VANESSA BELENTANI MARQUES

Atividade antiluteolítica no microambiente uterino durante o
período crítico para o estabelecimento da gestação em bovinos

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e
Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Mario Binelli

São Paulo

2006

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1795
FMVZ

Marques, Vanessa Belentani

Atividade antiluteolítica no microambiente uterino durante o período crítico para o estabelecimento da gestação em bovinos / Vanessa Belentani Marques. – São Paulo: V. B. Marques, 2006.
149 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2006.

Programa de Pós-graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Mario Binelli.

1. Prostaglandina F_{2α}. 2. Interferons. 3. Bovinos. 4. Reconhecimento da gestação. 5. Ensaio biológico. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Assistência Acadêmica

Comissão de Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização da atividade inibitória da síntese de prostaglandina F2 α no micro ambiente uterino no período inicial da gestação ou durante o ciclo estral", protocolo nº724/2005, utilizando 3 bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Mario Binelli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Characterization of inhibitory activity of prostaglandin F2 α synthesis in the uterine environment during early pregnancy or oestrous cycle ", protocol number 724/2005, utilizing 3 bovines, under the responsibility of Prof. Dr. Mario Binelli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 28 de julho de 2005

Prof.ª Dr.ª Julia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MARQUES, Vanessa Belentani

Título: Atividade antiluteolítica no microambiente uterino durante o período crítico para o estabelecimento da gestação em bovinos

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: 14 / 12 / 2006

Banca examinadora:

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

« Pela visão de mundo passam ideologias e paradigmas, mas a inquietude da vida não se acomoda nem na certeza ideológica, nem na promessa da razão científica. Lidar com a visão de mundo do outro, dela extrair a utopia humana e ceder à competência técnica para uma narrativa solidária, não é uma miragem e sim uma possibilidade » (Cremilda Medina)

Dedico esse trabalho aos meus pais Dirceu Marques e Neide Belentani Marques, que sempre mostraram o valor do conhecimento e da humildade; aos meus irmãos Denise Belentani Marques e Dirceu Victor Belentani Marques pelo apoio e carinho; ao companheiro Paulo Eduardo Bispo por compartilhar sonhos e amor; à Deus e aos seres que buscam o caminho do saber e da paz.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Mario Binelli por oferecer uma formação moderna de cientista, por alimentar o interesse pelo conhecimento, e iluminar os passos desse estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo pela formação oferecida aos jovens estudantes dessa ciência, a linguagem básica das medicinas, a anatomia.

Aos Professores do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal da FMVZ-USP pelo convívio estimulador com a pesquisa. Ao Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira, por filosofar sobre ensinamentos preciosos. Ao Prof. Dr. Rubens Paiva. de Arruda, pela atenção e apoio sempre concedidos. À Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi pela amizade e trabalho de educadora.

Aos professores Prof. Dr. Pedro P. Bombonato, Profa. Dra. Arani N. B. Mariana, Prof. Dr. Francisco J. Blasquez, Prof. José Roberto Kfoury Júnior, pelos ensinamentos compartilhados. À Profa. Dra. Irvênia Luiza dos Santis Prada pela mente inspiradora que nos traz luz e pelo prazer mais puro em educar. À Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa pela possibilidade de expandir as fronteiras do país em busca do conhecimento. À Profa. Dra. Maria Angélica Miglino pela confiança depositada.

Ao Prof. Dr. Alan Perez Ferraz de Melo pelas orientações preciosas e pelo apoio fundamental desde o início dessa jornada.

Aos Professores do Departamento de Reprodução Animal FMVZ-USP, Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, Prof. Dr. José Antonio Visintin, Prof. Dr. Cláudio Alvarenga, Profa. Dra. Mayra E.O.D. Assumpção, Prof. Dr. Marcelo A. B. V. Guimarães pelos ensinamentos e pelo belo trabalho desenvolvido no Departamento.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular. Aos que lá estavam e me acolheram na chegada: Cláudia M. Bertan Membrive, Pauline M. da Cunha, Patrícia H. P. Miguez, Fabiana F. Bressan, Marcelo D. Goissis e Jamile M. Vianna. Aos que foram chegando: Marcelo C. de Lima, André F. Freire, David A. Fantini, Luciana de O. P. Dias, Flávia R. O. de Barros, Eduardo P. de Oliveira, Bruna T. Ibiapina, Rafael S. Bisinotto, Filipe Fedozzi, Cláudia Niemeyer, Mariana I. Giasseti e Adriano F. P. Siqueira. Muito obrigada por toda a colaboração intelectual e técnica prestada à esse trabalho, foi um prazer trabalhar com vocês.

Aos colegas da Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres por compartilharem esse momento enriquecedor e desafiador das nossas vidas. Aos amigos Gisele Saviani, Maria Z. Benetone, Karina V. Marques, Felipe C. Braga, Roselaine P. de Oliveira, Lilian J. de Oliveira, Robson F. Giglio, Janaína, Rosane, Laura P. Artoni. Aos amigos Haley S. de Carvalho e Franklin Espíndola Neto pelo apoio na edição desse trabalho.

Aos colegas da Pós-Graduação em Reprodução Animal pelo apoio prestado ao desenvolvimento dessa pesquisa e pelos agradáveis momentos que vivenciamos nesse período. Aos amigos Alexandre Barreto de Almeida, Manoel de Sá, Sabrina M. Mogentale, Gustavo F. Rossa, José R. V. Pimentel, Fernanda Loureiro, Eneiva C. C. Celeghini, André Furugen, Cláudia F. Rafael, Ana Rita S. Coutinho, Raquel, Marcela P. Milazotto, Mariana G. Marques, Weber B. Feitosa, José Sérgio A. Gonçalves, Aníbal B. Nascimento, Renata Simões e Alessandra Nicacio.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal da FMVZ-USP, Isabel Barbosa, Márcio de Carli, José Maria, João, Carlos pelo pelo suporte fundamental ao desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos funcionários do Setor de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ-USP, Maicon, Jaqueline. Aos funcionários do Departamento de Reprodução FMVZ-USP Harumi Doi Shiraishi e Thaís Soto, meus sinceros agradecimentos pelo empenho nos trâmites burocrático e pela gentileza

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues pelos ensinamentos em estatística.

Ao Prof. Dr. Flavio Vieira Meirelles e à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, por disponibilizarem as dependências do Laboratório de Morfofisiologia Molecular do Desenvolvimento para estabelecer o cultivo celular desenvolvido nesse trabalho.

À Profa. Dra. Érika Zimmerknopf pelo apoio no delineamento e execução dos experimentos para obtenção de amostras do ambiente uterino.

Ao colegas do Laboratório de Morfofisiologia Molecular do Desenvolvimento da FZEA-USP, Giovana, Moisés Miranda, Fernando, Veruska, Lígia, Silvia, por todo apoio oferecido.

Ao amigo Vinícius de Moraes por disponibilizar sua estrutura na elaboração do projeto dessa tese e pela amizade.

À Prefeitura do Campus Administrativo de Pirassununga por disponibilizar recursos e animais para a realização dos experimentos. Aos funcionários da Prefeitura do Campus Administrativo de Pirassununga e da FMVZ, em especial aos funcionários do Abatedouro, Seção de Transportes e Setor de Gado de Corte, por toda a colaboração concedida.

Ao Dr. William W. Thatcher pela doação de anticorpos para PGF e células BEND, ao Dr. Michael Roberts pela doação do interferon-tau recombinante.

À FAPESP pelo apoio financeiro fundamental à execução desse trabalho.

E a todos que tenham contribuído com esse trabalho, muito obrigada!

O estudo da gramática não faz poetas. O estudo da harmonia não faz compositores. O estudo da psicologia não faz pessoas equilibradas. O estudo das ciências da educação não faz educadores. Educadores não podem ser produzidos. Educadores nascem. O que se pode fazer é ajudá-los a nascer. Para isso eu falo e escrevo: para que eles tenham coragem de nascer. Quero educar os educadores. E isso me dá grande prazer porque não existe coisa mais importante que educar. Pela educação o indivíduo se torna mais apto para viver: aprende a pensar e a resolver os problemas práticos da vida. Pela educação ele se torna mais sensível e mais rico interiormente, o que faz dele uma pessoa mais bonita, mais feliz e mais capaz de conviver com os outros. A maioria dos problemas da sociedade se resolveria se os indivíduos tivessem aprendido a pensar." (Rubem Alves)

RESUMO

MARQUES, V. B. **Atividade antiluteolítica no microambiente uterino durante o período crítico para o estabelecimento da gestação em bovinos.** [Antiluteolytic activity in the uterine microenvironment during the critic period to pregnancy establishment in bovines]. 2006. 149f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

A inibição da secreção pulsátil de prostaglandina F₂alfa (PGF_{2α}) uterina (atividade antiluteolítica) pela ação do interferon-tau (IFN-τ) trofoblástico, mantém a secreção de progesterona pelo corpo lúteo, fundamental ao estabelecimento da gestação nas fêmeas bovinas. Supõe-se que essa atividade antiluteolítica esteja presente no microambiente uterino bovino, portanto objetivou-se estudá-la. Dada à inexistência de ensaios que meçam especificamente a atividade antiluteolítica propôs-se elaborar um ensaio biológico para tal. Observou-se que células BEND tratadas com forbol 12,13 dibutirato (PdBu) por 6 horas em cultivo sintetizam PGF_{2α} e tal síntese é inibida na presença de interferon-tau recombinante bovino (rbIFN-τ). Em outro estudo definiu-se que 25 ng/mL de PdBu promove estímulo consistente à síntese de PGF_{2α}. A partir da análise de regressão do percentual de inibição à síntese de PGF_{2α} estimulada por PdBu, em função da concentração de interferon-tau recombinante (rbIFN-τ), calculou-se a concentração de rbIFN-τ que inibiu em 50% a síntese máxima de PGF_{2α} (observada na presença apenas de PdBu). Definiu-se a atividade antiluteolítica como o recíproco da concentração proteica requerida para atingir esse percentual de inibição (50%), e que a solução com uma unidade antiluteolítica é aquela que com um micrograma exerça tal efeito. Caracterizou-se a utilização dessa isoforma como padrão do ensaio antiluteolítico e calculou-se a atividade antiluteolítica do mesmo, $9,61 \times 10^2$ UA/μg de proteína. Em estudo seguinte observou-se a modulação da síntese de PGF_{2α} estimulada por PdBu, em função da concentração proteica de um pool de lavados uterinos ou meios condicionados por conceptos obtidos no décimo sétimo dia de gestação. Notou-se que para cada fluido testado há um intervalo de concentrações onde observa-se aumento linear na atividade antiluteolítica em função do acréscimo proteico. A partir da análise por regressão linear desse evento calculou-se a atividade antiluteolítica de cada amostra. Para o pool de lavados uterinos calculou-se $1,63 \times 10^{-1}$ UA/ μg de proteína, e para o pool de meios condicionados por conceptos $1,66 \times 10^2$ UA/μg de proteína.

Estes estudos permitiram desenvolver uma metodologia para observar a atividade antiluteolítica em humores biológicos. Aplicando o ensaio antiluteolítico estudou-se a atividade antiluteolítica presente em lavados uterinos obtidos durante o período crítico de fêmeas bovinas prenhes ou cíclicas (respectivamente, 56,2 e 33,9 UA/ μ g de proteína), notou-se que a atividade antiluteolítica foi maior no microambiente uterino de fêmeas gestantes. Tal resultado associado à potente atividade antiluteolítica observada para os meios condicionados por conceptos indicam a participação do IFN- τ secretado pelo concepto na modulação da síntese de PGF $_{2\alpha}$. Entretanto, observou-se atividade antiluteolítica nos lavados uterinos obtidos de fêmeas cíclicas, o que indica que a síntese de PGF $_{2\alpha}$ estimulada por PdBu pode ser modulada por outras proteínas, além do IFN- τ . Sugere-se que a atividade antiluteolítica, observada através do ensaio biológico proposto, é resultante da atuação de fatores estimulatórios e inibitórios presentes nos humores biológicos. Conclui-se que a atividade antiluteolítica pode ser mensurada pelo ensaio biológico proposto, no entanto outros estudos devem ser conduzidos para correlacionar essa atividade com a atuação do IFN- τ .

Palavras-chave: Prostaglandina F $_{2\alpha}$. Interferons. Bovinos. Reconhecimento da gestação. Ensaio Biológico.

ABSTRACT

MARQUES, V. B. **Antiluteolytic activity in the uterine microenvironment during the critic period to pregnancy establishment in bovines.** [Atividade antiluteolítica no microambiente uterino durante o período crítico para o estabelecimento da gestação em bovinos]. 2006. 149f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

The inhibition of pulsatile secretion of $\text{PGF}_{2\alpha}$ mediated by interferon-tau (IFN) is fundamental on the maternal recognition of pregnancy, maintaining the progesterone secretion by corpus luteum. Therefore the measurement of interferon activity in the uterine microenvironment was studied. Due to a lack of assays those measure specific antiluteolytic capacities we suggest develop a biological assay for it. In this research we observed that BEND cells treated with PdBu synthesize $\text{PGF}_{2\alpha}$, which is inhibited by the presence of recombinant bovine interferon-tau (rbIFN- τ). Following we defined 25ng/mL as PdBu (phorbol 12,13 dibutyrate) stimulus at the $\text{PGF}_{2\alpha}$ synthesis to be applied in this biological assay. Studies about the modulation of PdBu -stimulated $\text{PGF}_{2\alpha}$ synthesis by the rbIFN- τ validate the use of this isoform as a reference, defining a standard-curve and allowing estimating the antiluteolytic activity of 9.61×10^2 antiluteolytic units per microgram (UA/ μg) of protein. Further, we observed the modulation of PdBu -stimulated $\text{PGF}_{2\alpha}$ synthesis exerted by a pool of uterine flushings or conceptus conditioned medium, and for each tested fluid, there is a range of concentrations where is observed an increasing rate on the inhibition of $\text{PGF}_{2\alpha}$ synthesis. A restrict analysis on this concentrations range shows a linear behavior and allow calculate the antiluteolytic activity of each sample 1.63×10^{-1} UA/ μg of protein from a pool of uterine flushings, and 1.66×10^2 UA/ μg from conceptus conditioned medium. These studies validated a method to observe the antiluteolytic activity from biological fluids. Using the antiluteolytic assay, we studied the antiluteolytic activity present in uterine flushings obtained during the critic period by pregnant or cyclic bovine females cíclicas (respectively 56,2 e 33,9 UA/ μg of protein). We observed higher antiluteolytic activity from pregnant uterine microenvironment than in cyclic uterine microenvironment. This result linked with the high antiluteolytic activity observed to conceptus conditioned medium, suggest the participation of IFN- τ secreted by the conceptus in the $\text{PGF}_{2\alpha}$ synthesis modulation. However, we observed the antiluteolytic activity in uterine flushing obtained by cyclic cows,

suggesting that the $\text{PGF}_{2\alpha}$ synthesis could be modulated by another proteins. We believe that the antiluteolytic activity, observed by the antiluteolytic assay, ensue the action of inhibitors or stimulators factors in the biological fluids. We conclude that the antiluteolytic assay could be measured by the proposed biological assay, nevertheless another studies must be done in order to correlate this activity with the interferon action.

Key words: Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$. Interferons. Bovines. Pregnancy recognition. Biological assay.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Representação esquemática da biossíntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ a partir do ácido araquidônico nas células endometriais bovinas, segundo modelo proposto por Burns et al., 1997. Adaptado a partir de Bertan 2004 (consultar texto para detalhes)..... 39
- Figura 2 – Modelos estruturais moleculares do IFN- α humano e IFN- τ ovino . Em (a) e (c) observa-se respectivamente as vistas lateral e dorsal da molécula de IFN- α humano. Em (b) encontra-se representada a molécula de IFN- τ ovina. Evidenciando as hélices principais e extremidades amino- e carboxi-terminal dessas moléculas (ROBERTS et al., 1999) 46
- Figura 3 – Fotografias ilustrativas das instalações e equipamentos utilizados para os procedimentos de cultivo celular. Em (a) evidencia-se o fluxo laminar, e em (e) a estufa de CO_2 utilizados. Em (b), (c) e (d) ilustra-se o procedimento de descongelamento das células BEND, em (c) observa-se o procedimento de descongelamento em banho-maria, em (b) demonstra-se o depósito da alíquota celular em garrafa de cultivo e em (d) observa-se a garrafa de cultivo pronta para iniciar os procedimentos de cultivo..... 63
- Figura 4 – Fotografias ilustrativas dos procedimentos para obtenção de lavado uterino ex vivo e meio condicionado por conceito em fêmeas bovinas. (a) aparelho reprodutivo de fêmea bovina acondicionado em sacola plástica e gelo; (b) identificação dos cornos uterino ipso e contra-lateral ao CL; (c) útero bovino isolado por dissecação; (d) secagem externa do útero bovino para lavagem em fluxo laminar; (e) injeção de PBS no lúmen uterino acessado pela extremidade cranial do corno uterino contra-lateral ao CL; (f) massagem uterina do corno contra ao ipso-lateral ao CL; (g) ressecção da extremidade cranial do corno uterino ipso-lateral ao CL; (h) colheita de lavado uterino e conceito presente em placa de petri; (i) conceito bovino no décimo sétimo dia de gestação em placa de petri contendo MEM; (j) cultivo de conceitos bovinos em plataforma oscilatória em estufa sob atmosfera ambiente à $38,5^\circ\text{C}$ 67
- Figura 5 – Fotografias ilustrativas do procedimento de lavagem uterina ex vivo por sonda de Foley. (a) sistema para infusão uterina através de sonda de Foley aplicada transvaginalmente; (b) colheita de lavado uterino em recipiente imerso em gelo..... 69
- Figura 6 – Fluxograma experimental proposto para o estudo da atividade antiluteolítica no microambiente uterino. Sequência de questões experimentais..... 72
- Figura 7 – Médias das concentrações de $\text{PGF}_{2\alpha}$ produzidas por células BEND nas horas experimentais 0 (barras brancas) e 6 (barras pretas), não tratadas (Controle), tratadas com PdBu (100ng/mL) ou PdBu (100 ng/mL) associado à interferon-tau recombinante (50ng/mL). Valores não transformados (Médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM)..... 76
- Figura 8 – Médias das concentrações de $\text{PGF}_{2\alpha}$ produzidas após 6h por células BEND tratadas com 0, 6,25, 12,5, 25, 50 ou 100ng/mL de PdBu em três diferentes experimentos..... 80

Figura 9 – Percentual de inibição da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por PdBu em função do $\log_{10}$ da concentração de $\text{rbIFN-t} + 1$. Médias $\pm$ EPM (linha tracejada) curva de regressão (linha contínua).....	85
Figura 10 – Representação esquemática das etapas para a determinação da atividade antiluteolítica de uma amostra segundo o ensaio antiluteolítico proposto.....	89
Figura 11 – Percentual de inibição da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por 25 ng/mL de PdBu em células BEND em função da concentração total de proteínas presente no pool de lavados uterinos. Valores (linha tracejada) curva de regressão (linha contínua).....	94
Figura 12 – Percentual de inibição da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por 25 ng/mL de PdBu em células BEND em função do intervalo entre 3 e 18 $\mu\text{g/mL}$ de concentração total de proteínas presente no pool de lavados uterinos. Valores (linha tracejada) curva de regressão (linha contínua).....	95
Figura 13 – Percentual de inibição da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por PdBu em função do $\log_{10}$ da concentração de $\text{rbIFN-t} + 1$. Valores (linha tracejada) curva de regressão (linha contínua).....	96
Figura 14 – Percentual de inibição à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por 25 ng/mL de PdBu em células BEND em função da concentração total de proteínas presente no pool de meios condicionados por conceitos. Valores (linha tracejada) curva de regressão (linha contínua).....	98
Figura 15 – Percentual de inibição da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por 25 ng/mL de PdBu em células BEND em função do intervalo entre 3 e 18 ng/mL de concentração total de proteínas presente no pool de meio condicionado por conceitos. Valores (linha tracejada) curva de regressão (linha contínua).....	99
Figura 16 – Percentual de inibição da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por 25 ng/mL de PdBu em células BEND em função do $\log_{10} + 3$ da concentração total de proteínas do pool de lavados uterinos obtidos de fêmeas bovinas nos dias 14 (a), 16 (b) ou 18 (c) da gestação. Valores (linha tracejada) curva de regressão (linha contínua).....	106
Figura 17 – Percentual de inibição da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por PdBu em função do $\log_{10}$ da concentração de $\text{rbIFN-t} + 1$. Valores (linha tracejada) curva de regressão (linha contínua).....	108
Figura 18 – Percentual de inibição da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por 25 ng/mL de PdBu em células BEND em função do $\log_{10} + 3$ da concentração total de proteínas do pool de lavados uterinos obtidos de fêmeas bovinas nos dias 14 (a), 16 (b) ou 18 (c) do ciclo estral. Valores (linha tracejada) curva de regressão (linha contínua).....	110

Figura 19 – Percentual de inibição da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por 25 ng/mL de PdBu em células BEND em função do $\log_{10} + 3$ da concentração proteica do pool de lavados uterinos obtidos de fêmeas bovinas entre os dias 14 e 18 da gestação (linhas vermelhas) e da concentração proteica do pool de lavados uterinos obtidos de fêmeas bovinas entre os dias 14 e 18 do ciclo estral (linhas azuis). Valores (linha tracejada) curva de regressão (linha contínua)..... 111

Figura 20 – Modelo hipotético gráfico da modulação da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada pelo PdBu exercida por lavados uterinos obtidos de fêmeas cíclicas, ou por lavados uterinos obtidos de fêmeas prenhes ou por meio condicionado por conceito, observada em células BEND. Limitados pela chave está representado o estímulo farmacológico à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ exercido pelo PdBu. Elementos verdes representam mecanismos de inibição à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$; e elementos laranjas representam mecanismos de estímulo à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ 119

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Análise de variância dos quadrados mínimos da concentração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ produzida por células BEND não tratadas (controle), tratadas com PdBu (100ng/mL) ou PdBu (100 ng/mL) associado a interferon-tau recombinante (50ng/mL) 75
- Tabela 2 – Análise de variância dos quadrados mínimos da concentração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ produzida por células BEND tratadas com as seguintes concentrações de PdBu: 0, 6,25, 12,5, 25, 50 ou 100 ng/mL em três diferentes experimentos..... 79

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	por cento
°C	graus Celsius
Da	daltons
µg	micrograma
g	grama
<i>g</i>	gravidade
h	horas
Kg	quilograma
L	litro
mL	mililitro
mm	milímetro
MM	milimolar
ng	nanograma
pg	picograma
M	molar
rpm	rotações por minuto
UI	unidade internacional
UA	unidade antiluteolítica
<	menor
≤	menor ou igual
>	maior
≥	maior ou igual
IM	intramuscular
IV	intravenosa
³ H-PGF _{2α}	prostaglandina F _{2α} triciada

9K-PGR	Prostglandina 9- ceto redutase
AA	ácido araquidônico
BEND	células endometriais bovinas
bIFN- τ	interferon-tau bovino
BSA	albumina sérica bovina
calFN- τ	interferon-tau caprino
CL	corpo lúteo
CG	gonadotrofina coriônica
CNA	Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil
CO ₂	dióxido de carbono
COX	ciclooxigenase
COX-2	ciclooxigenase-2
DAG	diacilglicerol
E ₂	estradiol
FSH	hormônio folículo estimulante
GH	hormônio de crescimento
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofinas
hCG	gonadotrofina corionica humana
IFN	interferon
IFN- τ	interferon- tau
IFN- α	interferon-alfa
IFN- β	interferon-beta
IFN- ω	interferon-omega
IFN- κ	interferon-kappa
IFN- γ	interferon-gama
IP ₃	inositol trifosfato
LH	hormônio luteinizante
LLC	células luteínicas grandes

