 341–347, 1993.

SKARZYNSKI, D. J.; JAROSZEWSKI, J. J.; BAH, M. M.; DEPTULA, K. M.; BARSZCZEWSKA, B.; GAWRONSKA, B.; HANSEL, W. Administration of a nitric oxide synthase inhibitor counteracts prostaglandin F2 α -induced luteolysis in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 1681, n. November 2002, p. 1674–1681, 2003.

SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. **Biology of reproduction**, v. 53, n. 6, p. 1527–1543, 1995.

SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy . **Frontiers in Bioscience**, p. 1879–1898, 2002.

SPENCER, T. E.; BECKER, W. C.; GEORGE, P.; MIRANDO, M. A.; OGLE, T. F.; BAZER, F. W. Ovine interferon- τ regulates expression of endometrial receptors for estrogen and oxytocin but not progesterone. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 732–745, 1995.

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, n. 1, p. 65–78, 2007.

STRAKOVA, Z.; COPLAND, J. A.; LOLAIT, S. J.; SOLOFF, M. S. ERK2 mediates oxytocin-stimulated PGE2 synthesis. **American Journal of Physiology**, v. 274, n. 7, p. E634–E641, 1998.

THATCHER, W.; TERQUI, M.; THIMONIER, J.; MAULEON, P. Effect of estradiol-17 β on peripheral plasma concentration of 15-keto-13,14-dihydro PGF2 α and luteolysis in cyclic cattle. **Prostaglandins**, v. 31, n. 4, p. 745–756, 1986.

THOMAS, W.; COEN, N.; FAHERTY, S.; FLATHARTA, C. Ó.; HARVEY, B. J. Estrogen induces phospholipase A2 activation through ERK1/2 to mobilize intracellular calcium in MCF-7 cells. **Steroids**, v. 71, n. 3, p. 256–265, 2006.

TIAN, X. C.; BERNDTSON, a K.; FORTUNE, J. E. Changes in levels of messenger ribonucleic acid for cytochrome P450 side-chain cleavage and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase during prostaglandin F2 alpha-induced luteolysis in cattle. **Biology of reproduction**, v. 50, n. 2, p. 349–356, 1994.

TITHOF, P. K.; ROBERTS, M. P.; GUAN, W.; ELGAYYAR, M.; GODKIN, J. D. Distinct phospholipase A2 enzymes regulate prostaglandin E2 and F2 α production by bovine endometrial epithelial cells. **Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E**, v. 5, p. 16, 2007.

TOWNSON, D. H.; O'CONNOR, C. L.; PRU, J. K. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and distribution of immune cell populations in the bovine corpus luteum throughout the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. May 2001, p. 361–366, 2002.

TSAI, S. J.; WILTBANK, M. C. Prostaglandin F₂ α regulates distinct physiological changes in early and mid-cycle bovine corpora lutea. **Biology of Reproduction**, v. 58, n. 2, p. 346–52, 1998.

TSAI, S.; WILTBANK, M. C. Prostaglandin F α , induces expression of prostaglandin G H synthase-2 in the ovine corpus luteum: a potential positive feedback loop during luteolysis. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1016–1022, 1997.

TYSSELING, K. A.; THATCHER, W. W.; BAZER, F. W.; HANSEN, P. J.; MIRANDO, M. A. Mechanisms regulating prostaglandin F₂ α secretion from the bovine endometrium. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 2, p. 382–389, 1997.

TYSSELING, K.A; UZUMCU, M.; HOAGLAND, T T.A.; CRAIN, R.C.; MIRANDO, M.A. The role of phosphoinositide-derived second messengers in oxytocin-stimulated prostaglandin F₂ α . **Domestic Animal Endocrinology**, v.13, n 5, p. 411-420, 1996.

VALLET, J. L.; LAMMING, G. E.; BATTEN, M. Control of endometrial oxytocin receptor and uterine response to oxytocin by progesterone and oestradiol in the ewe. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 90, n. 2, p. 625–634, 1990.

VIGHIO, G. H.; LIPTRAP, R. M. Plasma concentrations of oxytocin, prostaglandin and ovarian steroids during spontaneous luteolysis in the cow. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 3, n. 3, p. 209–215, 1986.

VILLA-GODOY, A.; IRELAND, J. J.; WORTMAN, J. A.; AMES, N. K.; HUGHES, T. L.; FOGWELL, R. L. Effect of ovarian follicles on luteal regression in heifers. **Journal of Animal Science**, v. 60, n. 2, p. 519–527, 1985.

WALTERS, D. L.; SCHAMS, D.; SCHALLENBERGER, E. Pulsative secretion of ovarian steroids and ovarian oxytocin during the luteal phase of the oestrous cycle in the cow. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 71, p. 479, 1984.

WATHES, D.; MAN, G.; PAYNE, J.; RILEY, P.; STEVENSON, K.; LAMMING, G. Regulation of oxytocin and progesterone receptor concentrations in different uterine regions by oestradiol, progesterone and oxytocin in ovariectomized. **Journal of Endocrinology**, v.151 p. 375-393,1996.

WEBER, D. M.; FIELDS, P. A.; ROMRELL, L. J.; TUMWASORN, S.; BALL, B. A.; DROST, M.; FIELDS, M. J. Functional differences between small and large luteal cells of the late-pregnant vs. nonpregnant cow. **Biology of reproduction**, v. 37, n. 3, p. 685–97, 1987.

WILLIAMS, T. J.; PECK, M. . Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation. **Nature**, v. 270, p. 530–532, 1977.

WILSON , T., LIGGINS, G.C., AIMER, G.P., WATKINS, E. J. The effect of progesterone on the release of arachidonic acid from human endometrial cells stimulated by histamine. **Prostaglandins**, v. 31, n. 2, 1986.

WILTBANK, M. C.; SHIAO, T. F.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Prostaglandin F2 α receptors in the early bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 52, n. 1, p. 74–8, 1995.

YOUNG, J. M.; MCNEILLY, A. S. Theca: The forgotten cell of the ovarian follicle. **Reproduction**, v. 140, n. 4, p. 489–504, 2010.

ZHANG, J.; WESTON, P. G.; HIXON, J. E. Influence of estradiol on the secretion of oxytocin and prostaglandin F2 α during luteolysis in the ewe. **Biology of Reproduction**, v. 45, n. 3, p. 395–403, 1991.

ZHENG, J.; REDMER, D. a; REYNOLDS, L. P. Vascular development and heparin-binding growth factors in the bovine corpus luteum at several stages of the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 49, n. 6, p. 1177–89, 1993.

APÊNDICE A

Figura 12: Concentrações plasmáticas de PGFM na circulação sistêmica (pg/mL) de vacas no dia 15 após o estro em animais não tratados (Controle; C).

Figura 13: Concentrações plasmáticas de PGFM na circulação sistêmica (pg/mL) de vacas no dia 15 após o estro, em relação as horas após o tratamento com placebo no grupo P4h.

Figura 14: Concentrações plasmáticas de PGFM na circulação sistêmica (pg/mL) de vacas no dia 15 após o estro, em relação as horas após o tratamento com 17β -estradiol no grupo E4h.

Figura 15: Concentrações plasmáticas de PGFM na circulação sistêmica (pg/mL) de vacas no dia 15 após o estro, em relação as horas após o tratamento com placebo grupo P7h.

Figura 16: Concentrações plasmáticas de PGFM na circulação sistêmica (pg/mL) de vacas no dia 15 após o estro, em relação as horas após o tratamento com 17β -estradiol no grupo E7h.