MEM	meio mínimo essencial
oIFN- τ	interferon-tau ovino
O ₂	oxigenio
OT	ocitocina
OTR	receptor para ocitocina
p	nível de significância
P ₄	progesterona
PAF	fator ativador de plaquetas
PBS	solução tampão de fosfato
PdBu	forbol 12,13 dibutirato
PG	prostaglandina
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PGF _{2α}	prostaglandina F _{2α}
PGF ₂ S	prostaglandina F ₂ sintase
PGFM	15 ceto-13,14-dihidro-prostaglandina F _{2α}
PGG ₂	prostaglandina G ₂
PGH ₂	prostaglandina H ₂
PGHS	prostaglandina endoperoxidase H sintase
PGI	prostaglandina I
PIP ₂	fosfatidilinositol bifosfato
PKA	proteína quinase A
PKC	proteína quinase C
PLA ₂	fosfolipase A ₂
PLC	fosfolipase C
rbIFN- τ	interferon-tau recombinante bovino
roIFN- τ	interferon-tau recombinante ovino
RE	receptores de estrógeno
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro

RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase por transcrição reversa
SLC	células luteínicas pequenas
TNF- α	fator de necrose tumoral α
UCRP	proteína de reação cruzada com ubiquitina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	26
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	30
2.1 CICLO ESTRAL E LUTEÓLISE.....	31
2.1.1 PGF_{2α} e Luteólise.....	35
2.2 RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO.....	43
2.2.1 Interferon-tau.....	45
2.2.2 Mecanismos de atuação do IFN-τ.....	49
2.2.3 Mensuração da expressão de IFN-τ.....	53
2.2.4 Ensaio de atividade antiluteolítica.....	57
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	60
3.1 MATERIAIS.....	60
3.2 TÉCNICAS UTILIZADAS.....	61
3.2.1 Cultivo de células BEND.....	61
3.2.2 Ensaio para PGF₂.....	62
3.2.3 Sincronização e observação de estro dos animais.....	64
3.2.4 Obtenção <i>ex vivo</i> de lavados uterinos e conceitos de fêmeas bovinas prenhes	64
3.2.5 Obtenção de meio condicionado por concepto.....	66
3.2.6. Obtenção <i>in vivo</i> de lavados uterinos de fêmeas prenhes e cíclicas.....	68
3.2.7. Ultracentrifugação.....	69
3.3 ESTUDOS REALIZADOS.....	70
3.3.1 Estudo 1. Modelo biológico.....	73

3.3.1.1 Delineamento experimental.....	74
3.3.1.2 Análises realizadas.....	74
3.3.1.3 Resultados e discussão.....	75
3.3.1.4 Conclusões do estudo.....	76
3.3.2 Estudo 2. Intensidade do estímulo.....	77
3.3.2.1 Delineamento experimental.....	77
3.3.2.2 Análises realizadas.....	78
3.3.2.3 Resultados e discussão.....	79
3.3.2.4 Conclusões do estudo.....	80
3.3.3 Estudo 3. Padrão de referência.....	81
3.3.3.1 Delineamento experimental.....	83
3.3.3.2 Análises realizadas.....	83
3.3.3.3 Resultados e discussão.....	85
3.3.3.4 Conclusões do estudo.....	87
3.3.4 Estudo 4. Validação.....	87
3.3.4.1 Delineamento experimental.....	90
3.3.4.2 Análises realizadas.....	92
3.3.4.3 Resultados e discussão.....	92
3.3.4.3.1 <i>Lavados uterinos obtidos ex vivo.....</i>	<i>93</i>
3.3.4.3.2 <i>Meios condicionados por conceptos.....</i>	<i>97</i>
3.3.4.4 Conclusões do estudo.....	101
3.3.5 Estudo 5. Atividade antiluteolítica no microambiente uterino durante o período crítico na gestação ou ciclo estral.....	102
3.3.5.1 Delineamento experimental.....	103
3.3.5.2 Análises realizadas.....	104
3.3.5.3 Resultados e discussão.....	105
3.3.5.4 Conclusões do estudo.....	112
4 DISCUSSÃO GERAL.....	114
5 SUMÁRIO DOS RESULTADOS E IMPLICAÇÕES.....	124
6 CONCLUSÃO.....	126

REFERENCIAS.....	127
-------------------------	------------

ANEXO.....	146
-------------------	------------

1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional humano resulta em crescente necessidade de maximizar a eficiência dos processos produtivos no sentido de suprir as demandas por alimento, o que aliado à extensiva ocupação territorial mundial com o objetivo produtivo, incrementa o desafio da produção de alimentos na sociedade moderna.

No decorrer da história a espécie bovina (*Bos taurus* – Linnaeus, 1758) foi submetida aos processos de domesticação e seleção, constituindo importante fonte alimentar para população humana. Atualmente o Brasil consagrou-se como um dos maiores produtores e exportadores de carne bovina, sendo detentor do maior rebanho comercial do mundo. De acordo com a Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil o valor bruto da produção de carne bovina no ano de 2005 foi de R\$ 30,6 bilhões, representando quase metade da participação da pecuária no produto interno bruto brasileiro.

Esse sistema produtivo animal é altamente influenciado pelos índices reprodutivos das fêmeas, as quais podem apresentar um ideal intervalo entre partos ao redor de 12 meses, garantindo um bezerro por vaca por ano. Contudo, apesar das cifras movimentadas pela pecuária nacional, o intervalo entre partos médio observado nos rebanhos brasileiros gira em torno de 22 meses. Conhecimentos adquiridos à cerca dos mecanismos reprodutivos nessa espécie podem fomentar o incremento nos indicadores produtivos desse setor e aumentar a oferta de nutrientes de alta qualidade a menores custos para a população humana.

Reconhece-se que o sucesso do processo reprodutivo depende de vários fatores inerentes aos animais, bem como de fatores externos. Dentre as condições

que podem influenciar esse sistema, a presente tese enfoca um mecanismo que segundo dados da literatura representa uma das maiores limitações biológicas para serem atingidos índices reprodutivos satisfatórios. Trata-se do evento conhecido como reconhecimento materno embrionário que ocorre no período de periimplantação e pode representar de 30 a 40% das perdas embrionárias nas fêmeas bovinas (DISKIN; SREENAN, 1980; HUMBLLOT 2001; SANTOS et al., 2004).

Sabe-se que nas fêmeas bovinas o ciclo estral se repete em intervalos médios de 21 dias, sendo a ovulação resultante do colapso do folículo dominante. A partir do folículo ovulado forma-se o corpo lúteo, constituído por células luteínicas que secretam a progesterona, hormônio fundamental à manutenção da gestação. O papel do útero na regulação da função do corpo lúteo na espécie bovina está bem estabelecido. O útero produz uma substância luteolítica, a qual determina a regressão funcional e estrutural do corpo lúteo ao final do ciclo estral, processo conhecido como luteólise. Esse mecanismo permite o começo de um novo ciclo na ausência de fertilização e assim, sucessivas oportunidades à concepção. Essa substância luteolítica é a prostaglandina F2 alfa ($\text{PGF}_{2\alpha}$), sintetizada primariamente pela região intercaruncular da superfície epitelial do endométrio (ASSELIN et al., 1996; KIM; FORTIER, 1995; SKARZYNSKI; MIYAMOTO. OKUDA, 2000). Através de um especializado arranjo veno-arterial, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ de origem uterina chega ao ovário por um mecanismo de contracorrente e promove a luteólise.

Entretanto, na ocorrência da concepção, o mecanismo luteolítico deve ser bloqueado para possibilitar o estabelecimento da gestação. Nos ruminantes ungulados como ovinos, caprinos e bovinos, observou-se que um grupo de proteínas produzidas pelo concepto (embrião e membranas extra-embrionárias) atua no endométrio para diminuir a liberação pulsátil de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e permitir a manutenção

funcional do corpo lúteo (BAZER; SPENCER; OTT, 1997; GODKIN et al., 1997; ROBERTS; CROSS; LEAMAN, 1992; THATCHER et al., 1997). Posteriormente observou-se que essas glicoproteínas pertencem à família dos interferons e ficaram conhecidas como interferon-tau (IFN- τ). Devido aos altos índices de mortalidade embrionária associados à falhas na adequada secreção de IFN- τ , torna-se evidente o interesse em desenvolver metodologias para mensurá-lo.

Usualmente a secreção de IFN- τ é mensurada com o uso de ensaios biológicos antivirais, tendo em vista que essa molécula possuiu tal atividade peculiar aos interferons. No entanto tal atividade pode não apresentar relação com a atividade de interesse ao cenário reprodutivo, ou seja, a inibição da síntese de PGF_{2 α} (atividade antiluteolítica) mediada pelo IFN- τ (PARENT et al., 2003).

O microambiente uterino é constituído pelas moléculas presentes no humor encontrado no lúmen uterino, tal composição determina a comunicação bioquímica entre a unidade materna e o conceito. A presença de um conceito deve determinar mudanças na composição desse líquido uterino em relação ao obtido na ausência do mesmo, tanto pela secreção de produtos trofoblásticos, como pela alteração do perfil endometrial de secreção induzido por sua presença. Sendo essa comunicação materno-embrionária estabelecida nesse microambiente uterino determinante ao destino da gestação, sugere-se que nesses humores encontram-se informações bioquímicas relevantes sobre o processo do reconhecimento materno da gestação nessa espécie, justificando seu estudo. Uma das moléculas que compoem o ambiente uterino, especialmente na gestação, é o IFN- τ .

A hipótese desse trabalho é que existe atividade antiluteolítica no microambiente uterino bovino e que essa atividade pode ser mensurada observando a inibição da síntese de PGF_{2 α} em um modelo biológico adequado.

Portanto, o objetivo geral desse estudo foi observar a atividade de IFN- τ no microambiente uterino através da mensuração da atividade antiluteolítica em fluidos biológicos obtidos no período inicial da gestação ou durante o ciclo estral de fêmeas bovinas, para tanto foram delimitados dois objetivos específicos.

O primeiro objetivo específico foi elaborar e validar um ensaio biológico capaz de mensurar a atividade inibitória à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$, e constituir mais uma ferramenta para a observação dessa molécula no contexto reprodutivo. Para tanto foram estruturados quatro estudos sequenciais. No estudo 1 objetivou-se comprovar a validade do uso das células BEND para observar a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$. No estudo 2 buscou-se definir um estímulo farmacológico consistente à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$. O estudo 3 teve como objetivo definir uma curva-padrão dessa resposta inibitória à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em função de um interferon-tau recombinante, e instruí-lo como solução de referência do ensaio antiluteolítico. No estudo 4 objetivou-se comprovar a validade do uso do ensaio biológico proposto para observar a atividade antiluteolítica presente em líquidos biológicos.

O segundo objetivo específico consistiu em observar a atividade antiluteolítica presente no microambiente uterino durante o período crítico para manutenção da gestação em fêmeas cíclicas ou gestantes, utilizando o ensaio antiluteolítico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Segundo o Comitê de Nomenclatura Reprodutiva Bovina (1972) o desenvolvimento de um novo indivíduo pode ser dividido em dois períodos. O período embrionário inicia-se no momento da fertilização e estende-se até o estágio de diferenciação sexual, durando em média 42 dias nessa espécie; e o período fetal compreende desse ponto ao nascimento do bezerro.

Estudos realizados na década de 70 indicaram que os principais desafios biológicos para o estabelecimento da prenhez nos rebanhos bovinos ocorreram no período embrionário, especialmente durante o período que ficou posteriormente conhecido como “período crítico”. Diskin e Sreenan (1980) relataram que as falhas de fertilização até o dia 8 pós-fertilização são responsáveis por 10% dos casos de fracasso reprodutivo, enquanto as mortes embrionárias entre os dias 8 e 16 pós-fertilização contribuem com mais de 30% dos referidos casos. Justificando os relatos de taxas de nascimento após única inseminação de 50 a 55% para novilhas (ROCHE; PRENDERVILLE; DAVIS, 1977; SREENAN; MULVEHILL, 1975; WISHART; YOUNG; DREW, 1977), de 52 a 57% para vacas de raças selecionadas para produção leiteira (MAWHINNEY; ROCHE, 1978) e de 53% para vacas de raças especializadas na produção de carne (ROCHE; PRENDERVILLE; DAVIS, 1977).

Ainda observou-se que em rebanhos bovinos selecionados para produção de leite, os índices reprodutivos chegam a ser ainda menores, especialmente se ao manejo estão associadas biotecnologias reprodutivas. Por exemplo, estudos utilizando transferência de embriões em vacas leiteiras lactantes de alta produção e diagnóstico precoce da gestação por ultrassonografia revelaram que menos de 50%

dos embriões viáveis estabelecem a gestação entre 27-30 dias após a ovulação (DROST et al., 1999; SARTORI et al., 2003).

Os índices de perdas embrionárias observados nos trabalhos consultados estão relacionados com falhas na sinalização da presença embrionária. Nesse período conhecido como “período crítico”, na fêmea cíclica ocorre o mecanismo que determina o final de um ciclo estral e o começo de um novo, a luteólise. Na ocorrência de uma gestação, a luteólise deve ser bloqueada através do reconhecimento materno da gestação, estabelecido bioquimicamente no microambiente uterino entre o conceito e a unidade materna.

Nessa revisão da literatura inicialmente são abordados conceitos sobre o ciclo estral nas fêmeas bovinas, especialmente sobre os mecanismos envolvidos na luteólise. Nessa seção ainda são apresentados conhecimentos sobre os mecanismos envolvidos na síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial.

Em seguida apresenta-se conhecimentos relativos ao reconhecimento materno da gestação nessa espécie, com ênfase na atuação do interferon-tau e nas metodologias utilizadas para o estudo da participação dessa molécula nesse processo fundamental ao êxito reprodutivo.

2.1 CICLO ESTRAL E LUTEÓLISE

O ciclo estral compreende um conjunto de eventos fisiológicos coordenados que ocorre no período entre dois estros consecutivos na maioria das espécies mamíferas. Em fêmeas bovinas a duração média do ciclo estral é de 21 dias,

variando de 17 a 25 dias (LAMOTHE-ZAVALITA; FREDRIKSSON; KINDHAL, 1991; SIROIS; FORTUNE, 1988), sendo relatada uma pequena porcentagem de animais com ciclos com duração maior que 25 dias (WISHART, 1972).

Nesse período, através de interações entre o sistema reprodutivo e o eixo hipotálamo-hipofisário, variações coordenadas das concentrações hormonais determinam a ocorrência média de duas ou três ondas de crescimento folicular nos ovários das fêmeas bovinas. O crescimento e maturação oocitária e folicular são caracterizados por uma série de transformações moleculares e celulares sequenciais no oócito e nas células da teca e da granulosa. Esses eventos são controlados por diversos fatores intraovarianos, intrafoliculares e sinais hormonais que determinam o desenvolvimento de um folículo dominante pré-ovulatório (HAFEZ, 2004).

A presença de um folículo pré-ovulatório e altas concentrações plasmáticas de estradiol (E_2) sintetizadas pelo mesmo, são determinantes para o desencadeamento de um pico pré-ovulatório de hormônio luteinizante (LH) secretado pela hipófise, e para o evento da ovulação. Na ovulação ocorre a ruptura da membrana folicular e a expulsão do oócito que é captado pelas fímbrias da tuba uterina. Após a ovulação a parede do folículo ovulado é colapsada e a cavidade invadida por linfa e sangue provenientes dos capilares. Esse conjunto de componentes, juntamente com as células remanescentes do folículo ovulado, formarão inicialmente uma estrutura denominada de corpo hemorrágico (DIAZ et al., 2002).

Esse corpo hemorrágico reorganiza-se para formar o corpo lúteo (CL) sob influência de vários fatores angiogênicos, mitogênicos e de crescimento dentre outros (GOSPODAROWICZ; CHENG; LUI, 1985; GRAZUL-BILSKA; REDMER; KILLILEA, 1984; REDMER; REYNOLDS, 1996; SCHAMS; BERISHA, 2004; SUH,

HUNT; SPENCER, 1992). Estudos realizados destacaram a participação de componentes do sistema do fator de crescimento endotelial vascular (GARRIDO; SAULE; GOSPODAROWICZ, 1998; BERISHA et al., 2000), do fator de crescimento fibroblástico (SCHAMS et al., 1994), de componentes do sistema do fator de crescimento semelhante à insulina (PERKS; PETERS; WATHES, 1999; SCHAMS; BERISHA, 2002; WOAD et al., 2000), e de membros da família das angiopoetinas (GOEDE et al., 1998; YANCOPOULOS et al., 2000).

A presença de um corpo sólido amarelo no ovário foi relatada pela primeira vez por Coiter (1573), mas foi DeGraaf (1672) quem notou que eles relacionavam-se com o número de fetos presentes no útero. Posteriormente Malpighi (1689) forneceu um relato dos aspectos microscópicos desses e definiu-os como corpos lúteos. Entretanto a função endócrina do corpo lúteo foi observada quando Corner e Allen (1929) e Allen e Corner (1930) prepararam um extrato alcoólico relativamente puro de corpos lúteos de porcas e observaram que esse extrato mantinha a gestação em ratas ovariectomizadas. Alguns anos depois, o isolamento do hormônio puro foi relatado por quatro grupos (BUTENANDT; WESTPHAL, 1934; SLOTTA; RUSCHIG; FELS, 1934; WINTERSTEINER; ALLEN, 1934). Slotta, Ruschig e Fels (1934) descreveram a fórmula estrutural e nomearam de progesterona (P_4), a qual foi sintetizada por Butenandt e Westphal (1934).

Na maioria dos mamíferos as células granulosas remanescentes originam as grandes células luteais (LLC; Large Luteal Cells), e as da teca originam as pequenas células luteais (SLC; Small Luteal Cells). As SLC se caracterizam por medirem menos que 20 μ m, liberarem baixas concentrações de progesterona e serem responsivas ao LH. As LLC medem de 20-30 μ m, produzem altas quantidades de

progesterona e não são responsivas à estimulação com LH (FITZ; MAYAN; SAWYER, 1982; KOSS; HANSEL, 1981).

Os principais efeitos da progesterona produzida pelo CL são observados no sistema reprodutivo e no eixo hipotálamo-hipofisário (NISWENDER; JUENGEL; SILVA, 2000). Em geral, as ações da progesterona no trato reprodutivo estão relacionadas à preparação do mesmo para o desenvolvimento do conceito. No endométrio, a progesterona induz a diferenciação das células do estroma, estimula a secreção glandular, promove o acúmulo de vacúolos basais no epitélio glandular (MASLAR; POWERS-CRADDOCK; ANSBACHER, 1986), altera o padrão de secreção das proteínas das células endometriais (STRINDEN; SHAPIRO, 1983) e induz ao relaxamento do miométrio (NISWENDER; JUENGEL; SILVA, 2000).

Nas fêmeas bovinas, o CL está funcionalmente presente em média do dia 4 ao dia 17 do ciclo estral. Caso não ocorra a fertilização, torna-se necessária à regressão do CL. Tal processo fisiológico determina um declínio nas concentrações plasmáticas de progesterona, possibilitando um aumento da frequência dos pulsos de LH nos últimos dias do ciclo estral (HAFEZ, 2004).

A importância do útero no controle da regressão do corpo lúteo foi inicialmente relatada por Loeb (1923) e Loeb (1927) ao observar que a histerectomia em fêmeas de porcos-da-índia causava uma persistência do corpo lúteo. Posteriormente outros autores observaram o mesmo efeito em ovelhas, vacas, porcas, éguas, e ratas (ANDERSON; BLAND; MELAMPY, 1969).

Diversos trabalhos realizados a partir da década de 70 estudaram o papel do útero na regulação da função ovariana. Nesses verificou-se que a histerectomia prolonga a função luteal (HORTON; POYSER, 1976); a pulsatilidade secretória de $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial aumenta próximo ao momento da luteólise (CONCANNON et al.,

1988; THORNBURN; COX; CURRIE, 1973;); a $\text{PGF}_{2\alpha}$ exógena ou análogos promovem a luteólise (FLINT; SHEDRICK, 1985) e a imunização contra $\text{PGF}_{2\alpha}$ também prolonga a fase luteínica (FAIRCLOUGH; SMITH; MCGOWAN, 1981; SCARAMUZZI; BAIRD, 1976). Kindhal, Lindell e Edqvist (1981) relataram que a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo útero se apresenta em pulsos com curta duração por 2 a 3 dias. Os trabalhos de McCracken, Schramm e Okulicz (1984) e Wolfelson et al. (1985) observaram que o padrão pulsátil de liberação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ é essencial para regressão do CL em ruminantes. Sabe-se que a $\text{PGF}_{2\alpha}$ é secretada primariamente pelo epitélio endometrial glandular e luminal (ASSELIN et al., 1996; KIM; FORTIER, 1995; SKARZYNSKI; MIYAMOTO; OKUDA, 2000).

2.1.1 $\text{PGF}_{2\alpha}$ e Luteólise

As prostaglandinas, substâncias que pertencem à classe bioquímica dos lipídeos, subclasse dos eicosanóides, são ácidos graxos polinsaturados com 20 átomos de carbono em sua estrutura básica. São moléculas bioativas que atuam como mensageiros de curta distância, afetando os tecidos próximos das células que os produzem. De uma maneira geral são sintetizadas em resposta a estímulos hormonais ou outros, os quais ativam a fosfolipase A_2 (PLA_2), presente na maioria dos tipos celulares de mamíferos, liberando ácido araquidônico (AA) a partir dos fosfolipídios da membrana celular. Enzimas presentes no retículo endoplasmático liso convertem o AA em prostaglandinas em um processo que se inicia com a formação de prostaglandina H_2 (PGH_2), o precursor imediato das prostaglandinas.

As duas reações que levam até a formação de PGH_2 envolvem a adição de oxigênio molecular e são catalisadas por uma enzima bifuncional, a cicloxigenase (COX) também chamada de prostaglandina H_2 sintase (PGH_2S). No primeiro dos dois passos a atividade da cicloxigenase introduz oxigênio molecular convertendo o AA em prostaglandina G_2 (PGG_2). O segundo passo, catalisado pela atividade peroxidase da enzima bifuncional converte PGG_2 em PGH_2 . A partir desse ponto, a atuação de enzimas especializadas convertem a PGH_2 nas formas de $\text{PGF}_{2\alpha}$, prostaglandina E_2 (PGE_2) ou prostaglandina I (PGI) (NELSON; COX, 2002). Sabe-se que as prostaglandinas apresentam vida média muito breve *in vivo* devido à sua instabilidade química e inativação local e pulmonar pelas PGDHs (PACE-ASCIAC 1980). O catabolismo de $\text{PGF}_{2\alpha}$ é feito primariamente nos pulmões, mas a expressão de 15-hidroxiprostaglandina dehidrogenase (HPGD), enzima catalisadora de $\text{PGF}_{2\alpha}$, também conhecida como 15-PGDH em tecidos periféricos sugerem que um catabolismo local pode contribuir para a regulação periférica da ação da $\text{PGF}_{2\alpha}$. No útero bovino foi demonstrado por Parent e colaboradores (2006) a localização por imunohistoquímica de PGDH especialmente nas células epiteliais glandulares e em menor expressão nas células epiteliais e estromais, tanto durante o ciclo estral quanto no período inicial da gestação. Ainda nesse trabalho observou-se que durante o ciclo estral a maior expressão de PGDH é entre os dias 16-18 pós-estro. A co-localização no epitélio glandular tanto da PGDH quanto da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ permite sugerir que existe um mecanismo de regulação e controle por catabolismo no tecido endometrial.

Além da regulação da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelos mecanismos catabólicos, esse sistema ainda é controlado pelas características de mobilidade dessa molécula. Observa-se que em contraste ao rápido efluxo celular de PG observado, o influxo na

maioria das células é lento e parece ser mediado por transportadores específicos, transportadores de solutos aniônicos orgânicos nomeados de transportadores para PG (PGT) (SCHUSTER 1998; SCHUSTER 2002; revisado em HELIWELL et al., 2006). Devido à sua característica polar as PGs necessitam de um mecanismo de transporte para entrar na célula. Os PGTs tem sido clonado para ratos (KANAI et al., 1995), humanos (LU et al., 1996) e camundongos (PUCCI; BAO; CHAN 1999). Resumidamente os PGT removem a PG do espaço extracelular e entregam à PGHD (BAO et al., 2002; NOMURA et al., 2004; SCHUSTER 1998;) resultando em oxidação e inativação molecular.

Apesar da reconhecida importância do controle da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ na luteólise, ainda não foram elucidados todos os mecanismos pelos quais este controle da síntese endometrial é realizado. Hormônios como o estradiol (THATCHER et al., 1986), progesterona, OT (SILVIA et al., 1991) e LH (CANINO et al., 1999) dentre outros parecem estar envolvidos na regulação da luteólise.

A importância da ocitocina (OT) no controle da luteólise em vacas foi reportado pela primeira vez por Armstrong e Hansel (1959) ao observar que a OT exógena provocava a luteólise. Diversos trabalhos seguintes relataram que a secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada pela ocitocina estava associada com a atividade da proteína quinase C (PKC; BURNS et al., 1997; KIM; FORTIER, 1995; SKARZYNSKI MIYAMOTO; OKUDA, 2000) e com a expressão gênica de diversas enzimas envolvidas na síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ como PLA_2 , prostaglandina F_2 sintase (PGF_2S) e COX-2 (ASSELIN; DROLET; FORTIER, 1998; LAFRANCE; GOFF, 1990).

No modelo celular da biossíntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ a partir do AA, descrito por Burns et al. (1997; Figura 1), a OT de origem hipofisária se liga ao seu receptor (OTR) transmembrânico na célula endometrial que está acoplado à uma proteína G. Tal

ligação promove a ativação da enzima fosfolipase C (PLC). A PLC cliva o fosfatidil inositol bifosfato presente na membrana produzindo inositol trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 se liga a receptores específicos no retículo endoplasmático resultando na liberação de cálcio dos estoques para o citoplasma. O DAG ativa a proteína quinase C (PKC), fundamental à uma cascata de fosforilações no citosol, principalmente da proteína PLA_2 . A PLA_2 ativada transloca-se para membrana onde estão localizados seus substratos lipídicos (CLARK et al., 1991) e disponibiliza AA a partir dos lipídeos de membrana. O ácido araquidônico livre no citoplasma é convertido em PGH_2 pela enzima COX-2. Finalmente a enzima PGF_2S , presente no endométrio bovino (XIAO et al., 1998) converte a PGH_2 em $PGF_{2\alpha}$ que é então liberada na circulação uterina (SMITH; MARNETT; DE WITT, 1991). Contudo reconhece-se que existe outra via de síntese da $PGF_{2\alpha}$ que envolve a participação da enzima PGE_2 -ceto-redutase (9K-PGR), uma enzima NADPH-dependente que catalisa a conversão de PGE_2 em $PGF_{2\alpha}$ presente no endométrio bovino (ASSELIN; FORTIER, 2000).

Figura 1 – Representação esquemática da biossíntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ a partir do ácido araquidônico nas células endometriais bovinas, segundo modelo proposto por Burns et al., 1997, adaptado a partir de Bertan 2004. (consultar texto para detalhes).

O papel da progesterona na luteólise também tem sido estudado. Observa-se que a suplementação com progesterona no início do ciclo estral (antes das elevações plasmáticas fisiológicas) resulta em luteólise prematura (WOODY; FIRST; POPE, 1967), enquanto o bloqueio da ação da progesterona pelo uso de um antagonista no período luteal determina o atraso da luteólise (MORGAN et al., 1993). Ainda, alguns autores tem relatado que a progesterona exerce um efeito inibitório indireto à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ durante o início e meio da fase luteal, através da inibição da expressão de OTR (JENNER; PARKINSON; LAMMING, 1991; STEVENSON et

al., 1994; WHATES; HAMON, 1993). Após aproximadamente 12 dias de exposição contínua à progesterona, nas fêmeas ovinas (VALLET; LAMMING; BATTEN, 1990; WHATES et al., 1996) e bovinas (LAFRANCE; GOFF, 1988), observa-se que a regulação negativa na expressão de OTR é perdida, possivelmente devido à diminuição nos receptores de progesterona (SPENCER; BAZER, 1995), e assim o útero torna-se responsivo à OT.

Outros pesquisadores tem estudado a participação do estradiol no controle da síntese endometrial de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Thatcher et al. (1986) administraram estradiol em vacas no 13º dia do ciclo estral e verificaram a ocorrência de luteólise seguida da manifestação de estro. A administração de estradiol no meio da fase luteínica antecipou a luteólise em bovinos (GENGENBACH; HIXON; HANSEL, 1977; HANSEL; CONCANNON; LUKASZEWSKA, 1973). A ablação de folículos ovarianos por irradiação ou cauterização, procedimentos que ocasionam uma supressão do estradiol circulante, retardou a luteólise em ruminantes (HUGHES et al., 1987; KARSH et al., 1970; VILLA-GODOY et al., 1981). Salfen et al. (1999) verificaram atraso na luteólise em vacas cujo desenvolvimento da segunda onda folicular foi inibido. Esses dados permitiram sugerir que tanto o estradiol endógeno como o exógeno são capazes de induzir a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ uterina (HANSEL; CONCANNON; LUKASZEWSKA, 1973) causando diminuição na progesterona circulante e regressão do CL (AULETA; FLINT, 1988). Ainda McCracken, Custer e Lamsa (1999) sugerem que o estradiol, tendo sua ação tecidual retomada após a diminuição da ação da progesterona, aumentaria os receptores endometriais para a OT e estimularia a secreção de OT no hipotálamo. De fato, demonstrou-se com uma série de estudos *in vivo* que o estradiol é capaz de estimular a expressão dos receptores endometriais de OT (BEARD; LAMMING, 1994; HIXON; FLINT, 1987;

SPENCER et al., 1995). Uma outra possibilidade para ação indireta do estradiol na síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ é através da indução da produção e/ou ativação dos receptores de LH no endométrio, permitindo a ligação do LH a receptores estimulando a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (BERTAN, 2004). Alguns estudos fundamentam tal possibilidade. O endométrio bovino apresenta receptores LH/hCG em grande quantidade entre os dias 15 a 17 do ciclo estral que desaparecem logo após a luteólise (FRIEDMAN; GUREVICH; SHEMESH, 1995; SHEMESH et al., 1996a; SHEMESH et al., 1996b). Canino et al. (1999) avaliaram a associação do LH ao estradiol no processo de síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Nesse estudo, vacas ovariectomizadas pré-tratadas com progesterona receberam uma injeção de estradiol que promoveu a liberação de 15-ceto-13,14-dihidroprostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ (PGFM- principal metabólito da $\text{PGF}_{2\alpha}$ mensurável na circulação sistêmica). Injeções de gonadotrofina coriônica humana (hCG; um antagonista de LH) 4 horas após a injeção de estradiol estimularam uma resposta de PGFM muito maior. Contudo, quando o hCG foi administrado na ausência do pré-tratamento com estradiol não houve estímulo à liberação de PGFM. No mesmo estudo, injeções de GnRH estimularam a secreção de PGFM exclusivamente em vacas pré-tratadas com estradiol.

Apesar dos estudos já realizados, não são compreendidos todos os mecanismos que controlam a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial, mas acredita-se que uma ação hormonal coordenada desencadeie a luteólise (GOFF, 2004).

Sabe-se que nos ruminantes aproximadamente 98% da $\text{PGF}_{2\alpha}$ produzida pelo útero é metabolizada em PGFM na primeira passagem pelos pulmões (PIPER; VANE; WILLIE, 1970). Observa-se nesses animais um interessante mecanismo anatômico pelo qual a $\text{PGF}_{2\alpha}$ de origem endometrial atinge o ovário antes de ser metabolizada. Ginther e Del Campo (1974) observaram que a artéria ovariana

apresenta formato tortuoso e encontra-se enovelada à superfície da veia útero-ovariana nos bovinos. Através desse peculiar arranjo veno-arterial a $\text{PGF}_{2\alpha}$ passa do retorno venoso uterino à circulação arterial ovariana e chega ao CL.

Relatou-se que a $\text{PGF}_{2\alpha}$ atua através de receptores de superfície celular com sete domínios transmembrânicos acoplados à proteína G ativando a sinalização intracelular via fosfatidil inositol (NARUMIYA; FITZGERALD, 2001; TSUBOI; SUGIMOTO; ICHIKAWA, 2002). Foram caracterizados receptores de alta e baixa capacidade de ligação à $\text{PGF}_{2\alpha}$ no CL. Nessa espécie, o RNA mensageiro (RNAm) para os receptores de $\text{PGF}_{2\alpha}$ foi identificado nas SLC, LLC e células endoteliais ovarianas (MAMLUCK et al., 1998). Em ovinos observou-se que as SLC apresentam receptores com baixa afinidade para a $\text{PGF}_{2\alpha}$ enquanto as LLC possuem receptores de alta e baixa afinidade pela $\text{PGF}_{2\alpha}$ (JUENGEL; MEBERG; TURZILLLO, 1995; JUENGEL; NETT; TANDESKI, 1995).

Ao interagir com seus receptores no CL, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ bloqueia a síntese de P_4 e causa a luteólise funcional (CARAMBULA et al., 2002). Acredita-se que a $\text{PGF}_{2\alpha}$ se liga a receptores específicos na membrana das células luteais esteroidogênicas e estimula a atividade da PKC, que atua de diversas maneiras: diminuindo a captação e o transporte de colesterol para o citoplasma e para a mitocôndria, mediando a ação antiesteroidogênica da $\text{PGF}_{2\alpha}$ nas LLC (ZAMBETTI; LEVINE, 1993); determinando a falência da produção de progesterona pelo CL acompanhada por uma regulação negativa nos receptores de LH (NISWENDER, 2002); e possivelmente aumentando a expressão e ativação das proteínas envolvidas no processo de apoptose celular (SCHWARTZMAN; CIDLOWSKI, 1993).

2.2 RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO

A expressão reconhecimento materno da gestação foi definida por Roger Short em 1969 e se tornou conhecida como o processo pelo qual o conceito sinaliza sua presença à unidade materna prolongando a vida do corpo lúteo (CL), mantendo a gestação através de um diálogo bioquímico que se estabelece entre o conceito e o tecido endometrial nas diversas espécies mamíferas (revisado por SPENCER; BAZER, 2004).

A implantação do blastocisto junto ao útero materno é uma adaptação embrionária associada com a viviparidade requerida para sustentar a nutrição e a proteção do conceito durante a gestação (SPENCER et al., 2004). Nas espécies mamíferas diferentes estratégias estão envolvidas no processo de implantação. Por exemplo, nas fêmeas de roedores, primatas e humanos os blastocistos implantam rapidamente no endométrio materno antes de expandirem e serem formadas as membranas embrionárias (CARSON et al., 2000), enquanto nos ruminantes domésticos o blastocisto passa da forma esférica para tubular, alonga-se rapidamente e são formadas as membranas embrionárias antes da implantação (SPENCER et al., 2004). Observou-se que a evolução no tipo de placentação nas espécies mamíferas tem sido determinante no estabelecimento do caminho pelo qual o conceito deve sinalizar sua presença à mãe (ROBERTS; LIU; ALEXENKO, 1997). Entende-se como placentação, a forma com que as membranas associadas ao feto se desenvolvem e se associam ao endométrio (BJÖRKMAN, 1976).

Em ruminantes artiodáctilos (i.e. bovinos, caprinos, ovinos, cervídeos) os mecanismos que mantêm o CL parecem ser únicos a esse grupo de mamíferos nos

quais a implantação é tanto temporalmente tardia, quanto superficial na sua extensão. Nestas espécies a placentação é do tipo sinepiteliocorial quanto às camadas teciduais da barreira materno-fetal, um processo de implantação levemente invasivo, onde seis camadas teciduais (endotélio materno, tecido conjuntivo materno, epitélio materno, trofoblasto, tecido conjuntivo embrionário e endotélio embrionário) separam as circulações fetal e materna (LEISER; KAUFMANN, 1994; WOODING, 1992).

Os resultados obtidos nos experimentos de Moor e Rowson (1964; 1966), e de Martal e colaboradores no final dos anos 70 (MARTAL et al., 1979) mostraram que a manutenção do CL em ovinos é conseqüente da atuação de fatores produzidos pelo concepto no endométrio materno. Outros estudos na década de 80 demonstraram que a infusão de proteínas secretadas por conceptos no útero bovino promoviam a extensão da vida do corpo lúteo (HELMER et al., 1989; KNICKERBOCKER et al., 1986,). Esse agente antiluteolítico inicialmente foi denominado de trofoblastina (MARTAL et al., 1979) ou proteína trofoblástica-1 (BARTOL et al., 1985; GODKIN; BAZER; ROBERTS, 1984). Na década de 90, a clonagem e sequenciamento desses fatores revelou sua semelhança estrutural com um grupo de glicoproteínas conhecidas como interferon (IFN) tipo I (IMAKAWA et al., 1997). Ainda observou-se que esses interferons produzidos pelos conceptos apresentavam atividades peculiares aos IFN tipo I como atividade antiviral, antiproliferativa e imunomodulatória, e foram nomeados de interferon-tau (IFN- τ) por sua origem trofoblástica (ROBERTS; CROSS; LEAMAN, 1992). Diversos autores observaram posteriormente que IFN recombinante prolonga a vida do CL em ovinos, caprinos e bovinos (L'HARIDON et al., 1995; MARTAL et al., 1990; MEYER et al., 1995; OTT et al., 1993).

2.2.1 Interferon-tau

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

Alguns estudos identificaram diversas proteínas tipo IFN inicialmente em humanos. O interferon-alfa (IFN- α), interferon leucocitário alfa, que é composto por 12 proteínas distintas, no entanto relacionadas, conhecidas como subtipos de IFN- α , contendo de 165 a 166 aminoácidos (NAGATA; MANTEI; WEISSMANN, 1980). O interferon beta (IFN- β), interferon fibroblástico beta, que é molécula única composta por 166 aminoácidos (TANIGUCHI et al., 1980). O interferon-ômega (IFN- ω) é molécula de 172 a 174 aminoácidos também presente em leucócitos (CAPON et al., 1985; HAUPTMANN; SWETLY, 1985). O interferon-kappa (IFN- κ) é interferon derivado de queratinócito (LAFLEUR, 2001; NARDELLI et al., 2000).

Na espécie bovina foram identificados múltiplos subtipos de IFN- α , IFN- β , IFN- ω e ainda observou-se a expressão de interferon-tau (IFN- τ), responsável pelo reconhecimento materno nessa espécie (ROBERTS; CROSS; LEAMAN, 1992; ROBERTS et al., 1999). Genes que codificam IFN- τ foram identificados apenas em ruminantes (LEAMAN; ROBERTS, 1994). Acredita-se que os genes para IFN- τ tenham evoluído de um IFN- ω ancestral há aproximadamente 36 milhões de anos, no momento da divergência dos ruminantes pecoran (ovinos, caprinos, bovinos, antílopes, cervídeos, girafas) dos outros artiodáctilos (suínos, lhamas e camelídeos)

(ROBERTS et al., 1999). Observou-se que as famílias de genes para IFN sofrem extensas duplicações originando múltiplas isoformas proteicas de IFN- α , - ω e - τ (revisado em DEMMERS; DERECKA; FLINT, 2001), e que todos os genes não apresentam íntrons e são notadamente conservados através das quatro espécies de bovídeos (FINDLAY, 1994).

Apesar das diferenças na sequência de aminoácidos, IFN- α , IFN- β , IFN- ω , IFN- κ e o IFN- τ apresentam estrutura tridimensional semelhante, compostas basicamente por regiões α -hélices arranjadas em uma “trouxa” compacta (Figura 2., ROBERTS et al., 1999). Tal característica estrutural, associada às propriedades biofísicas e atividades biológicas comuns, como estabilidade de atividade em pH ácido e reconhecimento de classes comuns de receptores de superfície celular (MOGENSEN et al., 1999), determinaram a designação coletiva dessas moléculas como IFN tipo I.

Figura 2 – Modelos moleculares estruturais do IFN- α humano e IFN- τ ovino. Em (a) e (c) observa-se, respectivamente, as vistas lateral e dorsal da molécula de IFN- α humano. Em (b) encontra-se representada a molécula de IFN- τ ovina. Estão evidenciadas as hélices principais e extremidades amino- e carboxi-terminal dessas moléculas (ROBERTS et al., 1999)

Um IFN estruturalmente distinto, conhecido originalmente como IFN imune devido a sua origem nas células-T foi clonado em 1982 (GRAY; LEUNG; PENICA, 1982). Diferente do tipo I, este é um homodímero, com domínios em hélice em cada região promotora arranjado de forma similar ao IFN- β (EALICK et al., 1991). Esse IFN é conhecido como IFN-gama (IFN- γ). Devido à sua ligação a receptores diferentes dos observados para os IFN tipo I (AGUET, 1990; MOGENSEN et al., 1999) esse foi classificado como IFN tipo II.

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

Após a purificação das proteínas secretadas por conceptos ovinos, Godkin et al. (1982) observaram que o interferon-tau ovino (oIFN- τ) apresenta-se em diversas isoformas proteicas com peso molecular de aproximadamente 18000 Da, sem a presença de glicosilação. Já as isoformas de interferon-tau bovino (bIFN- τ) apresentam peso molecular entre 22000 e 24000 Da e glicosilações com oligossacarídeos ligados à extremidade amino (revisado em DEMMERS; DERECKA; FLINT, 2001). Posteriormente descobriu-se que múltiplos genes que codificam IFN- τ são transcritos durante o período inicial da gestação em bovinos, ovinos e caprinos e

codificam proteínas que podem possuir atividades biológicas diferentes (EALY et al., 1998; EALY et al., 2001; WINKELMAN et al., 1999). Estudos recentes apresentaram que existem 18 isoformas de IFN- τ isolados na espécie ovina e 12 formas na espécie bovina (ALEXENKO et al., 2000). A razão para a transcrição de múltiplas isoformas de IFN- τ permanece desconhecida. No entanto sugere-se que seja a tentativa de estabelecer um mecanismo que amplifique a produção dessa proteína nesse período, ou que tais isoformas diferentes desempenhem distintas atividades como hormônios da gestação nas espécies (EALY et al., 2004; MARTAL et al., 1990).

Observou-se que o IFN- τ é expresso apenas pelas células do trofotoderma extra-embrionário (FARIN; IMAKAWA; ROBERTS 1989; GODKIN; BAZER; ROBERTS, 1984; GUILLOMOT et al., 1990), sendo a proteína mais intensamente secretada pelos conceptos ovinos nesse período (MARTAL et al., 1979; ROBERTS; CROSS; LEAMAN 1992). Alguns autores observaram que o IFN- τ já está expresso constitutivamente no trofotoderma no estágio de blastocisto em bovinos (sétimo dia), mas em níveis bastantes inferiores aos observados nos dias seguintes (HERNANDEZ-LEDEZMA et al., 1992; KUBISCH; LARSON; ROBERTS, 1998). Em ovinos, no décimo segundo dia da gestação observa-se uma produção média de oIFN- τ de 1 a 2 $\mu\text{g}/\text{dia}$, enquanto a produção máxima é observada entre os dias 14 e 16 da gestação, de 20 a 200 $\mu\text{g}/\text{dia}$ (ASHWORTH; BAZER, 1989). Nos bovinos observa-se que a secreção de IFN- τ pelo trofotoderma inicia-se ao redor do sétimo dia de gestação, atingindo o pico máximo entre os dias 17 e 22 (BARTOL et al., 1985; GEISERT et al., 1988).

2.2.2 Mecanismos de atuação do IFN- τ

De maneira geral as respostas biológicas aos interferons são iniciadas pela ligação desses aos receptores de superfície celular específicos e pela subsequente ativação de vias de transdução de sinal citoplasmáticas, ativando a expressão de diversos genes regulados por IFN (SEN; LENGYEL, 1992; STARK et al., 1998). Observou-se que células endometriais expressam as subunidades IFNAR1 e IFNAR2 (KALUZ et al., 1996). A união do IFN ao seu receptor desencadeia fosforilações intracelulares que ativam transdutores de sinais ativadores de transcrição (STAT) e elementos regulatórios de interferon (IRE) que se ligam à elementos de resposta estimulados por interferon (ISRE) nos genes que o possuem (DARNELL, 1997; HARDA et al., 1989; REID et al., 1989).

O mecanismo geral pelo qual o IFN- τ inibe a regressão do CL é a supressão da liberação pulsátil de PGF_{2 α} endometrial. Em ovinos, sabe-se que o interferon-tau ovino (oIFN- τ) produzido pelo embrião atua de maneira parácrina no tecido materno suprimindo a transcrição de genes para receptores de ocitocina (OTR) e de receptores para estradiol (ER) no endométrio (LAMMING et al., 1995; SPENCER; BAZER, 1995). Ainda, os aumentos na expressão dos genes para OTR e ER detectados nas fêmeas ovinas cíclicas entre os dias 11 e 17 pós-estro não ocorrem em fêmeas gestantes (SPENCER; BAZER, 1995) ou em fêmeas cíclicas que receberam infusão uterina de IFN- τ (SPENCER et al., 1995). Acredita-se que através da inibição de ER, o IFN- τ iniba a regulação positiva nos OTR. Com essa mudança fenotípica da célula endometrial, a ocitocina (OT) de origem hipofisária ou luteal não

terá possibilidade de atuar e promover a liberação dos pulsos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ essenciais à luteólise.

Alguns estudos observaram o efeito de $\text{IFN-}\tau$ na inibição da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em explantes endometriais (HELMER et al., 1987; HELMER et al., 1989; MEYER et al., 1995) e em células endometriais epiteliais (DANET-DESNOYERS et al., 1994; GODKIN et al., 1997; XIAO et al., 1998) nas fêmeas bovinas. No entanto nessa espécie a relação entre $\text{IFN-}\tau$, receptor de estrógeno (ER) e de ocitocina (OTR) ainda não é clara, sendo que o $\text{IFN-}\tau$ pode inibir diretamente a expressão de OTR (KIMMINS; MACLAREN, 2001; ROBINSON et al., 2001). Inicialmente observaram-se diferenças significativas na expressão de OTR endometrial entre as fêmeas bovinas prenhes e cíclicas (FUCHS et al., 1990; JENNER; PARKINSON E LAMMING 1991), sugerindo que o $\text{IFN-}\tau$ secretado pelo conceito suprime a expressão de OTR. A observação de que o interferon-tau recombinante inibe a expressão de OTR em explantes endometriais em cultivo apóia esse conceito (HORN et al., 1998; LEUNG et al., 2001). Recentemente Robinson et al. (2001) estudaram a expressão de receptores para OT, E_2 e P4 no endométrio bovino durante o ciclo estral ou período inicial da gestação através de hibridização *in situ* e imunohistoquímica. Nesse não detectou-se a expressão de RNA mensageiro (RNAm) para OTR entre os dias 12 e 18 após o estro no endométrio de fêmeas bovinas gestantes. Entretanto a presença de um conceito não teve efeito na expressão de RNAm para ER no epitélio luminal uterino, glândulas superficiais ou estroma subepitelial entre os dias 12 e 14 pós-estro. Contudo entre os dias 16 e 18, observa-se um aumento nas concentrações de RNAm para ER no epitélio luminal de fêmeas cíclicas, enquanto nas fêmeas gestantes nota-se um declínio, tornando-se indetectável no décimo oitavo dia. Esses resultados indicam que $\text{IFN-}\tau$ não inibe os OTR indiretamente via ER nas fêmeas

bovinas. Sabe-se que a região promotora do gene para OTR contém um elemento de resposta à interferon (ISRE) onde se ligam fatores regulatórios de interferon (IRF)-1 e -2 (BATHGATE; TILMANN; IVELL, 1998), portanto supõe-se que o IFN- τ possa inibir diretamente a expressão de OTR.

Outros autores apontam possíveis mecanismos de ação antiluteolítica nos bovinos nos quais o interferon-tau bovino (bIFN- τ) atua modulando a expressão de genes endometriais e conseqüentemente a síntese de proteínas que podem bloquear a síntese de PGF_{2 α} (BINELLI et al., 2000; SCHAFER-SÖMI, 2003; THATCHER et al., 1997). Foi observado por Austin et al. (1996) e Johnson et al., (1998) que o IFN- τ induz a síntese de UCRP (proteína de reação cruzada com ubiquitina), proteína que realiza degradação proteossomal, sugerindo que o IFN- τ possa atuar intensificando a degradação de PKC.

Ainda especula-se que o IFN- τ possa inibir a luteólise alterando a produção de PGF_{2 α} luteolítica para PGE₂ que é luteotrópica (ASSELIN; FORTIER, 2000). Foi observado que o IFN- τ regula negativamente a expressão das enzimas prostaglandina F₂ sintase (PGF₂S) e prostaglandina ceto-redutase (9K-PGR) prevenindo a produção de PGF_{2 α} endometrial (ASSELIN; FORTIER, 2000; LAFRANCE; GOFF, 1990). Enquanto nas células estromais, consideradas como fonte primária de PGE₂ (ASSELIN; DROLET; FORTIER, 1998; KIM; FORTIER, 1995), o IFN- τ estimula a expressão de COX-2 (XIAO et al., 1998).

Os mecanismos pelos quais o IFN- τ inibe a síntese endometrial de PGF_{2 α} ainda não são completamente esclarecidos. No entanto, sendo a inibição da síntese de PGF_{2 α} mediada pelo IFN- τ um mecanismo fundamental ao sucesso da gestação, torna-se evidente o interesse em mensurar essa atividade como sinal de viabilidade e competência embrionária.

Ainda, observou-se que a presença do conceito induz a expressão de diversos genes, sugerindo uma atuação mais extensa do IFN- τ no estabelecimento da gestação nos ruminantes. No momento pouco se sabe sobre os mecanismos e funções desses genes no contexto reprodutivo. Entretanto, recentemente alguns estudos tem sido realizados com o objetivo de observar a expressão gênica endometrial no período de periimplantação na presença e ausência de concepção. Nesses estudos utilizou-se metodologia de análise comparativa entre pares de fêmeas gêmeas monozigóticas, reduzindo a variabilidade genética, onde uma fêmea recebia um embrião, e seu respectivo par era submetido aos mesmos procedimentos sem inoculação de um embrião. Klein et al. (2006) observaram a expressão de 38 genes no endométrio das fêmeas prenhes, identificados como sendo regulados por interferons do tipo I. Alguns desses genes já foram relacionados com o período do reconhecimento da gestação como: proteína estimulada por interferon com 15 Kda (ISG15; AUSTIN et al., 2004), 2' 5'-oligoadenilato sintetase (OAS; SCHMITT et al., 1993), proteína transmembrânica induzida por interferon 1 e 3 (IFITM-1, -3; PRU et al., 2001a), e proteína Mx 1 e 2 (OTT et al., 1998), mas pouco ainda se sabe sobre os papéis dessas moléculas nesse processo. Sugeriu-se que a OAS afetou a síntese endometrial de PGF_{2 α} , possivelmente alterando o metabolismo do AA (SCHMITT et al., 1993). As proteínas IFITM-1 e -3 estão envolvidas nos processos de adesão celular induzidos por interferons (DEBLANDRE et al., 1995; EVANS et al., 1993). Hicks et al. (2003) relataram que a proteína Mx estava relacionada com a remodelação uterina.

No estudo de Bauersachs et al. (2006) foram compilados os resultados obtidos para o transcriptoma endometrial observado em função da gestação, com os obtidos em Klein et al. (2006) e em Gray et al. (2006). Observou-se que 31% dos

genes regulados positivamente nesses estudos são relacionados com as respostas imunes, 14% estão envolvidos nos processos de transdução de sinal, 10% participam de atividades de transporte, 9% estão comprometidos com proteólise, 8% participam da regulação de transcrição, 5% com processos de proliferação celular, 5% com sinalização célula-célula, 4% com metabolismo e 4% com indução de apoptose. Tais estudos devem trazer esclarecimentos mais aprofundados sobre os mecanismos envolvidos no estabelecimento da gestação nas fêmeas bovinas.

2.2.3 Mensuração da expressão de IFN- τ

Atualmente diversas ferramentas são disponíveis para observar a presença de uma determinada molécula que, suspeita-se, participa de algum evento fisiológico. A expressão de IFN- τ pode ser mensurada utilizando-se diversos métodos capazes de identificar esta proteína em meios de cultura ou fluidos biológicos, ou mesmo a expressão de seu RNA mensageiro (RNAm) em tecidos e células.

A identificação do RNAm em células produtoras de IFN- τ é uma das técnicas mais modernas utilizadas atualmente para pesquisar o potencial de expressão desta proteína. Ealy et al. (2004) utilizaram essa técnica para identificar diferentes isoformas de IFN- τ caprino em células de conceptos. Com o mesmo objetivo, Winkelman e colaboradores (1999) utilizaram-se desta técnica em conceptos ovinos, com sucesso na identificação das diferentes isoformas expressas no período de periimplantação. Ainda, através dessa técnica alguns autores observaram que a

expressão de transcritos para essa proteína inicia-se ao redor do momento da formação da blastocle, a partir de 7 dias (BERTOLINI et al., 2002; HERNANDEZ-LEDEZMA et al., 1992; KUBISCH et al., 1998). Um incremento concomitante na síntese de IFN- τ e no alongamento embrionário é observado entre os dias 12 e 17 da gestação, sendo o RNAm para IFN- τ o transcrito mais abundante nesse período (DEMMERS; DERECKA; FLINT, 2001). Bertolini e colaboradores (2002) relataram uma correlação positiva entre tamanho do trofoblasto e expressão de transcritos para interferon-tau. Entretanto em estudo recente realizado por Robinson e colaboradores (2006) observou-se que apesar do notável incremento nas concentrações de IFN- τ no ambiente uterino entre os dias 14 e 18 da gestação, não foi observado aumento na intensidade de expressão de RNAm para IFN- τ no trofoblasto, indicando que o aumento na produção de IFN- τ está relacionado com o crescimento trofoblástico.

Para observar a expressão proteica de IFN- τ em fluidos biológicos, técnicas como cromatografia e eletroforese tem sido utilizadas. Sinha et al. (2003) utilizaram com sucesso o método de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) para purificar oIFN- τ recombinante (roIFN-t) e determinar a produção dessa proteína por cepas da levedura *Pichia pastoris*.

Ainda podem ser usados métodos de identificação de proteínas utilizando anticorpos específicos que permitem ao pesquisador detectar exatamente a proteína de interesse. O teste de imunodifusão foi utilizado para identificar IFN- τ bovino e ovino (bIFN- τ e oIFN- τ) por Helmer e colaboradores (1987). Atualmente, um radioimunoensaio para detecção do bIFN- τ foi desenvolvido por Takahashi e colaboradores (2004). Outro método de ampla utilização é o immunoblotting ou Western blotting, no qual se utiliza um anticorpo marcado para identificar proteínas

após passagem pela técnica de eletroforese unidimensional. A detecção de IFN- τ bovino, ovino e caprino já foi realizada através da técnica de western blotting (EALY et al., 1998; GUILLOMOT et al., 1998; NAGAYA et al., 2004).

Entretanto, outra maneira de estudar a presença de uma determinada molécula é mensurar uma atividade biológica inerente à essa. Especialmente em relação aos interferons, moléculas complexas com diferentes isoformas, sugere-se esse tipo de análise.

Como primeiros ensaios biológicos aplicados ao estudo do IFN- τ , cita-se os realizados na década de 80, nos quais observou-se que a atuação de concentrados proteicos secretados pelo concepto, infundidos no ambiente uterino, promoveram a extensão do ciclo estral (HELMER et al., 1989; KNICKERBOCKER et al., 1986). Posteriormente esse efeito antiluteolítico em fêmeas ovinas e bovinas foi também observado para isoformas recombinantes de IFN- τ (MARTAL et al., 1990; MEYER et al., 1995; OTT et al., 1993). Entretanto, a utilização desse estudo para quantificar a atividade antiluteolítica se inviabilizou devido à necessidade da utilização de grande número de animais experimentais, sendo ideal o desenvolvimento de um ensaio biológico *in vitro*.

Outra atividade biológica relacionada aos interferons e amplamente mensurada é a atividade antiviral. Por muitos anos o estudo sobre interferons usados terapeuticamente esteve no foco de pesquisa de virologistas que tinham como objetivo reconhecer e caracterizar essa atividade peculiar aos interferons. Para tanto foram desenvolvidos ensaios biológicos *in vitro* para mensurar tal atividade. Um ensaio antiviral conveniente, amplamente utilizado e que demanda um procedimento simples consiste em mensurar a habilidade de preparações de interferon em proteger células contra os efeitos citotóxicos de vírus descrito por

Armstrong (1981) e por Familetti et al. (1981). Em ensaio desenvolvido por Rubinstein, Familetti e Petska (1981) mensurou-se a inibição do efeito citopático do vírus da estomatite vesicular em células Madin-Darby de rim bovino tratadas com interferons. De maneira geral, nesses ensaios tem-se que as potências dessas preparações de interferon são quantificadas pela determinação da resposta de células ao desafio com um vírus. Considera-se a atividade antiviral o recíproco da diluição de uma preparação requerida para produzir um estado antiviral que proteja 50% das células contra o efeito citopático máximo, observado nas preparações controle (i.e., sem interferon).

Cientes que o IFN- τ apresenta atividade antiviral, vários estudos relacionados a aspectos do reconhecimento materno da gestação foram desenvolvidos utilizando ensaios de atividade antiviral como indicativo da secreção de IFN- τ . Kerbler et al. (1997) realizaram estudo para determinar a relação entre a concentração materna de progesterona e a síntese de IFN- τ pelos conceptos. Nesse estudo, a síntese de IFN- τ foi mensurada utilizando um ensaio de atividade antiviral adaptado a partir de Loewen e Derbyshire (1986). Utilizando ensaio de atividade antiviral descrito por Rubinstein et al. (1981), Stojkovic *et al.* (1999) compararam a secreção de IFN- τ por embriões obtidos *in vivo*, ou *in vitro* por transferência nuclear ou bipartição. Abecia et al. (2001) em estudo realizado com ovelhas, avaliou a atividade antiviral em meios condicionados por conceptos através de ensaio descrito por Familetti et al. (1981) como parâmetro de competência embrionária em sintetizar IFN- τ . Ainda, com o objetivo de estudar a influência de técnicas e meios de cultivo no desenvolvimento de embriões *in vitro*, outros pesquisadores tem monitorado a secreção de IFN- τ através da observação da atividade antiviral (HERNANDEZ-LEDEZMA et al., 1993; KUBISCH et al., 2001; LARSON et al., 2001).

No entanto, não há evidências de correlação entre as diferentes atividades exercidas pelos interferons. Em estudo realizado por Parent et al. (2003) com três isoformas recombinantes de interferon bovino e duas ovinas não foi observada relação entre a atividade antiviral relatada e a capacidade em modular a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ observada em células epiteliais e estromais endometriais bovinas por essas diferentes isoformas. Em outros estudos observou-se que isoformas variantes de IFN- τ apresentaram diferente atividade antiviral (WINKELMAN et al., 1999) e atividade antiproliferativa (EALY et al., 1998).

Sendo o bloqueio da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ determinante para o êxito da gestação propõe-se nesse trabalho o desenvolvimento de um ensaio biológico para observar a atividade antiluteolítica do IFN- τ .

2.2.4 Ensaio de atividade antiluteolítica

Ensaio biológicos são ferramentas analíticas que permitem a observação quantitativa da atividade biológica desempenhada por uma determinada molécula. No desenvolvimento de um ensaio biológico deve ser determinado inicialmente um modelo biológico que permita a observação clara e consistente da atividade biológica de interesse. A seguir deve-se desenvolver uma metodologia capaz de demonstrar esse evento e permitir sua quantificação. Conforme anteriormente citado o ensaio antiluteolítico foi desenvolvido com o objetivo de observar a atividade inibitória à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$, diante desse contexto foram realizados estudos que buscaram validar etapas essenciais à elaboração desse ensaio.

Alguns modelos biológicos têm sido utilizados para documentar a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$, como explantes endometriais (HELMER et al., 1989; MEYER et al., 1995) e cultura primária de células epiteliais endometriais (DANET-DESNOYERS et al., 1994; XIAO et al., 1998). No entanto esses modelos envolvem extensiva manipulação animal, altos custos financeiros e longos períodos experimentais. Além disso a colheita de material em diferentes fases do ciclo estral pode contribuir para uma alta variabilidade entre as unidades de estudo e interpretações.

Outro modelo biológico utilizado são as células endometriais bovinas (BEND), linhagem de células endometriais obtidas no dia 14 do ciclo estral de fêmeas bovinas que adquiriram espontaneamente a capacidade de replicação *in vitro* (STAGGS et al., 1998). Essas células são morfológica e funcionalmente semelhantes às células endometriais epiteliais encontradas *in vivo* e capazes de responder a estimuladores e inibidores da produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (BINELLI et al., 2000) sendo utilizadas em estudos que visam elucidar os mecanismos envolvidos nos processos de luteólise e reconhecimento materno da gestação (BINELLI et al., 2000; GUZELOGLU et al., 2004a; GUZELOGLU et al., 2004b; PRU et al., 2001b; RODRIGUEZ-SALLABERRY et al., 2006; STAGGS et al., 1998). Duas características das células BEND merecem destaque para este trabalho: a capacidade de responderem positivamente ao tratamento com um estimulador da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$, o forbol 12,13 dibutirato (PdBu) e a capacidade de bloqueio do estímulo com o PdBu na presença de $\text{rbIFN-}\tau$ (ARNOLD et al., 2000; BINELLI et al., 2000).

O PdBu é um ativador farmacológico da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ que atua mimetizando a ação do DAG, ativando a PKC. Esse e outros ativadores da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ tem sido amplamente utilizados nos estudos que visam esclarecer os mecanismos pelos quais a $\text{PGF}_{2\alpha}$ é sintetizada, bem como os mecanismos pelos

quais essa síntese é bloqueada pelo IFN- τ (BINELLI et al., 2000; GUZELOGLU; MICHEL; THATCHER, 2004; PRU et al., 2001b). De uma maneira geral propõe-se utilizar esse estímulo farmacológico à síntese de PGF $_{2\alpha}$ para observar a atividade inibitória à síntese de PGF $_{2\alpha}$ exercida por fluidos biológicos suspeitos de conterem IFN- τ . O desenvolvimento e validação desse ensaio disponibilizarão uma nova ferramenta para o estudo da atividade antiluteolítica no microambiente uterino de fêmeas bovinas durante a gestação ou durante o ciclo estral. Acredita-se que o estudo da atividade antiluteolítica possa ser indicativo do êxito do desenvolvimento embrionário.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Foram utilizados os seguintes materiais e reagentes: placas de poliestireno para cultivo celular com 24 cavidades da Corning Incorporated; frascos de poliestireno para cultivo celular de 25 e 175 cm² da Sarstedt AG & Co; meio de cultivo HAM F12 (HAM-F12), meio mínimo essencial (MEM), penicilina, estreptomicina, anfotericina B, insulina, bicarbonato de sódio, tripsina, forbol 12,13 dibutirato (PdBu), albumina sérica bovina (BSA), dextran e carvão ativado da Sigma Chemical Co.; tris hidroximetil aminometano hidrocloreídrico (Tris-HCl), fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, azida sódica da Fisher Co.; reagente de Bradford da BioRad; soro fetal bovino e soro eqüino da Gibco Inc.; lidocaína 2% e cloprostenol sódico do Centro Paulista de Desenvolvimento Farmacotécnico; solução de Ringer da Fresenius Kabi Brasil Ltda; líquido de cintilação OptiPhase HiSafe 3 da PerkinElmer Inc.; sonda tipo Foley n° 24 da Rusch Inc.; 5,6,8,9,11,12,14,15 (n)-H³ prostaglandina F_{2α} da Amersham Pharmacia Limited; interferon-tau recombinante bovino (1,08 x 10⁷ unidades de atividade antiviral/mg; GUZELOGLU; MICHEL; THATCHER, 2004) doado pelo Dr. Michael Roberts (Universidade de Missouri, EUA); e anticorpo para RIE de PGF_{2α} doado pelo Dr. William W. Thatcher (Universidade da Florida, EUA).

3.2 TÉCNICAS UTILIZADAS

3.2.1 Cultivo de Células BEND

O cultivo das células BEND foi estabelecido nas instalações do Laboratório de Morfofisiologia Molecular do Desenvolvimento da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo coordenado pelo Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles (ilustrados na Figura 3).

Os procedimentos adotados com as células BEND foram baseados nos previamente apresentados por Binelli et al. (2000) e detalhados em anexo (Figura 3). A partir de resultados obtidos em experimentos preliminares determinou-se a concentração ideal de células a serem semeadas em placas de 24 poços. Para a realização dos estudos propostos aproximadamente 4×10^4 células BEND foram adicionadas a cada cavidade em placas de 24 cavidades e incubadas sob uma atmosfera umidificada contendo 95% de O₂ e 5% de CO₂ em meio de cultura composto por 40% de HAM-F12, 40% de MEM, suplementados com penicilina (200.000 unidades/L), estreptomicina (100.000 µg/L), anfotericina B (500.000 ng/L), insulina (200 UI/L), 10 % de soro fetal bovino e 10% de soro eqüino (meio de cultura completo). Após a observação de confluência celular, o meio de cultura completo foi removido e substituído por meio sem soro (40% HAM-F12, 40% MEM, suplementado com 200.000 UI/L de penicilina, 100.000µg/L de estreptomicina, 500 µg/mL de anfotericina B e 200UI/L de insulina. Após 24h de cultivo com o meio sem soro, esse foi retirado e então administrados os tratamentos adequados (1mL por poço) de

acordo com os delineamentos experimentais de cada estudo realizado.

3.2.2 Ensaios para $\text{PGF}_{2\alpha}$

As amostras de meio colhidas após cultivo das células BEND com os tratamentos específicos em cada estudo foram analisadas para $\text{PGF}_{2\alpha}$ de acordo com o procedimento de radioimunoensaio descrito por Danet-Desnoyers et al. (1994). Registrou-se coeficiente de variação intra-ensaios médio de 5,74% e coeficiente de variação inter-ensaios médio de 3,29%.

Figura – Fotografias ilustrativas das instalações e equipamentos utilizados para os procedimentos de cultivo celular. Em (a) evidencia-se o fluxo laminar, e em (e) a estufa de CO₂ utilizados. Em (b), (c) e (d) ilustra-se o procedimento de descongelamento das células BEND, em (c) observa-se o procedimento de descongelamento em banho-maria, em (b) demonstra-se o depósito da alíquota celular em garrafa de cultivo e em (d) observa-se a garrafa de cultivo pronta para iniciar os procedimentos de cultivo

3.2.3 Sincronização e observação do estro dos animais

Para a obtenção de fluidos biológicos representativos do microambiente uterino em dias específicos do ciclo estral ou da gestação foram realizados procedimentos para sincronizar o estro dos animais. Foram utilizadas vacas mestiças azebuadas, múltiparas, vazias e secas provenientes do rebanho de corte da Prefeitura do Campus Administrativo de Pirassununga da Universidade de São Paulo e do rebanho experimental do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Para sincronização da ovulação foi administrada injeção intramuscular contendo 530µg de cloprostenol sódico (análogo sintético da PGF_{2α}). A observação dos sinais do cio dos animais foi realizada a cada 12 horas, de 48 até 120 horas após a aplicação de PGF_{2α} (estro = dia 0 do ciclo estral).

3.2.4 Obtenção *ex vivo* de lavados uterinos e conceptos de fêmeas bovinas prenhes

Doze horas após a observação do cio, os animais foram inseminados ou receberam monta natural, e após dezessete dias foram abatidos por sangria da veia jugular, após desensibilização com pistola pneumática, no matadouro-escola do Campus Administrativo de Pirassununga da Universidade de São Paulo. Após abertura da cavidade abdominal, coletou-se o aparelho reprodutivo dos ovários à

cérvice uterina, que foi mantida ocluída por uma pinça. O material colhido foi envasado em sacola plástica e transportado rapidamente ao laboratório acondicionado em isopor com gelo (Figura 4a).

As estruturas ovarianas foram observadas para identificação dos cornos uterinos ipso e contra-lateral ao CL (Figura 4b). O útero foi dissecado, removendo-se os tecidos excedentes, ovários, tubas uterinas, ligamentos e então levado ao fluxo laminar (Figura 4c).

Em aparelho de fluxo laminar, pela extremidade cranial do corno uterino contralateral ao corpo lúteo, após desinfecção do local com álcool 70%, foram injetados 20 mL de solução tampão de fosfato (PBS) pH 7,4 à 38°C com o uso de uma seringa de 20 mL e agulha 40x12mm (Figura 4d, 4e). O útero foi gentilmente massageado no sentido de lavagem do corno contra-lateral para o ipso-lateral ao CL (Figura 4f). A extremidade cranial do corno uterino ipsolateral ao CL foi segura com duas pinças e teve sua extremidade cortada para aumentar a abertura de colheita do lavado uterino e do conceito (Figura 4g), e o lavado contendo o conceito colhido em recipiente estéril (Figura 4h). O conceito foi imerso em placa de petri com meio mínimo essencial (MEM) suplementado com penicilina (200.000 unidades/L), estreptomicina (100.000 µg/L), anfotericina B (500 µg/L) para lavagem do mesmo (Figura 4i).

Após a remoção do conceito, o líquido obtido da lavagem uterina foi inicialmente centrifugado a 12000 x *g* durante 20 minutos para remoção de debris, e o sobrenadante armazenado a -80°C em alíquotas de 1mL em microtubos esterilizados e identificados. Posteriormente os lavados foram processados por ultrafiltração conforme metodologia descrita a seguir.

3.2.5 Obtenção de meio condicionado por concepto

Os conceptos obtidos de acordo com procedimento descrito acima, foram transferidos para uma placa de petri contendo 15 mL de MEM suplementado com penicilina (200.000 unidades/L), estreptomicina (100.000 µg/L), anfotericina B (500 µg/L) e incubados a 38,5°C sob atmosfera ambiente em plataforma oscilatória com baixa rotação (Figura 4j). Após 24 horas, o meio condicionado pelos conceptos foi colhido, centrifugado a 12000 x *g* durante 20 minutos para remoção de debris, e o sobrenadante armazenado a -80°C em alíquotas de 1mL em microtubos esterilizados e identificados. Posteriormente os meios condicionados por concepto foram processados por ultrafiltração conforme metodologia descrita a seguir.

Figura 4 – Fotografias ilustrativas dos procedimentos para obtenção de lavado uterino ex vivo e meio condicionado por conceito em fêmeas bovinas. (a) aparelho reprodutivo de fêmea bovina acondicionado em sacola plástica e gelo; (b) identificação dos cornos uterino ipso e contra-lateral ao CL; (c) útero bovino isolado por dissecação; (d) secagem externa do útero bovino; (e) injeção de PBS no lúmen uterino acessado pela extremidade cranial do corno uterino contra-lateral ao CL; (f) massagem uterina do corno contra ao ipso-lateral ao CL; (g) ressecção da extremidade cranial do corno uterino ipso-lateral ao CL; (h) colheita de lavado uterino e conceito presente em placa de petri; (i) conceito bovino no décimo sétimo dia de gestação em placa de petri contendo MEM; (j) cultivo de conceitos bovinos em plataforma oscilatória em estufa sob atmosfera ambiente à 38,5°C

3.2.6. Obtenção *in vivo* de lavados uterinos de fêmeas prenhes e cíclicas

Os experimentos realizados para a obtenção *in vivo* de fluidos uterinos representativos durante o período crítico tanto de fêmeas bovinas prenhes, quanto de fêmeas não-inseminadas foram desenvolvidos em colaboração com a equipe de pesquisa do Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM – FMVZ/USP). Para tanto foram utilizadas 30 vacas mestiças azebuadas, múltiparas, vazias e secas mantidas em piquetes, com água *ad libitum* e alimentação baseada no pastejo (*Brachiaria spp.*) com suplementação mineral e concentrado. A divisão de dois grupos experimentais foi feita ao acaso, um inseminado e outro não. O grupo 1 (vacas cíclicas) contou com 10 animais, e o grupo 2 (vacas inseminadas) com 20 animais. Essa divisão desigual levou em conta uma taxa de prenhez de 50% para os animais inseminados. As vacas do grupo de vacas inseminadas foram submetidas a procedimento de inseminação artificial doze horas após a observação de cio.

Os lavados uterinos de cada animal foram obtidos nos dias 14, 16 ou 18 pós-estro, tanto de fêmeas cíclicas quanto prenhes. Foi utilizada sonda de Foley nº 24 aplicada transvaginalmente, introduzida no útero através do óstio uterino externo, transposta à cérvix uterina e alojada no corpo do útero das vacas. Para minimizar o desconforto dos animais durante o procedimento foi administrado 5mL de lidocaína 2% via epidural. Foi infundido um volume final de 250ml de solução fisiológica no corpo do útero e após massagem, recuperado o lavado uterino em recipientes imersos em gelo (Figura 4a, 4b). Os lavados uterinos obtidos para cada dia do ciclo ou da gestação foram levados ao laboratório e centrifugados a 4000 x *g* a 4°C para remoção de debris.

O sobrenadante foi aliquotado e armazenado a -20°C . Posteriormente, esses lavados foram submetidos à processo de ultrafiltração conforme metodologia descrita à seguir e em seguida por liofilização em aparelho liofilizador da marca Heto-Holten. O produto da liofilização foi então ressuspenso em meio de cultivo completo sem soro e utilizado conforme descrito no estudo 5 dessa tese.

Figura 5 - Fotografias ilustrativas do procedimento de lavagem uterina ex vivo por sonda de Foley. (a) sistema para infusão uterina através de sonda de Foley aplicada transvaginalmente; (b) colheita de lavado uterino em recipiente imerso em gelo

3.2.7. Ultrafiltração

Em estudos realizados e não demonstrados aqui, observou-se que a presença de PBS ou MEM (solventes das amostras de lavados uterinos obtidos ex

vivo e meios condicionados por conceptos) no meio de cultivo interferiu com a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por PdBU. Portanto, os humores biológicos obtidos foram submetidos à processo de ultrafiltração para substituição de soluto e concentração de uma fração proteica. Utilizou-se a técnica de ultrafiltração com centricon 10[®] (Millipore[®]), onde, através de um processo de filtração por centrifugação, são retidas apenas as proteínas com peso molecular superior à 10 Kda em um volume até 1000 vezes menor. Foram dispensados 15 ml de cada respectivo líquido biológico no equipamento centricon 10[®] e, de acordo com o protocolo indicado pelo fabricante, processado em centrífuga à 4°C. Cada ultrafiltrado obtido foi então ressuspensão em meio de cultivo completo sem soro e utilizado no estudo 4 descrito a seguir.

3.3 ESTUDOS REALIZADOS

Como relatado anteriormente, nos ensaios antivirais as células são expostas à ação dos interferons e submetidas a seguir à um desafio viral. Mensura-se a inibição da morte celular relativa à atividade antiviral de cada amostra de interferon. O ensaio antiluteolítico, resumidamente, baseia-se no princípio da inibição quantitativa da produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por um éster de forbol, observada em células BEND.

Para elaboração e validação desse ensaio antiluteolítico foram estruturados os estudos conforme fluxograma apresentado na Figura 6. Foram propostos cinco

estudos a partir de questões experimentais que buscam validar cada etapa necessária ao embasamento desse ensaio biológico e caracterizar a atividade antiluteolítica presente no microambiente uterino durante o período crítico para o reconhecimento materno da gestação.

Figura 6 – Fluxograma experimental proposto para o estudo da atividade antiluteolítica no microambiente uterino durante o período crítico para a manutenção da gestação em fêmeas bovinas. Sequência de questões experimentais

3.3.1 Estudo 1. Modelo biológico

Alguns modelos biológicos tem sido utilizados para observar a síntese endometrial de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em fêmeas bovinas como explantes endometriais (HELMER et al., 1987; HELMER et al., 1989; MEYER et al., 1995) e células endometriais epiteliais (DANET-DESNOYERS et al., 1994; GODKIN et al., 1997; XIAO et al., 1998). Entretanto esses modelos exigem altos custos operacionais, implicam em alta variabilidade entre as unidades experimentais e requerem o abate de animais.

Foi observado por Binelli et al. (2000), Pru et al. (2001b), Guzeloglu, Michel e Thatcher (2004) que células BEND produzem $\text{PGF}_{2\alpha}$ ao serem estimuladas com o PdBu e que a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por PdBu em células BEND é inibida na presença de $\text{rbIFN-}\tau$. Outras características apóiam a escolha das células BEND como modelo: baixa variabilidade entre unidades experimentais por se tratarem de células idênticas, isenção da necessidade de abates de animais e menor custo operacional.

O objetivo desse estudo foi verificar, nas condições de cultivo estabelecidas, a hipótese de que as células BEND são capazes de sintetizar $\text{PGF}_{2\alpha}$ na presença de PdBu e que, ao associar-se $\text{rbIFN-}\tau$, essa síntese é inibida.

3.3.1.1 Delineamento experimental

Após o período de privação de soro descrito anteriormente, células BEND em placas de 24 cavidades receberam os seguintes tratamentos em triplicata: placebo, PdBu (100ng/mL) ou PdBu (100ng/mL) associado a rbIFN- τ (50ng/mL). Amostras foram coletadas no momento da administração dos tratamentos e seis horas após, acondicionadas em microtubos e armazenadas a -20 °C para posterior dosagem de PGF_{2 α} por radioimunoensaio.

3.3.1.2 Análises realizadas

As concentrações de PGF_{2 α} obtidas para cada tratamento foram analisadas e não se mostraram adequadas quanto à homogeneidade das variâncias (Teste F, $p < 0,01$), portanto foram transformadas por logaritmo de base 10 e reanalisadas. Tal transformação adequou os dados à análise de variância (Teste F, $p > 0,01$) os quais estão apresentados como média dos quadrados mínimos $\pm$ EPM, não transformados. Os dados foram analisados por ANOVA utilizando-se o proc GLM do programa SAS (SAS INSTITUTE, 1988) onde as variáveis independentes foram replicata, tratamento, tempo e interações. As médias dos tratamentos foram estudadas por contrastes ortogonais (controle x PdBu ou PdBu + rbIFN- τ ; PdBu x PdBu + rbIFN- τ).

3.3.1.3 Resultados e discussão

A partir das análises realizadas observou-se efeito de tempo ($p < 0,01$; Figura 7 e Tabela 1) e efeito de tratamento. À análise pelos contrastes ortogonais, verificou-se que as células BEND tratadas com PdBu apresentaram aumento na síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($p < 0,01$) e as que receberam associação de PdBu e $\text{rbIFN-}\tau$ demonstraram inibição na síntese estimulada pelo PdBu ($p < 0,01$). Os dados obtidos nesse estudo são semelhantes aos obtidos por Binelli et al. (2000), Pru et al. (2001b), Guzeloglu, Michel e Thatcher (2004). Todos os autores observaram que as células BEND sintetizam $\text{PGF}_{2\alpha}$ em resposta ao tratamento com PdBu e que a ação do $\text{rbIFN-}\tau$ bloqueia essa síntese nas concentrações testadas.

Nota-se que na ausência de tratamentos específicos, ou seja, na presença apenas de meio de cultivo sem soro, as células BEND sintetizam uma concentração mínima de $\text{PGF}_{2\alpha}$, nesse trabalho referida como **síntese basal**.

Tabela 1 – Análise de variância dos quadrados mínimos da concentração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ produzida por células BEND não tratadas (controle), tratadas com PdBu (100ng/mL) ou PdBu (100 ng/mL) associado à interferon-tau recombinante (50ng/mL)

Fonte de variação	GL*	Pr > F
Tratamento	2	0,01
Replicata (Tratamento)	9	0,58
Tempo	1	0,01
Tratamento x Tempo	2	0,44

*grau de liberdade

$r^2 = 0,81$

Figura 7 – Médias das concentrações de $\text{PGF}_{2\alpha}$ produzidas por células BEND nas horas experimentais 0 (barras brancas) e 6 (barras pretas), não tratadas (Controle), tratadas com PdBu (100ng/mL) ou PdBu (100 ng/mL) associado à interferon-tau recombinante (50ng/mL). Valores não transformados (Médias dos quadrados mínimos $\pm$ EPM)

3.3.1.4 Conclusões do estudo

Células BEND sintetizam $\text{PGF}_{2\alpha}$ em resposta ao estimulador farmacológico PdBu, e essa síntese é inibida na presença de rbIFN- τ .

Os resultados obtidos permitem sugerir a utilização das células BEND como modelo biológico, bem como o estímulo com PdBu como mecanismo para o desenvolvimento de um ensaio biológico que mensure a atividade inibitória à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

3.3.2 Estudo 2. Intensidade do estímulo

A proposta conceitual do ensaio antiluteolítico é a observação da inibição na síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por PdBu em células BEND na presença de fluidos biológicos pertinentes. Assim, a concentração que será estabelecida para promover tal síntese necessita ser estudada.

Nesse estudo propôs-se avaliar a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em resposta à concentrações crescentes de PdBu pelas células BEND. Acredita-se que essa relação seja diretamente proporcional, onde maiores concentrações de PdBu promovem maior síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Para tanto diversas concentrações foram testadas a partir da concentração utilizada em Binelli et al. (2000). Objetivou-se eleger uma concentração de PdBu que promova um efeito estimulatório consistente na síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelas células BEND e que confira sensibilidade ao ensaio proposto. Entende-se como sensível, a resposta (estímulo à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$) passível de modulação (i.e. aumento ou redução) em função de alterações marginais na concentração do fármaco utilizado como estímulo.

3.3.2.1 Delineamento experimental

Células BEND semeadas em placas de 24 cavidades foram tratadas com as seguintes concentrações de PdBu: 0, 6,25, 12,5, 25, 50 ou 100 ng/mL. Após

seis horas as amostras foram colhidas, acondicionadas em microtubos e armazenadas a -20°C para posterior dosagem de $\text{PGF}_{2\alpha}$ por radioimunoensaio. Esse estudo foi realizado em três repetições, sendo os tratamentos na primeira repetição administrados em quadruplicata e em triplicata nas demais repetições.

3.3.2.2 Análises realizadas

Concentrações de $\text{PGF}_{2\alpha}$ das amostras obtidas na hora 6 foram analisadas e não atenderam às premissas da homogeneidade das variâncias (Teste F, $p < 0,01$) e normalidade de resíduos (Shapiro-Wilk, $p < 0,01$), portanto foram transformadas por logaritmo de base 10 e reanalisadas. Tal transformação adequou os dados à análise de variância (Shapiro-Wilk e F; $p > 0,01$) os quais estão apresentados como média dos quadrados mínimos $\pm$ EPM, não transformados. A seguir os dados foram analisados por ANOVA utilizando proc GLM do programa SAS (SAS INSTITUTE, 1988), onde as variáveis independentes foram tratamento, repetição e interação.

3.3.2.3 Resultados e discussão

Notou-se interação entre repetição e tratamento ($p < 0,01$; Figura 8 e Tabela 2), ou seja, a resposta à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ foi mais intensa nas repetições 2 e 3 em relação à primeira, talvez devido a uma variação no número de células por poço nos diferentes experimentos. No entanto, observou-se o efeito de tratamento ($p < 0,01$) nas três repetições experimentais realizadas. Concentrações crescentes de PdBu estimularam de maneira diretamente proporcional a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em células BEND. A partir das concentrações testadas nesse estudo, notou-se um estímulo à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ a partir de 12,5 ng/mL de PdBu , e que esse estímulo se apresenta máximo a partir de 50 ng/mL (Figura 8). Dentre as concentrações testadas, a concentração de 25 ng/mL promoveu estímulo sub-máximo, localizando-se em ponto sensível na curva de dose-reposta de PdBu na síntese estimulada de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em células BEND, portanto a mesma foi eleita como estímulo-desafio no ensaio biológico proposto.

Tabela 2 – Análise de variância dos quadrados mínimos da concentração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ produzida por células BEND tratadas com as seguintes concentrações de PdBu : 0, 6,25, 12,5, 25, 50 ou 100 ng/mL em três diferentes experimentos

Fonte de variação	GL*	Pr > F
Tratamento	5	0,01
Repetição	2	0,01
Repetição x Tratamento	10	0,01

*grau de liberdade

$r^2 = 0,94$

Figura 8 – Médias das concentrações de $\text{PGF}_{2\alpha}$ produzidas após 6h por células BEND tratadas com 0, 6,25, 12,5, 25, 50 ou 100ng/mL de PdBu em três diferentes experimentos

3.3.2.4 Conclusões do estudo

Com os resultados obtidos para síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelas células BEND em resposta às concentrações de PdBu aplicadas nesse estudo pode-se inferir que a partir de 12,5 ng/mL de PdBu observa-se estímulo consistente à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e a partir de 50 ng/mL esse estímulo torna-se constante. Foi eleita a concentração de 25 ng/mL para constituir o estímulo-desafio do ensaio antiluteolítico.

3.3.3 Estudo 3. Padrão de referência

A elaboração de um ensaio biológico confiável requer a determinação de um padrão de referência para conferir ajustes relativos à variabilidade entre as corridas dos ensaios biológicos (i.e. variações interensaios, MEAGER, 2002). Para constituir o padrão de referência do ensaio antiluteolítico propôs-se utilizar o rbIFN- τ gentilmente doado pelo Prof. Dr. Michael R. Roberts (Universidade do Missouri, Columbia-EUA).

Uma vez que a síntese de PGF_{2 α} estimulada por PdBu em células BEND é inibida na presença de rbIFN- τ (BINELLI et al., 2000; GUZELOGLU; MICHEL; THATCHER, 2004; PRU et al., 2001b) supõe-se que tal inibição (i.e., sua atividade antiluteolítica) se dê proporcionalmente à concentração de rbIFN- τ . Dessa forma, à análise de regressão desse evento, tal inibição poderá ser definida em função de uma equação de regressão linear. A partir dessa equação será possível calcular a concentração do rbIFN- τ que inibe em 50% a síntese máxima de PGF_{2 α} estimulada por PdBu. Utilizando princípio aplicado nos ensaios de atividade antiviral (ARMSTRONG, 1981; FAMILLETTI, RUBINSTEIN, PETSKA 1981), propõem-se definir a atividade antiluteolítica.

Nos ensaios de atividade antiviral (ARMSTRONG, 1981; FAMILLETTI; RUBINSTEIN; PETSKA, 1981) a potência antiviral de uma determinada preparação de interferon foi definida como o recíproco da diluição que inibe em 50% o efeito citopático máximo, observado na ausência de interferon. Ressalta-se

que a potência é uma unidade inversamente relacionada com a concentração. Exemplificando, se uma solução com 5 ng/mL e outra com 50 ng/mL apresentam o mesmo efeito biológico, a amostra dez vezes mais potente é a com a menor concentração (5 ng/mL).

O presente ensaio foi desenvolvido para mensurar a atividade antiluteolítica presente em fluidos biológicos de provável composição complexa e que pode variar de acordo com a metodologia empregada para obtê-los. Sendo a atividade antiluteolítica relacionada com atividade de proteínas que compõem esses fluidos, julgou-se pertinente normalizar a atividade antiluteolítica em função do conteúdo protéico total da amostra. Portanto, para a atividade antiluteolítica definiu-se que uma solução com uma unidade antiluteolítica (UA) é aquela que com 1 µg de proteína promova 50% de inibição na $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por 25ng/mL de PdBu.

Estudos preliminares foram desenvolvidos com o objetivo de definir um intervalo de concentrações de rbIFN- τ ideal para observar a concentração que inibe 50% a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por 25 ng/mL de PdBu em células BEND. Utilizaram-se nesses estudos concentrações de rbIFN- τ entre 0,39 e 200 ng/mL. A partir dos resultados obtidos nesses estudos preliminares foram sugeridas as concentrações de 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 3,2 e 6,4 ng/mL de rbIFN- τ para elaborar a curva de resposta da ação inibitória do rbIFN- τ na síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Portanto o objetivo desse estudo foi observar se a curva de inibição da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por 25 ng/mL de PdBu observada para o rbIFN- τ pode ser definida por uma equação matemática linear tornando-o elegível para constituir um padrão de referência ao ensaio antiluteolítico.

Ainda nesse estudo foram estabelecidos conceitos e cálculos com o objetivo de, a partir da equação obtida para a inibição da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por 25 ng/mL de PdBu em células BEND, quantificar a potência antiluteolítica dessa isoforma.

3.3.3.1 Delineamento experimental

Células BEND semeadas em placas de 24 cavidades foram tratadas apenas com meio completo sem soro ou associado com 0, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 3,2 ou 6,4 ng/mL de $\text{rbIFN-}\tau$ associados a 25 ng/mL de PdBu em triplicata. As amostras foram coletadas seis horas após a aplicação dos tratamentos, acondicionadas em microtubos, armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e posteriormente submetidas a dosagem de $\text{PGF}_{2\alpha}$ por radioimunoensaio. Foram realizadas dez repetições desse experimento.

3.3.3.2 Análises realizadas

A síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ mensurada para cada concentração testada de $\text{rbIFN-}\tau$ foi transformada em **percentual de inibição** em relação à **síntese máxima** de

PGF_{2α} (observada na presença apenas do estímulo de 25 ng/mL de PdBu) segundo metodologia de cálculo seguinte. Inicialmente, os valores obtidos de síntese de PGF_{2α} nos poços tratados com cada concentração de rbIFN-τ testada foram subtraídos da síntese basal (síntese de PGF_{2α} observada na presença apenas de meio de cultivo não suplementado) constituindo a **síntese líquida** referente a cada tratamento. A partir desses valores calculou-se:

$$\text{Percentual de inibição} = \left(1 - \frac{\text{síntese líquida}}{\text{síntese máxima}}\right) 100$$

Dessa forma obteve-se o valor do percentual de inibição à síntese máxima de PGF_{2α} estimulada por PdBu para cada concentração de rbIFN-τ avaliada. Os valores médios para percentual de inibição à síntese de PGF_{2α} (i.e. médias das replicatas) foram submetidos à análise de regressão em função do log₁₀ da concentração de rbIFN-t +1.

3.3.3.3 Resultados e discussão

As médias obtidas foram analisadas por regressão linear e conforme observação da Figura 9, nota-se que a curva do percentual de inibição da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por PdBu em células BEND em função do $\log_{10}$ da concentração de $\text{rbIFN-}\tau+1$ apresentou comportamento linear [$r^2 = 0,96$; inibição à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha} = 29,75 + 65,04(\text{concentração proteica})$].

Figura 9 - Percentual de inibição da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por PdBu em função do $\log_{10}$ da concentração de $\text{rbIFN-}\tau+1$. Médias $\pm$ EPM (linha tracejada) curva de regressão (linha contínua)

$$\text{inibição à síntese de PGF}_{2\alpha} = 29,756 + 65,045 [\log_{10} (\text{concentração rbIFN-}\tau + 1)]$$

Resolvendo a equação para encontrar a concentração de rbIFN- τ que inibe em 50% a síntese de PGF_{2 α} estimulada por PdBu tem-se:

$$50 = 29,756 + 65,045 [\log_{10} (\text{rbIFN-}\tau + 1)]$$

$$\log_{10} (\text{rbIFN-}\tau + 1) = (50 - 29,756) / 65,045$$

$$\text{rbIFN-}\tau + 1 = \text{antilog } 0,311$$

$$\text{rbIFN-}\tau = 1,04 \text{ ng/mL}$$

Sendo a concentração de rbIFN- τ que inibiu em 50% a síntese de PGF_{2 α} estimulada por PdBu de 1,04 ng/mL, o volume de cada tratamento aplicado por poço de 1mL, a atividade antiluteolítica é uma grandeza inversamente proporcional à concentração, calculou-se:

$$1 \text{ } \mu\text{g de proteína} \text{ } \underline{\hspace{1cm}} \text{ } 1 \text{ UA}$$

$$\text{Atividade antiluteolítica} = \frac{1}{0,00104 \text{ } \mu\text{g/mL}}$$

Portanto calculou-se que a atividade antiluteolítica nominal do rbIFN- τ é de $9,61 \times 10^2$ UA/ μ g de proteína.

3.3.3.4 Conclusões do estudo

Concluiu-se a partir dos resultados apresentados que a modulação da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por 25 ng/mL de PdBu em células BEND mediada pelo $\text{rbIFN-}\tau$ pode ser definida através de uma equação de regressão linear.

A partir de tal equação foi possível quantificar a atividade inibitória do $\text{rbIFN-}\tau$ na síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por PdBu , aqui definida como atividade antiluteolítica. Nesse estudo determinou-se a atividade antiluteolítica nominal do $\text{rbIFN-}\tau$, $9,61 \times 10^2$ UA/ μg de proteína.

Propõe-se que o interferon-tau recombinante bovino avaliado nesse estudo seja utilizado como padrão de referência entre os ensaios antiluteolíticos.

3.3. 4 Estudo 4. Validação

Sabe-se que a habilidade de um conceito em secretar $\text{IFN-}\tau$ para inibir a secreção endometrial de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no período crítico, entre os dias 15 e 19 após o estro, é crucial ao estabelecimento da gestação nos bovinos, quando, nas fêmeas não fertilizadas observa-se uma cascata bioquímica que determina a luteólise (THATCHER et al., 2001).

Acredita-se que os lavados uterinos e meios condicionados por conceitos obtidos de animais prenhes no décimo sétimo dia após o estro contenham

interferon-tau secretado pelo concepto. Sendo assim, ao serem administradas diluições seriadas desses fluidos associadas à 25 ng/mL de PdBu ao cultivo de células BEND espera-se observar a modulação na síntese estimulada de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Através da análise de regressão dessa resposta pretende-se definir uma equação de regressão linear que permita calcular a concentração em que cada fluido inibe em 50% a síntese máxima estimulada pelo PdBu para assim quantificar a atividade antiluteolítica presente em cada amostra.

De acordo com os resultados obtidos e conceitos já estabelecidos nesse trabalho as amostras submetidas ao ensaio biológico foram quantificadas quanto à sua atividade antiluteolítica segundo metodologia sumarizada na Figura 8.

Figura 10 – Representação esquemática das etapas para a determinação da atividade antiluteolítica de uma amostra segundo o ensaio antiluteolítico proposto

Com o objetivo de facilitar a compreensão desse estudo, descreve-se a realização dos experimentos divididos em duas etapas: a etapa experimental inicial e o experimento final. Na etapa inicial um intervalo extenso de concentrações de proteína do pool tanto de lavados uterinos quanto de meio condicionado por conceptos foram estudadas quanto à atividade antiluteolítica. Através dos resultados obtidos sugeriu-se um intervalo restrito de concentrações, mais adequado para mensurar a atividade antiluteolítica de cada amostra (observada em 50% de inibição). A seguir foi realizado o experimento final onde observou-se a resposta inibitória à partir desse intervalo restrito de concentrações sugerido na etapa inicial e calculou-se a atividade antiluteolítica de cada amostra.

3.3.4.1 Delineamento experimental

Os lavados uterinos e meios condicionados por concepto obtidos de três fêmeas bovinas prenhes no décimo sétimo dia de gestação foram agrupados formando “pools”. Aplicando método de Bradford (1976), inicialmente determinou-se que a concentração de proteínas totais no pool de lavados uterinos foi de 458,17 µg/mL, e no pool de meios condicionados por conceptos foi de 73,06 µg/mL.

Na etapa experimental inicial desse estudo, em placas de 24 cavidades, células BEND foram tratadas com 25 ng/mL de PdBu associado a diluições do pool com concentração proteica total entre 1 e 92 µg/mL para os lavados uterinos

e entre 0,004 e 1,469 µg/mL para meios condicionados por conceitos em diferentes experimentos em triplicata.

No experimento final, em placas de 24 cavidades, células BEND receberam a associação de 25 ng/mL de PdBu com 0, 3, 6, 9, 12, 15 ou 18 µg/mL de proteína total de pool de lavado uterino ou com 0, 3, 8, 13 ou 18 ng/mL de proteína de pool de meio condicionado por conceito. Ainda nesses experimentos foram administrados tratamentos com 25 ng/mL de PdBu associado a 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 3,2 ou 6,4 ng/mL de rbIFN- τ em triplicata para elaboração da curva de resposta para o padrão nas condições desse experimento. As amostras foram coletadas seis horas após a aplicação dos tratamentos, armazenadas à -20°C, e posteriormente submetidas à dosagem de PGF_{2 α} por radioimunoensaio.

Conforme anteriormente discutido o rbIFN- τ foi sugerido para monitorar e normalizar possíveis variações entre as corridas do ensaio antiluteolítico. No trabalho realizado por Meager (2002) sobre elaboração de ensaios antivirais, indicou-se uma fórmula para normalização de variações entre os ensaios, utilizando a curva de resposta do padrão estabelecido. Na presente tese adotou-se tal equação, onde tem-se que:

Atividade

antiluteolítica = $\frac{\text{atividade nominal do padrão}}{\text{atividade observada do padrão}}$ x atividade observada da amostra
normalizada

3.3.4.2 Análises realizadas

Os dados de síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ observados para cada tratamento foram submetidos aos cálculos já citados e transformados em percentual de inibição em relação à síntese máxima de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Os percentuais de inibição à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ obtidos para cada concentração de lavado uterino ou de meio condicionado por concepto foram analisados por regressão em função da concentração proteica.

3.3.4.3 Resultados e discussão

Os resultados obtidos e discussão para o pool de lavados uterinos ou de meios condicionados por conceptos são apresentados separadamente para favorecer a compreensão desse estudo. Inicialmente apresenta-se os dados para o pool de lavados uterinos obtidos ex vivo, em seguida os dados referentes ao pool de meio condicionado por conceptos.

3.3.4.3.1 Lavados uterinos obtidos ex vivo

Na Figura 11 estão representados os resultados para percentual de inibição à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por PdBu em função de cada concentração proteica do lavado uterino testada na etapa experimental inicial, analisados por regressão. Observou-se que a influência das diversas concentrações testadas na síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por PdBu foi melhor definida por uma equação matemática quadrática. Notou-se que a partir da concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ até 20 $\mu\text{g/mL}$ de lavado uterino houve incremento no percentual inibitório da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Observou-se ainda que entre os valores de 50 e 90 $\mu\text{g/mL}$ essa inibição se manteve constante, e que concentrações acima de 120 $\mu\text{g/mL}$ não apresentaram esse efeito inibitório, contrariamente, observou-se estímulo à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ maior do que o observado na presença apenas de PdBu . Com o objetivo de mensurar a atividade antiluteolítica sugeriu-se estudar a resposta inibitória numa faixa mais restrita de concentrações, especificamente entre as que apresentaram resposta crescente na inibição da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e que margearam o índice de 50% de inibição. Baseando-se nos dados obtidos nesse experimento sugeriu-se testar as concentrações entre 3 e 18 $\mu\text{g/mL}$ de proteína de pool de lavado uterino.

Figura 11 – Percentual de inibição da síntese de PGF_{2α} estimulada por 25 ng/mL de PdBu em células BEND em função da concentração total de proteínas presente no pool de lavados uterinos. Valores (linha tracejada) curva de regressão (linha contínua)

Os resultados obtidos para percentual de inibição obtidos em função das concentrações proteicas de lavado uterino testadas no experimento final foram representados na Figura 12. Observou-se que a análise de regressão do percentual de inibição à síntese de PGF_{2α} obtida nesse experimento apresentou comportamento linear [$r^2 = 0,84$; inibição à síntese de PGF_{2α} = $39,49 + 1,59$ (concentração proteica)] e permitiu observar o índice de 50% de inibição. A partir dessa equação e dos conceitos estabelecidos calculou-se a atividade antiluteolítica desse pool de lavados uterinos obtidos de fêmeas bovinas no décimo sétimo dia de gestação.

Figura 12 – Percentual de inibição da síntese de PGF_{2α} estimulada por 25 ng/mL de PdBu em células BEND em função do intervalo entre 3 e 18 µg/mL de concentração total de proteínas presente no pool de lavados uterinos. Valores (linha tracejada) curva de regressão (linha contínua)

$$\text{inibição à síntese de PGF}_{2\alpha} = 39,49 + 1,59 (\text{concentração proteica})$$

$$50 = 39,49 + 1,59 (\text{concentração proteica})$$

$$\text{concentração proteica} = 6,61 \mu\text{g/mL}$$

$$1 \mu\text{g de proteína} \text{ _____ } 1 \text{ UA}$$

$$\text{atividade antiluteolítica} = \frac{\text{_____}}{6,61}$$

$$\text{Portanto } x = 0,151 \text{ UA/ } \mu\text{g de proteína}$$

A curva de resposta inibitória à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ obtida em função das concentrações avaliadas de $\text{rbIFN-}\tau$ nesse experimento está representada na Figura 13. Procedendo aos cálculos citados determinou-se a atividade antiluteolítica observada para o $\text{rbIFN-}\tau$ nesse experimento, calculou-se que a concentração que inibiu em 50% a síntese estimulada de PdBu foi de 1,13 ng/mL. Portanto, a atividade antiluteolítica do $\text{rbIFN-}\tau$ nesse experimento foi de $8,84 \times 10^2 \text{ UA}/\mu\text{g}$ de proteína.

Figura 13 – Percentual de inibição da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por PdBu em função do $\log_{10}$ da concentração de rbIFN-t+1 . Valores (linha tracejada) curva de regressão (linha contínua)

Aplicando a equação de normalização apresentada anteriormente, calculou-se a atividade antiluteolítica corrigida do pool de lavados uterinos obtidos de fêmeas prenhes no décimo sétimo dia de gestação:

$$\text{Atividade antiluteolítica normalizada} = \frac{9,61 \times 10^2 \text{ UA}/\mu\text{g}}{8,84 \times 10^2 \text{ UA}/\mu\text{g}} \times 0,151 \text{ UA}/\mu\text{g}$$

$$\text{Atividade antiluteolítica normalizada} = 0,163 \text{ UA}/\mu\text{g de proteína}$$

Assim, temos que a atividade antiluteolítica normalizada observada para o pool de lavados uterinos obtidos de fêmeas bovinas prenhes no décimo sétimo dia foi de $1,63 \times 10^{-1} \text{ UA}/\mu\text{g}$ de proteína.

3.3.4.3.2 Meios condicionados por conceptos

Na Figura 14 estão demonstrados os resultados de percentual de inibição à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por PdBu em função de cada concentração do pool de meio condicionado por concepto de dezessete dias testadas na etapa experimental inicial do estudo. Observou-se que a influência das diversas concentrações desse pool na síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por PdBu foi melhor definida por uma equação

polinomial de quarto grau. Notou-se um incremento agudo na inibição à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em função das menores concentrações testadas até a concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$, seguido de crescente declínio a partir dessa concentração. Com o objetivo de analisar um intervalo de concentrações desse pool que apresente resposta crescente na inibição da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e que possibilitasse observar o índice de 50% de inibição, sugeriu-se testar as concentrações entre 3 e 18 ng/mL de proteína total do pool de meio condicionado por conceptos.

Figura 14 – Percentual de inibição à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por 25 ng/mL de PdBu em células BEND em função da concentração total de proteínas presente no pool de meios condicionados por conceptos. Valores (linha tracejada) curva de regressão (linha contínua)

Os resultados obtidos no experimento final para o pool de meios condicionados por conceitos estão demonstrados na Figura 15. Através da equação de regressão linear obtida calculou-se a concentração do pool de meios condicionados por conceitos de dezessete dias de gestação que inibe em 50% a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por PdBu.

Figura 15 – Percentual de inibição da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por 25 ng/mL de PdBu em células BEND em função do intervalo entre 3 e 18 ng/mL de concentração total de proteínas presente no pool de meio condicionado por conceitos. Valores (linha tracejada) curva de regressão (linha contínua)

$$\text{inibição à síntese de } \text{PGF}_{2\alpha} = 2,487(\text{concentração proteica}) + 33,866$$

$$50 = 2,487(\text{concentração proteica}) + 33,866$$

$$\text{concentração proteica} = 6,48 \text{ ng/mL} = 0,00648 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

A partir desse valor calculou-se a atividade antiluteolítica da amostra:

$$\text{atividade antiluteolítica} = \frac{1}{0,00648}$$

$$\text{Portanto } x = 1,5 \times 10^2 \text{ UA} / \mu\text{g de proteína}$$

Aplicando os cálculos para normalização da atividade antiluteolítica, temos:

$$\begin{array}{l} \text{Atividade antiluteolítica} = \frac{9,61 \times 10^2 \text{ UA}/\mu\text{g}}{8,84 \times 10^2 \text{ UA}/\mu\text{g}} \times 1,5 \times 10^2 \text{ UA}/\mu\text{g} \\ \text{normalizada} \end{array}$$

$$\text{Atividade antiluteolítica normalizada} = 1,66 \times 10^2 \text{ UA}/\mu\text{g de proteína}$$

Assim determinou-se que a potência antiluteolítica observada para o pool de meios condicionados por conceptos obtidos no décimo sétimo dia de gestação foi de $1,66 \times 10^2 \text{ UA}/\mu\text{g}$ de proteína.

Os resultados obtidos nesse estudo indicam que a presença de atividade antiluteolítica pode ser até 1000 vezes maior nos meios condicionados por conceptos do que em lavados uterinos obtidos de fêmeas bovinas prenhes no décimo

sétimo dia de gestação. Esse resultado pode ser atribuído ao acúmulo de IFN- τ secretado pelo concepto ao longo das 24 horas de cultivo *in vitro* em volume restrito nos meios condicionados por conceptos, sendo os lavados uterinos, representativos da colheita de uma amostra do microambiente uterino em um único momento do tempo. Ressalta-se ainda que o IFN- τ secretado pelo concepto no ambiente uterino está sujeito aos mecanismos dinâmicos de síntese e degradação dessa molécula, os quais estão limitados no sistema de cultivo *in vitro*. Outro aspecto relevante é que o IFN- τ presente nos lavados uterinos encontra-se diluído entre secreções endometriais e embrionárias, enquanto no meio condicionado por concepto só estão presentes os produtos secretórios do concepto.

3.3.4.4 Conclusões do estudo

A observação da modulação na síntese de PGF $_{2\alpha}$ estimulada por PdBu em células BEND mediada pela ação tanto de um pool de lavados uterinos quanto de um pool de meios condicionados por conceptos obtidos de fêmeas bovinas no décimo sétimo dia da gestação realizada nesse estudo sugere mecanismos complexos envolvidos, dependentes da composição e concentração proteica. No entanto, o estudo da resposta inibitória à síntese de PGF $_{2\alpha}$ exercida por uma faixa ampla de concentrações desses pools permite sugerir um intervalo de

concentrações a serem testadas de modo a observar o índice de 50% de inibição na síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

O estudo da regressão linear da inibição à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em função de um intervalo restrito de concentrações para cada fluido testado apresentou comportamento linear, e sua equação permitiu calcular a concentração de cada pool que inibiu em 50% a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por PdBu .

Aplicando conceitos pertinentes ao desenvolvimento de um ensaio biológico, nesse estudo validou-se a metodologia do ensaio antiluteolítico e quantificou-se a atividade antiluteolítica presente em cada amostra. Para o pool de lavados uterinos obtidos no décimo sétimo dia de gestação observou-se atividade antiluteolítica de $1,63 \times 10^{-1}$ UA/ μg de proteína. Para o pool de meios condicionados por conceptos registrou-se atividade antiluteolítica de $1,66 \times 10^2$ UA/ μg de proteína.

3.3.5 Estudo 5. Atividade antiluteolítica no microambiente uterino durante o período crítico na gestação ou ciclo estral

A composição bioquímica do humor biológico presente no microambiente uterino é determinante para o êxito do estabelecimento da gestação nas fêmeas bovinas. Uma das moléculas que deve compor esse ambiente uterino durante a gestação é o $\text{IFN-}\tau$ secretado pelas células do trofotoderma embrionário. Sendo a

inibição à síntese endometrial de $\text{PGF}_{2\alpha}$ a atividade fundamental exercida pelo $\text{IFN-}\tau$ no ambiente uterino, o objetivo desse estudo foi mensurar a atividade antiluteolítica presente em líquidos obtidos do microambiente uterino de fêmeas bovinas prenhes ou cíclicas durante o período crítico para o estabelecimento da gestação, aplicando o ensaio biológico aqui proposto. Supõe-se que no microambiente uterino a atividade antiluteolítica seja maior devido à presença de $\text{IFN-}\tau$.

De forma similar ao procedido com os humores anteriormente avaliados, experimentos prévios aqui não relatados determinaram o intervalo de concentrações dos pools de lavados uterinos a ser utilizado para observar o índice de 50% de inibição na síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em células BEND.

3.3.5. 1 Delineamento experimental

Inicialmente, aplicando método de Braford (1976) determinou-se a concentração proteica dos lavados uterinos obtidos. Posteriormente os lavados uterinos obtidos de três animais diferentes foram agrupados de acordo com o dia do ciclo ou da prenhez formando pools de lavados uterinos de fêmeas cíclicas nos dias 14, 16 ou 18 após o estro sem inseminação (C14, C16, C18) e pools de lavados uterinos obtidos nos dias 14, 16 ou 18 após inseminação (P14, P16, P18). Foram considerados para compor os pools de lavados uterinos prenhes os

lavados obtidos de fêmeas com valores de progesterona sérica mensurados por radioimunoensaio acima de 1 ng/mL.

Em placas de 24 cavidades, células BEND foram tratadas apenas com meio completo sem soro, com 25 ng/mL de PdBu, ou ainda com 25 ng/mL de PdBu associado a 0,005, 0,01, 0,05 ou 0,1 µg/mL de proteína de cada pool de lavados uterinos em triplicata. Ainda nesses experimentos foram administrados tratamentos com 25 ng/mL de PdBu associado a 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 3,2 ou 6,4 ng/mL de rbIFN- τ em triplicata para elaboração da curva de resposta para o padrão nas condições desse experimento. As amostras foram coletadas seis horas após a aplicação dos tratamentos, acondicionadas em microtubos, armazenadas à -20 °C, e posteriormente submetidas à dosagem de PGF_{2 α} por radioimunoensaio.

3.3.5.2 Análises realizadas

Os dados de síntese de PGF_{2 α} observados para cada concentração testada de pool de lavado uterino foram submetidos aos cálculos para transformação em percentual de inibição em relação à síntese máxima de PGF_{2 α} . Os percentuais de inibição à síntese de PGF_{2 α} em função do log₁₀ + 3 da concentração proteica de cada pool de lavado uterino foram analisados por regressão linear. A partir da equação

obtida calculou-se a concentração de cada amostra que inibe em 50% a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por PdBu .

Ainda, para análise comparativa entre as atividades antiluteolíticas observadas no microambiente uterino durante o período crítico em fêmeas cíclicas ou prenhes, os resultados obtidos para os três dias foram agrupados e estudou-se a média dos percentuais de inibição em função das concentrações testadas do pool de lavados uterinos de fêmeas prenhes ou do pool de lavados uterinos de fêmeas cíclicas.

3.3.5.3 Resultados e discussão

Na Figura 16 estão representados os resultados obtidos para os pools de lavados uterinos obtidos de fêmeas bovinas nos dias 14, 16 e 18 da gestação. Observou-se que a análise de regressão do percentual de inibição à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em função da concentração proteica de cada pool de lavado uterino transformada por $\log_{10} + 3$ apresentou comportamento linear (P14 $r^2=0,76$; P16 $r^2=0,97$; P18 $r^2=0,89$).

Figura 16 – Percentual de inibição da síntese de PGF_{2α} estimulada por 25 ng/mL de PdBu em células BEND em função do log₁₀ + 3 da concentração total de proteínas do pool de lavados uterinos obtidos de fêmeas bovinas nos dias 14 (a), 16 (b) ou 18 (c) da gestação. Valores (linha tracejada) curva de regressão (linha contínua)

A partir das equações obtidas calculou-se a concentração de cada pool que inibe 50% da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por PdBu e sua respectiva atividade antiluteolítica.

$$\text{P14} - 50\% = 30,358x + 9,8246 = 0,020$$

$$\text{P16} - 50\% = 35,325x - 16,348 = 0,074$$

$$\text{P18} - 50\% = 43,585x - 8,8696 = 0,022$$

As atividades antiluteolíticas observadas para os pools de lavados uterinos obtidos de fêmeas bovinas nos dias 14, 16 ou 18 da gestação foram de respectivamente 50, 13,51 e 45,45 $\text{UA}/\mu\text{g}$ de proteína. Sugere-se que a menor atividade antiluteolítica observada no dia 16 possa estar relacionada ao fato da amostra ser um pool, ou seja, devido à interferência negativa de uma das prenhez.

Nesse experimento observou-se que o $\text{rbIFN-}\tau$ apresentou atividade antiluteolítica de $5,32 \times 10^2$ $\text{UA}/\mu\text{g}$ de proteína, sendo os cálculos procedidos a partir dos resultados obtidos para a curva desse padrão, ilustrados na Figura 17 o que implica num fator de normalização de 1,8.

Figura 17 – Percentual de inibição da síntese de PGF_{2α} estimulada por PdBu em função do log₁₀ da concentração de rBIFN-t+1. Valores (linha tracejada) curva de regressão (linha contínua)

Portanto as atividades antiluteolíticas normalizadas para os pools de lavados uterinos obtidos de fêmeas bovinas nos dias 14, 16 ou 18 da gestação foram respectivamente 90, 24,31 e 81,81 UA/μg de proteína

Na Figura 18 cada um dos gráficos representa os resultados do percentual de inibição à síntese de PGF_{2α} estimulada por PdBu em função das concentrações de pool de lavados uterinos obtidos de fêmeas bovinas nos dias 14, 16 e 18 durante o ciclo estral. Para todos os dias do ciclo estral, observa-se que a análise de regressão do percentual de inibição à síntese de PGF_{2α} em função das concentrações dos pools de lavados uterinos transformada por log₁₀ + 3 apresenta

comportamento linear (C14 $r^2=0,93$; C16 $r^2=0,92$; C18 $r^2=0,98$). Conforme metodologia descrita, a partir da equação obtida para cada dia do ciclo calculou-se a concentração de cada pool requerida para inibir em 50% a síntese máxima de PdBu, e determinou-se a atividade antiluteolítica de cada fluido.

Resolvendo as equações obtidas, calculou-se:

$$\text{C14} - 50\% = 12,928x + 22,186 = 0,141 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{C16} - 50\% = 8,96x + 29,908 = 0,173 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{C18} - 50\% = 40,239x - 9,6027 = 0,030 \mu\text{g/mL}$$

Portanto observou-se atividade antiluteolítica de 7,09, 5,78 e 33,3 UA/ μg de proteína para o pool de lavados uterinos obtidos nos dias 14, 16 e 18 do ciclo estral respectivamente. Aplicando o fator de normalização determinado para esse estudo, calculou-se que a atividade antiluteolítica nesses pools foi 12,76 UA/ μg de proteína para o obtido no dia 14, 10,4 UA/ μg de proteína para o obtido no dia 16, e 59,94 UA/ μg de proteína para o obtido no dia 18 do ciclo estral. Acredita-se que a presença de atividade antiluteolítica observada no microambiente uterino de fêmeas cíclicas não deve estar relacionada com a ação de IFN- τ . Sugere-se que a síntese de PGF $_{2\alpha}$ pode ser modulada por outras proteínas presentes no microambiente uterino durante o período crítico em fêmeas não-gestantes.

Figura 18 – Percentual de inibição da síntese de PGF_{2α} estimulada por 25 ng/mL de PdBu em células BEND em função do log₁₀ + 3 da concentração total de proteínas do pool de lavados uterinos obtidos de fêmeas bovinas nos dias 14 (a), 16 (b) ou 18 (c) do ciclo estral. Valores (linha tracejada) curva de regressão (linha contínua)

Com o objetivo de estudar as atividades antiluteolíticas presentes nos microambientes uterinos ao longo do período crítico em fêmeas cíclicas ou prenhes, os resultados obtidos para cada condição foram agrupados e estão apresentados na Figura 19.

A partir das equações obtidas calculou-se a atividade antiluteolítica média normalizada observada para os lavados uterinos obtidos de fêmeas cíclicas, $3,39 \times 10$ UA/ μ g de proteína e para os lavados uterinos obtidos de fêmeas prenhes de $5,62 \times 10$ UA/ μ g de proteína.

Figura 19 – Percentual de inibição da síntese de PGF_{2α} estimulada por 25 ng/mL de PdBu em células BEND em função do log₁₀ + 3 da concentração proteica do pool de lavados uterinos obtidos de fêmeas bovinas entre os dias 14 e 18 da gestação (linhas vermelhas) e da concentração proteica do pool de lavados uterinos obtidos de fêmeas bovinas entre os dias 14 e 18 do ciclo estral (linhas azuis). Valores (linha tracejada) curva de regressão (linha contínua)

De acordo com os resultados apresentados nota-se que a atividade antiluteolítica presente no microambiente uterino durante o período crítico em fêmeas bovinas gestantes, mensurada através do ensaio antiluteolítico, é maior do que a observada para o microambiente uterino no mesmo período em fêmeas cíclicas. Entretanto, observou-se atividade antiluteolítica no microambiente uterino na ausência de conceito. Ressalta-se que apenas uma repetição desse experimento foi realizada. Reconhece-se que a confiabilidade de um ensaio biológico se comprova através da repetibilidade de seus resultados, portanto, sugere-se que novas repetições sejam realizadas para consolidar o uso desse ensaio como ferramenta de estudo do reconhecimento materno da gestação em fêmeas bovinas.

3.3.5.4 Conclusões do estudo

O estudo da atividade antiluteolítica presente no microambiente uterino durante o período crítico tanto em fêmeas bovinas cíclicas quanto prenhes foi abordado aplicando o ensaio antiluteolítico e observou-se que as amostras obtidas durante a gestação tem maior atividade antiluteolítica do que as obtidas durante o ciclo estral, provavelmente devido à presença de IFN- τ secretado pelo conceito.

Observou-se atividade antiluteolítica no microambiente uterino durante o ciclo estral, ou seja, na ausência de conceito, na ausência de IFN- τ . Esse resultado sugere que existe um gradiente de modulação à síntese no microambiente uterino exercido por outras proteínas presentes, até o momento não esclarecido.

4 DISCUSSÃO GERAL

Diante do contexto da alta incidência de mortalidade embrionária associada ao período crítico relatada na espécie bovina, esse estudo teve como objetivo propor uma ferramenta que permita mensurar, no contexto de um ensaio biológico, a capacidade de uma gestação em sinalizar sua presença e estabelecer-se com êxito.

Para tanto, conforme descrito nos estudos 1, 2, 3 e 4 dessa tese foi desenvolvido e validado o ensaio antiluteolítico. Um ensaio biológico onde ao observar a modulação da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em um cultivo celular endometrial, propõe-se mensurar a capacidade antiluteolítica exercida por humores biológicos de interesse. De acordo com os resultados apresentados observou-se que a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ foi modulada em função da concentração proteica dos fluidos biológicos e que através do estudo matemático desse evento foi possível determinar a potência com que esse fluido exerceu esse efeito biológico.

No primeiro estudo comprovou-se a validade da escolha das células BEND como modelo biológico adequado à elaboração do ensaio antiluteolítico. Assim como em outros estudos observou-se que as células BEND sintetizam $\text{PGF}_{2\alpha}$ ao serem expostas à ação do PdBu e que esse estímulo é inibido na presença de $\text{rbIFN-}\tau$ (BINELLI et al., 2000; GUZELOGLU, MICHEL E THATCHER, 2004; GUZELOGLU et al., 2004a; GUZELOGLU et al., 2004b).

Esse estímulo consistente na síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ exercido pelo PdBu , e observado nas células BEND, conforme relatos do segundo estudo, tem sido utilizado

por diversos autores nos estudos pertinentes aos mecanismos envolvidos nessa síntese, tanto na luteólise, como no reconhecimento materno da gestação nas fêmeas bovinas (BADINGA; GUZELOGLU; THATCHER, 2002; BINELLI et al., 2000; GUZELOGLU et al., 2004a; GUZELOGLU et al., 2004b; RODRIGUEZ-SALLABERRY et al., 2006; PRU et al., 2001b). Foi proposto o uso desse estímulo farmacológico para observar a inibição à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ mediada por líquidos biológicos submetidos ao ensaio antiluteolítico.

A modulação na síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por PdBu em células BEND, exercida por crescentes concentrações proteicas de rbIFN- τ , observada no terceiro estudo, permitiu sugerir a quantificação da atividade biológica dessa isoforma através da análise desse evento biológico por regressão linear. Nos ensaios antivirais definiu-se que a atividade antiviral é calculada como o recíproco da diluição da amostra testada requerida para proteger em 50% as células contra o efeito citotóxico máximo produzido pelo desafio viral (ARMSTRONG 1981; FAMILLETI, RUBINSTEIN; PETSKA, 1981; MEAGER 2002). No ensaio antiluteolítico definiu-se a atividade antiluteolítica como o recíproco da concentração proteica requerida para inibir em 50% a síntese máxima de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (observada na presença apenas do estímulo de PdBu). Com o objetivo de expressar essa atividade em função do conteúdo proteico da amostra determinou-se que uma solução com uma unidade antiluteolítica (1 UA) é aquela que com uma micrograma de proteína atinja o percentual de 50% de inibição na síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Os resultados e conceitos relatados no terceiro estudo sugerem a utilização do rbIFN- τ como solução padrão na elaboração do ensaio antiluteolítico

e permitem calcular a atividade antiluteolítica dessa isoforma, $9,61 \times 10^2$ UA/ μ g de proteína.

Enfim, no quarto estudo, observou-se que a análise da modulação da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por PdBu em células BEND, em função da concentração proteica de lavados uterinos ou de meios condicionados por conceptos obtidos no décimo sétimo dia de gestação, pode ser utilizada para quantificar a atividade antiluteolítica presente em cada fluido biológico. Entretanto, notou-se um aspecto interessante nesse estudo, cada fluido biológico (lavado uterino ou meio condicionado por conceito obtidos de fêmeas bovinas no décimo sétimo dia de gestação) apresentou um perfil de inibição à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ distinto em função da concentração proteica presente. Notou-se uma alta sensibilidade desse sistema proposto de mensuração da inibição da síntese de PGF à ação desse pool de meios condicionados por conceptos. Alterações marginais na escala de nanograma para o meio condicionado por conceito exerceram um efeito agudo na inibição da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ não observado para o lavado uterino. Inferiu-se que esse efeito esteja relacionado com a diferente composição que esses fluidos devem apresentar. O meio condicionado por conceito é produto da secreção de um conceito em cultivo *in vitro* por 24 horas, e o lavado uterino é o produto de uma lavagem uterina em um único momento e onde devem estar presentes proteínas secretadas tanto pelo endométrio, quanto pelo conceito, quanto oriundas da circulação sistêmica. Portanto sugere-se que para cada fluido submetido ao ensaio antiluteolítico seja realizado um estudo de diluições que permita observar o melhor intervalo de concentrações para proceder à mensuração da atividade antiluteolítica. A partir de um intervalo definido de

concentrações quantificou-se a atividade antiluteolítica presente em cada fluido, para o pool de lavados uterinos $1,63 \times 10^{-1}$ UA/ μ g de proteína, e para o pool de meios condicionados por conceptos registrou-se potência de $1,66 \times 10^2$ UA/ μ g de proteína. Acredita-se que a maior atividade antiluteolítica observada para o meio condicionado por concepto esteja relacionada com a discutida composição variada entre os fluidos, refletindo na resposta aguda registrada para o meio condicionado por concepto quanto à inibição da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Considera-se que o ensaio antiluteolítico elaborado e validado é pertinente ao estudo do reconhecimento materno da gestação pois mensura uma atividade biológica molecular fundamental nesse processo, a inibição da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$, aqui referida como atividade antiluteolítica, entretanto, salienta-se que não foi avaliada nesse estudo a correlação com o efetivo bloqueio fisiológico da luteólise, refletido na extensão do ciclo estral.

Com o emprego do ensaio antiluteolítico, estudou-se no quinto estudo dessa tese, a presença da atividade antiluteolítica no microambiente uterino em fêmeas bovinas prenhes ou não, especificamente no período crítico para o desenvolvimento da gestação. Observou-se maior atividade antiluteolítica no microambiente uterino durante a gestação do que durante o ciclo estral, o que sugere a participação do $\text{IFN-}\tau$ secretado pelo concepto. Entretanto, a presença de atividade antiluteolítica no microambiente uterino durante o ciclo estral indica que existem outras moléculas que atuam nesse sistema. Tal fato indica que o ensaio antiluteolítico é eficaz em observar a inibição à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$, no entanto tal fenômeno biológico não é determinado apenas pela atuação de $\text{IFN-}\tau$, conforme discutido adiante. Ressalta-se que foi realizada apenas uma repetição

experimental desse estudo, o que restringe a discussão dos dados.

Tendo em vista que o ensaio antiluteolítico observa a inibição da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$, nesse momento da discussão retoma-se alguns conceitos sobre os mecanismos envolvidos na regulação da síntese dessa molécula. Especula-se que os resultados obtidos nesse trabalho reflitam os conceitos debatidos na literatura de que a regulação do sistema prostaglandina é complexa e envolve mecanismos de biossíntese (regulação na intensidade de expressão ou atividade das enzimas necessárias à biossíntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ como fosfolipase, COX e PGFS), catabolismo (realizado na presença de enzimas específicas), transporte regulado de PG para os compartimentos intra e extra-celular e regulação da expressão ou atividade dos subtipos específicos de receptores para PGs (HELIWELL et al., 2004; PARENT et al., 2006).

Sugere-se portanto que a atividade antiluteolítica determinada nesse ensaio biológico seja resultante do balanço entre as atuações de algumas moléculas nos possíveis mecanismos de controle da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ nas condições estabelecidas, conforme ilustrado na Figura 20.

Figura 20 – Modelo hipotético gráfico da modulação da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada pelo PdBu exercida por lavados uterinos obtidos de fêmeas cíclicas, ou por lavados uterinos obtidos de fêmeas prenhes ou por meio condicionado por concepto, observada em células BEND. Limitado pela chave está representado o estímulo farmacológico à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ exercido pelo PdBu. Elementos verdes representam mecanismos de inibição à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$; e elementos laranjas representam mecanismos de estímulo à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Supõe-se que na composição dos lavados uterinos de fêmeas cíclicas existam moléculas que atuem estimulando (círculos laranja) e inibindo (círculos verdes) a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$, assim como na composição dos lavados uterinos de

fêmeas prenhes e meios condicionados por conceptos. Entretanto sabe-se que na presença de um concepto essa composição está acrescida de IFN- τ . Esses fatores podem atuar de maneira direta ou indireta nas citadas vias de controle da síntese de PGF $_{2\alpha}$, atuando diretamente para limitar ou disponibilizar moléculas necessárias à sua, bem como modular a expressão de genes envolvidos na modulação da síntese de PGF $_{2\alpha}$.

A seguir discute-se sobre algumas moléculas que interferem com essa síntese e que podem estar envolvidas com as atividades antiluteolíticas observadas para o microambiente uterino nas fêmeas prenhes e cíclicas.

Okuda, Myamoto e Skarzynski (2002) discutiram sobre algumas moléculas que interferem com a síntese endometrial de PGF $_{2\alpha}$. Além da participação de ocitocina e hormônios esteróides já debatidos, destaca-se o fator ativador de plaquetas (PAF), o LH, a própria PGF $_{2\alpha}$ e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α).

Battye, Evans e O'Neill (1996) observaram a expressão de PAF no útero de fêmeas ovinas quando são observados os pulsos de PGF $_{2\alpha}$. Ainda, o PAF aumenta a liberação de PGF $_{2\alpha}$ pelo endométrio ovino *in vitro* (BATTYE; EVANS; O'NEILL, 1996) e *in vivo* (CHAMI et al., 1999). Embora a síntese de PAF pelo endométrio bovino não esteja bem definida, no experimento conduzido por Gross et al. (1990) observou-se que PAF inibiu a liberação de PGF $_{2\alpha}$ e estimulou a liberação de PGE $_2$ em explantes endometriais obtidos de vacas no décimo sétimo dia do ciclo estral. Contudo Kim e Fortier (1995) demonstraram que o PAF estimula a produção de PGF $_{2\alpha}$ e PGE $_2$ em células epiteliais e estromais. O papel do PAF na regulação da síntese de PGF $_{2\alpha}$ permanece em discussão.

Observou-se que a administração de um análogo de $\text{PGF}_{2\alpha}$ aumenta a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial no décimo oitavo dia do ciclo estral (WADE; LEWIS, 1996). Tem sido demonstrado que a $\text{PGF}_{2\alpha}$ ativa a PKC e aumenta a mobilização de cálcio intracelular (SKARZYNSKI; OKUDA, 1999) o que resulta em estímulo à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial (BURNS et al., 1997; SKARZYNSKI et al., 1999). Portanto, considera-se que a $\text{PGF}_{2\alpha}$ seja um componente essencial no mecanismo de regulação de sua própria produção.

Outros autores tem estudado a presença de receptores funcionais para $\text{TNF-}\alpha$ no endométrio bovino durante o ciclo estral e sugerido a participação dessa molécula na síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (MURAKAMI et al., 2001; MYAMOTO; SKARZYNSKI; OKUDA, 2000; SKARZYNSKI; MYAMOTO; OKUDA, 2000). Observou-se que o $\text{TNF-}\alpha$ estimula a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em células endometriais estromais via ativação da PLA_2 e óxido nítrico sintase (SKARZYNSKI; MYAMOTO; OKUDA, 2000). Sendo a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ preferencialmente realizada pelas células endometriais epiteliais, hipotetiza-se que a síntese de induzida pelo $\text{TNF-}\alpha$ seja um importante componente na cascata de auto-amplificação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ e ative a regulação positiva entre a $\text{PGF}_{2\alpha}$ epitelial e a ocitocina luteal na luteólise.

A composição do microambiente uterino tem sido foco de estudos desde os anos 80 até os dias atuais. Recentemente um estudo que aplica a técnica de eletroforese bidimensional observou a expressão proteica diferencial devido à presença de um conceito no ambiente uterino em vacas gêmeas monozigóticas (BERENDT et al., 2005). esse estudo destaca-se a observação de que a enzima 20 alfa-hidróxi-esteróide desidrogenase ($20\ \alpha\text{-HSD}$), envolvida na síntese de

PGF_{2α} endometrial (MADORE et al., 2003), está aumentada nos animais prenhes. Acredita-se que tais estudos, especialmente utilizando abordagens metodológicas inovadoras, colaborem com esclarecimentos sobre os mecanismos pelos quais a sinalização materno-embrionária se estabelece.

No microambiente uterino das fêmeas gestantes acredita-se que a molécula determinante à inibição da síntese de PGF_{2α} endometrial seja o IFN-τ. Desde os estudos nas décadas de 80 e 90 demonstra-se que a infusão intrauterina tanto de um complexo protéico secretado por concepto quanto de interferon-tau recombinante inibem a síntese de PGF_{2α} em fêmeas bovinas (HELMER et al., 1989; MEYER et al., 1995; KNICKERBOCKER et al., 1986). Portanto, diante do contexto apresentado sobre os mecanismos envolvidos na síntese de PGF_{2α}, acredita-se que a maior atividade antiluteolítica observada para o meio condicionado por concepto no estudo 4 e para o lavado uterino obtido durante a prenhez no estudo 5, refletem a presença do IFN. Especialmente a resposta aguda na inibição da síntese de PGF_{2α} observada para o pool de meios condicionados por conceptos. Sugere-se que a aplicação da técnica de identificação proteica por western blotting aos humores biológicos permitirá o estudo da correlação entre a concentração proteica de IFN-τ e a atividade antiluteolítica observadas para uma determinada amostra.

Outro item que merece discussão refere-se à aplicação do ensaio antiluteolítico. Os fluidos biológicos suspeitos de conterem IFN-τ testados nesse trabalho implicam em colheita de material que interrompe a gestação, o que inviabiliza a correlação da atividade antiluteolítica com o sucesso da gestação. Entretanto, como tem sido observado que o IFN-τ encontra-se expresso já no

estágio de blastocisto, tanto por técnicas de expressão gênica (BERTOLINI et al., 2002), quanto por expressão da atividade antiviral (KUBISCH et al., 2001; LARSON et al., 2001), sugere-se que o ensaio antiluteolítico possa ser utilizado para observar a atividade antiluteolítica no meio de cultivo de embriões produzidos *in vitro* e correlacionar os resultados com taxas relativas ao desenvolvimento *in vitro* e posterior resultado da gestação.

Sumariamente considera-se que o enfoque da atividade antiluteolítica presente em humores biológicos proposto nessa tese, pode ser útil ao estudo dos mecanismos envolvidos no reconhecimento materno da gestação em fêmeas bovinas. Entretanto outros estudos ainda devem ser conduzidos com o objetivo de comprovar a relação entre a atividade antiluteolítica e a expressão de IFN- τ .

5 SUMÁRIO DOS RESULTADOS E IMPLICAÇÕES

As células BEND constituem um modelo biológico adequado para o desenvolvimento do ensaio antiluteolítico.

Foi estabelecido um estímulo farmacológico com 25 ng/mL de PdBu à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ para observar a inibição de tal síntese (atividade antiluteolítica) em células BEND.

Definiu-se uma curva de inibição à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimulada por PdBu em resposta ao $\text{rbIFN-}\tau$, calculou-se a atividade antiluteolítica dessa isoforma, $9,61 \times 10^2$ UA/ μg de proteína e definiu-se essa isoforma como padrão do ensaio antiluteolítico.

O estudo da modulação da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelos humores biológicos avaliados indicaram mecanismos regulatórios complexos na síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$, influenciado por diversas moléculas, variáveis quanto à natureza de tal fluido. Sugere-se que um estudo de diluições para cada tipo de fluido a ser submetido ao ensaio antiluteolítico seja realizado para definir o intervalo de concentrações proteicas que permite calcular a atividade antiluteolítica presente nesses humores.

Observou-se que a atividade antiluteolítica foi superior no meio condicionado por conceito e em lavados uterinos obtidos tanto *ex vivo* quanto *in vivo* de fêmeas prenhes, em relação ao observado para os lavados uterinos obtidos de fêmeas cíclicas. Esses resultados sugerem que a presença de $\text{IFN-}\tau$ determina uma maior atividade antiluteolítica observada pelo ensaio antiluteolítico.

Entretanto observou-se que moléculas presentes nos lavados uterinos de fêmeas bovinas obtidos na ausência de conceito interferem com a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Sugere-se que a atividade antiluteolítica, observada através do ensaio biológico proposto, é resultante da atuação de fatores estimulatórios e inibitórios, presentes nos humores biológicos, nos mecanismos de síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Entretanto, Indica-se que outros estudos devam ser realizados para correlacionar essa observada atividade biológica com a presença de $\text{IFN-}\tau$

6 CONCLUSÃO

Nesse estudo foi desenvolvida e validada a metodologia de um ensaio biológico *in vitro* onde, através da observação da inibição à síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ em função da concentração proteica em um cultivo celular endometrial, mensurou-se a atividade antiluteolítica presente em humores biológicos.

REFERÊNCIAS

ABECIA J.A.; FORCADA F.; ZÚÑIGA O. Differences in reproductive performance, embryo development, interferon-tau secretion by conceptus and luteal function in ewe lambs synchronized in oestrus before or after the spontaneous onset of luteal activity preceding puberty. **Reprod Dom Anim** 36: 73-77, 2001.

AGUET M. The interferon-gamma receptor: a comparison with other cytokine receptors. **J Interferon Res** 10:551-558, 1990.

ALEXENKO A.P.; LEAMAN D.W.; LI L.; ROBERTS R.M. The antiproliferative and antiviral activities of IFN- τ variants in human cells. **J Interferon Cyt Res** 17: 769-779 1997.

ALEXENKO A.P.; EALY A.D.; BIXBY J.A.; ROBERTS R.M. A classification of interferon- τ . **J Inter Cytok Res** 20: 817-822, 2000.

ALLEN W.M.; CORNER G.W. Physiology of the corpus luteum. VII. Maintenance of pregnancy in rabbit after very early castration by corpus luteum extracts. **Proc Soc Exp Biol Med** 27: 403-405; 1930.

ANDERSON L.L.; BLAND K.P.; MELAMPY R.M. Comparative aspects of uterine-luteal relationships. **Rec Prog Horm Res** 25: 57-104, 1969.

AMSTRONG D.T.; HANSEL W. Alteration of the bovine estrous cycle with oxytocin. **J Dairy Sci** 42: 533-542, 1959.

ARMSTRONG J.A. Cytopathic effect inhibition assay for interferon: Microculture plate assay. **Methods in Enzymology** 78: 381-387, 1981.

ARNOLD D. R.; BINELLI M.; VONK J.; ALEXENKO A. P.; DROST M.; WILCOX C. J.; THATCHER W. W. Intracellular regulation of endometrial PGF $_{2\alpha}$ and PGE $_2$ production in dairy cows during early pregnancy and following treatment with recombinant interferon- τ . **Dom Anim Endoc** 18: 199-216, 2000.

ASHWORTH C.J.; BAZER F.W. Changes in ovine conceptus and endometrial function following asynchronous embryo transfer or administration of progesterone. **Biol Reprod** 40: 425-433, 1989.

ASSELIN E.; GOFF A. K.; BERGERON H.; FORTIER M. A. Influence of sex steroids on the production of prostaglandin F $_{2\alpha}$ and E $_2$ and response to oxytocin in cultured epithelial and stromal cells of bovine endometrium. **Biol Reprod** 54: 371-379, 1996.

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

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

AULETTA J.F.; FLINT A.P.F. Mechanisms controlling corpus luteum function in sheep, cows, nonhuman primates and women, especially in relation to the time of luteolysis. **Endocrine Reviews** 9: 88-105, 1988.

AUSTIN K.J.; WARD S.K.; TEIXEIRA M.G.; DEAN V.C.; MOORE D.W.; HANSEN T.R. Ubiquitin cross-reactive protein is released by the bovine uterus in response to interferon during early pregnancy. **Biol Reprod** 54: 600-606, 1996.

AUSTIN K.J.; CARR A.L.; PRU J.K.; HEARNE C.E.; GEORGE E.L.; BELDEN E.L.; HANSEN T.R. Localization of ISG15 and conjugated proteins in bovine endometrium using immunohistochemistry and electron microscopy. **Endocrinology** 145: 967-975, 2004.

BADINGA L.; GUZELOGLU A.; THATCHER W.W. Bovine somatotropin attenuates phorbol ester-induced prostaglandin F2 α production in bovine endometrial cells. **J Dairy Sci** 85: 537-543, 2002.

BAO Y.; PUCCI M.L.; CHAN B.S.; LU R.; ITO S.; SCHUSTER V.L. Prostaglandin transporter PGT is expressed in cell types that synthesize and release prostanoids. **Am J Physiol Renal Physiol** 282: F1103-F1110, 2002.

BARTOL F.F.; ROBERTS R.M.; BAZER F.W.; LEWIS G.S.; GODKIN J.D.; THATCHER W.W. Characterization of proteins produced in vitro by periattachment bovine conceptuses. **Biol Reprod** 32: 681-693, 1985.

BATHGATE R.A.D.; TILLMANN G.; IVELL R. Molecular mechanism of the bovine oxytocin receptor gene regulation. **Biol Reprod** 58 Suppl 160, 1998.

BATTYE K.M.; EVANS G.; ONEILL C. Ovine endometrium synthesizes and releases platelet-activating factor, which can cause the release of prostaglandin F2 α by the uterus *in situ*. **Biol Reprod** 54: 355-363, 1996.

BAUERSACHS S.; ULBRICH S.E.; GROS K.; SCHMIDT S.E.M.; MEYER H.H.D.; WENIGERKIND H.; VERMEHREN M.; SINOWATZ F.; BLUM H.; WOLF E. Embryo-induced transcriptome changes in bovine endometrium reveal species-specific and common molecular markers of uterine receptivity. **Reproduction** 132: 319-331, 2006.

BAZER F.W.; SPENCER T.E.; OTT T.L. Interferon-tau: a novel pregnancy recognition signal. **Americ J Reprod Immun** 37: 412-420, 1997.

BEARD A.P.; LAMMING G.E. Oestradiol concentration and the development of uterine oxytocin receptor and oxytocin-induced PGF_{2 α} release in ewes. **J Reprod Fertil** 100: 469-475, 1994.

BERENDT F.J.; FRÖLICH T.; SCHMIDT S.E.M.; REICHENBACH H-D.; WOLF E.; ARNOLD G.J. Holistic differential analysis of embryo-induced alterations in the proteome of bovine endometrium in the preattachment period. **Proteomics** 5: 2551-2560, 2005.

BERISHA B.; SCHAMS D.; KOSMANN M.; AMSELGRUBER W.; EINSPANIER R. Expression and tissue concentration of vascular endothelial growth factor, its receptors and localization in the bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. **Biol Reprod** 63: 1106–1114, 2000.

BERTAN C.M. **Mecanismos endócrinos e moleculares pelos quais o estradiol estimula a síntese de prostaglandina F2 alpha no endométrio de fêmeas bovinas**. 2004. 180p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo 2004.

BERTOLINI M.; BEAM S.W.; SHIM H.; BERTOLINI L.R.; MOYER A.L.; FAMULA T.R.; ANDERSON G.B. Growth, development, and gene expression by in vivo and in vitro-produced day 7 and 16 bovine embryos. **Mol Reprod Devel** 63: 318-328, 2002.

BINELLI M.; GUZELOGLU A.; BADINGA L.; ARNOLD D.R.; SIROIS J.; HANSEN T.R.; THATCHER W.W. Interferon-(modulates phorbol ester-induced production of prostaglandin and expression of cyclooxygenase-2 and phospholipase A2 from bovine endometrial cells. **Biol Reprod** 63: 417-424, 2000.

BINELLI M.; THATCHER W.W.; MATTOS R.; BARUSELLI P.S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Therio* 56(9): 1451-1463, 2001.

BJÖRKMAN N. Placentation. In: ULLMANN H.D.; BROWN E.M. Textbook of Veterinary Histology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p. 351-369. 1976.

BRADFORD M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochemical** 72: 248-54, 1976.

BURNS P.D.; GRAF G.A.; HAYES S.H.; SILVIA W.J. Cellular mechanisms by which oxytocin stimulates uterine PGF_{2α} synthesis in bovine endometrium: roles of phospholipases C and A₂. **Domest Anim Endocr** 14: 181-191, 1997.

BUTENANDT A.; WESTPHAL U. Zur isolierung und charakterisierung des corpus-luteum hormons. **Berichte Deutsch Chem Geseilsch** 67: 1440-1442, 1934.

CANINO C.J.; REED J.; SHEMESH M.; CHANG S.M.T; MARINO V.K.; HIERS E.A.; BINTA H.; LUCE B.R.; THATCHER W.W.; FIELDS M.J. Induction of prostaglandin synthesis via LH/hCG-mediated receptors in the bovine uterus. **Biol Reprod** 60 (supl 1): p. 262, 1999.

CAPON D.J.; SHEPARD H.M.; GOEDDEL D.V. Two distinct families of human and bovine interferon-α genes are co-ordinately expressed and encode functional polypeptides. **Mol Cell Biol** 5: 768, 1985.

CARAMBULA S.F.; MAITIKAINEM T.; LYNCH M.P.; FLAVEL R.A.; DIAS GONCALVES P.B.; TYLLI J.L.; RUEDA B.R. Caspase-3 is a pivotal mediator of apoptosis during regression of ovarian corpus luteum. **Endocrinology** 143: 1495-1501, 2002.

CARSON D.D.; BAGCHI I.; DEY S.K.; ENDERS A.C.; FAZLEABAS A.T.; LESSEY B.A.; YOSHINAGA K. Embryo implantation. **Develop Bio** 223: 217-237, 2000.

CHAMI O.; MEGEVAND A.; OTT T.; BAZER F.; ONEILL C. Platelet-activating factor may act as an endogenous pulse generator for sheep of luteolytic PGF2 α release. **Am J Physiol** 276: E783-792, 1999.

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 contain a Ca(2+)- dependent translocation domains with homology to PKC and GAP. **Cell** 65: 1043-1051, 1991.

COITER V. Externarum et internarum principalium humani corporis partium tabulae microform: atque exercitationes observationesque, novis, diversis, ac artificosissimus figeris illustratae, philosophis, medicis, in primis autem anatomico studio addictis summe utiles. In: **Officina Theodorici Gerlatzeni**. Nuremberg, Germany: 1573.

COMMITTEE ON BOVINE REPRODUCTIVE NOMENCLATURE. Recommendations for standardizing bovine reproductive terms. **Comell Vet** 62: 216-237, 1972.

CONCANNON P.W.; ISAMAN L.; FRANK D.A.; MICHEL F.J.; CURRIE W.B. Elevated concentrations of 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F-2 α in maternal plasma during prepartum luteolysis and parturition in dogs (*Canis familiaris*). **J Reprod Fertil** 84:71-77, 1988.

CORNER G.W.; ALLEN W.M. Normal growth and implantation of embryos after very early ablation of the ovaries under the influence of extracts of the corpus luteum. **Am J Physiol** 88: 340-346; 1929.

DANET-DESNOYERS C.; WETZELS C.; THATCHER W.W. Natural and recombinant bovine interferon-tau regulated basal and oxytocin-induced secretion of prostaglandins F2 α and E $_2$ by epithelial and stromal cells in the endometrium. **Reprod Fertil Devel** 6: 193-202, 1994.

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

DE GRAAF R. De Mullierum Organis Generatione Intervientibus. Leyden, 1672, translated by G.W. Corner. In: **Essays in Biology**. Berkeley, CA: University of California Press, 1943.

DEBLANDRE G.A.; MARINX O.P.; EVANS S.S.; MAJAJ S.; LEO O.; CAPUT D.; HUEZ G.A.; WATHELET M.G. Expression cloning of an interferon-inducible 17-kDa membrane protein implicated in the control of cell growth. **J Biol Chem** 270: 23860-23866, 1995.

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

DIAZ F.J.; ANDERSON L.E.; WU Y.L.; RABOT A.; TSAI S.J.; WILTBANK M.C. Regulation of progesterone and Prostaglandin F_{2α} production in the CL. **Mol Cellular Endoc** 191: 65-68, 2002.

DISKIN M.G.; SREENAN J.M. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. **J Reprod Fertil** 59: 463-468, 1980.

DROST M.; AMBROSE J.E.; THATCHER M.-J.; CANTRELL C.K.; WOLFSDORF K.E.; HANSEN J.F.; THATCHER W.W. Conception rates after artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows during summer in Florida. **Therio** 52: 1161-1167, 1999.

EALICK S.E.; COOK W.J.; VIJAY-KUMAR S.; CARSON M.; NAGABHUSH-IN T.L.; TROTTA P.P.; BUGG C.E. Three-dimensional structure of recombinant interferon-γ. **Science** 252: 698, 1991.

EALY A.D.; GREEN J.A.; ALEXENKO A.P.; KEISLER D.H.; ROBERTS R.M. Different ovine interferon-tau genes are not expressed identically and their protein products display different activities. **Biol Reprod** 58: 566-573, 1998.

EALY A.D.; LARSON S.F.; LIU L.; WILKELMANN G.L.; KUBISH H.M.; BIXBY J.A.; ROBERTS R.M. Polymorphic forms of expressed bovine interferon-τ genes: relative transcript abundance during early placental development, promoter sequences of genes and biological activity of protein products. **Endocrinology** 142: 2906-2915, 2001.

EALY A.D.; WAGNER S.K.; SHEILS A.E.; WHITLEY N.C.; KIESLING D.O.; JOHNSON S.E.; BARBATO G.F. Identification of interferon-τ isoforms expressed by the peri-implantation goat (*Capra hircus*) conceptus. **Dom Anim Endocrin** 27: 39-49, 2004.

EVANS S.S.; COLLEA R.P.; LEASURE J.A.; LEE D.B. IFN-α induces homotypic adhesion and Leu-13 expression in human B lymphoid cells. **J Immunol** 150: 736-747, 1993.

FAIRCLOUGH R.J.; SMITH J.F.; MCGOWAN. Prolongation of the estrous cycle in cows and ewes after passive immunization with PGF antibodies. **J Reprod Fertil** 62: 213-219, 1981.

FAMILETTI P.C.; RUBINSTEIN S.; PETSKA S. A convenient and rapid cytopathic effect inhibition assay for interferon. **Methods Enzym** 78: 387-394, 1981.

FARIN C.E.; IMAKAWA K.; ROBERTS R.M. *In situ* localization of mRNA for the interferon, ovine trophoblast protein-1, during embryonic development of the sheep. **Mol Endocrinol** 3: 1099-1107, 1989.

FINDLAY J.K. **Molecular biology of the female reproductive system**. London: Academic Press, 1994. 457 p.

FITZ A.; MAYAN M.H.; SAWYER H.R. Characterization of two steroidogenic cell types in the ovine corpus luteum. **Biol Reprod** 27: 703-22, 1982.

FLINT A.P.F.; SHELDRIK E.L. Continuous infusion of oxytocin prevents induction of uterine oxytocin receptor and blocks luteal regression in cyclic ewes. **J Reprod Fertil** 75: 623-631, 1985.

FRIEDMAN S.; GUREVICH M.; SHEMESH M. Bovine cyclic endometrium contains high-affinity luteinizing hormone/ human chorionic gonadotropin binding sites. **Biol Reprod** 52: 1020-26, 1995.

FUCHS A.R.; BEHRENS O.; HELMER H.; LIU C-H.; BARROS C.M.; FIELDS L.J. Oxytocin and vasopressin receptor in bovine endometrium and myometrium during the oestrous cycle and early pregnancy. **Endocrinology** 127: 629–636, 1990.

GARRIDO C.; SAULE S.; GOSPODAROWICZ D. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ovarian bovine granulosa cells. **Growth Factors** 8: 109–117, 1993.

GENGENBACH D.R.; HIXON J.E.; HANSEL W. Antiluteolytic interaction between estradiol and prostaglandin F_{2α} in hysterectomized ewes. **Biol Reprod** 16: 571, 1977.

GEISERT R.D.; ZAVY M.T.; BIGGERS B.G.; GARRET J.E.; WETTEMANN R.P. Characterization of the uterine environment during early conceptus expansion in the bovine. **Anim Reprod Sci** 38: 703-712, 1988.

GINTHER O.J.; DELCAMPO C.H. Vascular anatomy of the uterus and ovaries and unilateral luteolytic effect of the uterus: cattle. **Am J Vet Res** 35: 193-203, 1974.

GODKIN J.D.; BAZER F.W.; MOFFAT J.; SESSIONS F.; ROBERTS R.M. Purification and properties of a major, low molecular weight protein released by the trophoblast of sheep blastocysts on day 13-21. **J Reprod Fertil** 65: 141-150, 1982.

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

GODKIN J.D.; SMITH S.E.; JOHNSON R.D.; DORE J.J.E. The role of trophoblast interferons in the maintenance of early pregnancy in ruminants. **Americ J Reprod Immun** 37: 137-143, 1997.

GOEDE V.; SCHMIDT T.; KIMMINA S.; KOZIAN D.; AUGUSTIN H.G. Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. **Lab Invest** 78: 1385–1394, 1998.

GOFF A.K. Steroid hormone modulation of prostaglandin secretion in the ruminant endometrium during the estrous cycle. **Bio Reprod** 71: 11-16, 2004.

GOSPODAROWICZ D.; CHENG J.; LUI G.M. Corpus luteum angiogenic factor is related to fibroblast growth factor. **Endocrinology** 117: 2383-91, 1985.

GRAY P.W.; LEUNG D.W.; PENNICA D. Expression of human immune interferon cDNA in *E. coli* and monkey cells. **Nature** 295: 503, 1982.

GRAY C.A.; ABBEY C.A.; BEREMAND P.D.; CHOI Y.; FARMER J.L.; ADELSON D.L.; THOMAS T.L.; BAZER F.W.; SPENCER T.E. Identification of endometrial genes regulated by early pregnancy, progesterone, and interferon tau in the ovine uterus. **Biol Reprod** 74: 383–394, 2006.

GRAZUL-BILSKA A.T.; REDMER D.A.; KILLILEA S.D. Production of mitogenic factor(s) by ovine corpora lutea throughout the estrous cycle. **Endocrinology** 130 (6): 3625-32, 1992.

GROSS T.S.; THATCHER W.W.; ONEILL C.; DANET-DESNOYERS G. Platelet-activating factor alters the dynamics of prostaglandin and protein synthesis by endometrial explants from pregnant and cycling cows at day 17 following estrus. **Therio** 34: 205-218, 1990.

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

GUILLOMOT M.; REINAULD P.; La BONNARDIERE C.; CHARPIGNY G. Characterization of conceptus-produced goat interferon tau analysis of its temporal and cellular distribution during early pregnancy. **J Reprod Fertil** 112: 149-156, 1998.

GUZELOGLU A.; MICHEL F.; THATCHER W.W. Differential effects of interferon- τ on the prostaglandin synthetic pathway in bovine endometrial cells treated with phorbol ester. **J Dairy Sci** 87: 2032-2041, 2004.

GUZELOGLU A.; SUBRAMANIAM P.; MICHEL F.; THATCHER W.W. Interferon- τ induces degradation of prostaglandin H synthase-2 messenger RNA in bovine endometrial cells through a transcription-dependent mechanism. **Biol Reprod** 71: 170-176, 2004a.

GUZELOGLU A.; BINELLI M.; BADINGA L.; HANSEN T.R.; THATCHER W.W. Inhibition of phorbol ester-induced PGF_{2 α} by IFN- τ is not through regulation of protein kinase C. **Prost Other Lipid Mediat** 74: 87-99, 2004b.

HAFEZ, E.S.E. **Anatomia do aparelho reprodutor feminino**. In, Hafez, E. S. E.(Ed) Reprodução Animal. 7th edição. 2004. Ed. Manole. São Paulo.

HANSEL H.; CONCANNON P. W.; LUKASZEWSKA J. H. Corpora lutea of large domestic animals. **Biol Reprod** 8: 222, 1973.

HARDA H.; FUJITA T.; MYIAMOTO M.; KIMURA Y.; MARUYAMA M.; FURIA A.; MIYATA T.; TANIGUCHI T. Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1

and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. **Cell** 58: 729-739, 1989.

HAUPTMANN R.; SWETLY P. A novel class of human type I interferons. **Nucleic Acids Res** 13: 4739, 1985.

HELLIWELL R.J.A.; BERRY E.B.E.; O'CARROLL S.J.; MITCHELL M.D. Nuclear prostaglandin receptors: role in pregnancy and parturition. **Prost Leuko Ess Fatty Acids** 70: 149-165, 2004.

HELMER S.D.; HANSEN P.J.; ANTHONY R.V.; THATCHER W.W.; BAZER F.W.; ROBERTS R.M. Identification of bovine trophoblast protein-1, a secretory protein immunologically related to ovine trophoblast protein-1. **J Reprod Fertil** 79(1): 83-91, 1987.

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

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

HERNANDEZ-LEDEZMA J.J.; VILLANUEVA C.; SIKES J.D.; ROBERTS R.M. Effects of CZB versus medium 199 and of conditioning culture media with either bovine oviductal epithelial cells or buffalo rat liver cells on the development of bovine zygotes derived by in vitro maturation-in vitro fertilization procedures. **Therio** 39: 1267-1277, 1993.

HICKS B.A.; ETTER S.J.; CARNAHAN K.G.; JOYCE M.M.; ASSIRI A.A.; CARLING S.J.; KODALI K.; JOHNSON G.A.; HANSEN T.R.; MIRANDO M.A.; WOODS G.L.; VANDERWALL D.K.; OTT T.L. Expression of the uterine Mx protein in cyclic and pregnant cows, gilts, and mares. **J Anim Sci** 81: 1552-1561, 2003.

HIXON J.; FLINT A.P.F. Effects of luteolytic dose of oestradiol benzoate on uterine oxytocin receptor concentrations, phosphoinositide turnover and prostaglandin F_{2α} secretion in sheep. **J Reprod Fertil** 79: 475-467, 1987.

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

HORTON E.W.; POYSER N.L. Uterine luteolytic hormone: a physiological role of prostaglandin F_{2α}. **Physiol Rev** 56: 595-651, 1976.

HUGHES T.L.; VILLA-GODOY A.; KESNER J.S.; FOGWELL R.L. Destruction of bovine ovarian follicles: effects on the pulsatile release of luteinizing hormone and prostaglandin F_{2α}-induced luteal regression. **Biol Reprod** 36: 523-529, 1987.

HUMBLLOT P. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. **Therio** 56 (9): 1413-1433, 2001.

IMAKAWA K.; ANTHONY R.V.; KAZEMI M.; MAROTTI K.R.; POLITES H.G.; ROBERTS R.M. Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophoderm. **Nature** 330: 377-379; 1987.

JENNER L.J.; PARKINSON T.J.; LAMMING G.E. Uterine oxytocin receptors in cyclic and pregnant cows. **J Reprod Fert** 91: 49-58, 1991.

JOHNSON G.A.; AUSTIN K.J.; VAN KIRK E.A.; HANSEN T.R. Pregnancy and interferon-tau induced conjugation of bovine ubiquitin cross reactive protein to cytosolic uterine proteins. **Biol Reprod** 58: 898-904, 1998.

JUENGEL J.L.; MEBERG B.M.; TURZILLO A.M. Hormonal regulation of mRNA encoding steroidogenic acute regulatory protein in ovine corpora lutea. **Endocrinology** 136: 5423-29, 1995.

JUENGEL J.L.; NETT T. M.; TANDESKI T.M. Effect of luteinizing hormone and growth hormone on luteal development in hypophysectomized ewes. **Endocrine** 3: 323-326, 1995.

KALUZ S.; FISHER P.A.; KALUZOVA M.; SHELDRIK E.L.; FLINT A.P.F. Structure of an ovine interferon receptor and its expression in endometrium. **J Mol Endoc** 17: 207-215, 1996.

KANAI N.; LU R.; SATRIANO J.A.; BAO Y.; WOLKOFF A.W.; SCHUSTER V. L. Identification and characterization of a prostaglandin transporter. **Science** 268: 866-869, 1995.

KARSH F.J.; NOVEROSKE J.W.; ROCHE J.F; NORTON H.W.; NALBANDOV A.V. Maintenance of ovarian corpora lutea in absence of ovarian follicles. **Endocrinology** 87: 1228, 1970.

KERBLER T.L.; BUHR M.M.; JORDAN L.T.; LESLIE K.E.; WALTON J.S. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by conceptus in cattle. **Therio** 47: 703-714, 1997.

KIM J.J; FORTIER M.A. A cell type specificity and protein kinase C dependency on the stimulation of prostaglandin E₂ and prostaglandin F_{2α} production by oxytocin and platelet-activating factor in bovine endometrial cells. **J Reprod Fertil** 103: 239-247, 1995.

KIMMINS S.; MACLAREN L.A. Oestrous cycle and pregnancy effects on the distribution of estrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. **Placenta** 22: 742-748, 2001.

KINDAHL H.J.; LINDELL J.O.; EDQVIST L.E. Release of prostaglandin F_{2α} during the oestrous cycle. **Acta Vet Scand** 77: 143-158, 1981.

KLEIN C.; BAUERSACHS S.; ULBRICH S.E.; EINSPANIER R.; MEYER H.H.; SCHMIDT S.E.; REICHENBACH H.D.; VERMEHREN M.; SINOWATZ F.; BLUM H.; WOLF E. Monozygotic twin model reveals novel embryo-induced transcriptome changes of bovine endometrium in the preattachment period. **Biol Reprod** 74: 253–264, 2006.

KNICKERBOCKER J.J.; THATCHER W.W.; BAZER F.W.; DROST M.; BARRON D.H.; FINCHER K.B.; ROBERTS R.M. Proteins secreted by day-16 to -18 conceptuses extend corpus luteum function in cows. **J Reprod Fertil** 77: 381-391, 1986.

KOSS R.D.; HANSEL W. The large small cell of the bovine corpus luteum, ultrastructural and functional differences. In, **Dynamics of Ovarian Function**, edited by N. B. Schwartz and M. Hunzicker-Dunn. New York, Raven, p.197-203, 1981.

KUBISCH H.M.; LARSON M.A.; ROBERTS R.M. Relationship between age of blastocyst formation and interferon-tau secretion by in vitro-derived bovine embryos. **Mol Reprod Dev** 49: 254-260, 1998.

KUBISCH H.M.; LARSON M.A.; EALY A.D.; MURPHY C.N.; ROBERTS R.M. Genetic and environment determinants of interferon- τ secretion by in vivo- and in vitro-derived bovine blastocysts. **Anim Reprod Sci** 66: 1-13, 2001.

LAFLEUR D.W.; NARDELLI B.; TSAREVA T.; MATHER D.; FENG P.; SEMENUK M.; TAYLOR K.; BUERGIN M.; CHINCHILLA D.; ROSCHKE V.; CHEN G.; RUBEN S.M.; COLEMAN T.A.; MOORE P.A. Interferon-kappa, a novel type I interferon expressed in human keratinocytes. **J Biol Chem** 276: 39765, 2001.

LAFRANCE M.; GOFF A. K. Effects of progesterone and oestradiol-17 β on oxytocin-induced release of prostaglandin F $_{2\alpha}$. **J Reprod Fertil** 82: 429-436, 1988.

LAFRANCE M.; GOFF A. K. Control of bovine uterine prostaglandin F $_{2\alpha}$ release *in vitro*. **Biol Reprod** 42: 188-193, 1990.

LAMMING G.E.; WHATES D.C.; FLINT A.P.F.; PAYNE J.H.; STEVENSON K.R.; VALLET J.L. Local actions of trophoblast interferons in suppression of the development of oxytocin and oestradiol receptors in ovine endometrium. **J Reprod Fertil** 105: 165-175, 1995.

LAMOTHE-ZAVALA, C.; FREDRIKSSON, G.; KINDHAL, H. Reproductive performance of zebu cattle in Mexico. 1. Sexual behaviour and seasonal influence on estrous cyclicity. **Therio** 36 (6): 887-96; 1991.

LARSON M.A.; KIMURA K.; KUBISCH H.M.; ROBERTS R.M. Sexual dimorphism among bovine embryos in their ability to make the transition to expanded blastocyst and in the expression of the signaling molecule IFN- τ . **Develop Bio** 98: 9677-9682, 2001.

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

LEISER R.; KAUFMANN P. Placental structure: in a comparative aspect. **Exper Clin Endoc** 245 (4913): 57-60, 1994.

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

L'HARIDON R.; HUYNH L.; ASSAL N.E.; MARTAL J. A single intrauterine infusion of sustained recombinant ovine interferon-tau extends corpus luteum lifespan in cyclic ewes. **Therio** 43: 1031-1045, 1995.

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

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

LOEB L. The effect of extirpation of the uterus on the life and function of corpus luteum in the guinea pig. **Proc Soc Exp Biol Med** 20: 441-443, 1923.

LOEB L. Effects of hysterectomy on system of sex organs and on periodicity of sexual cycle in guinea pigs. **Am J Physiol** 83: 202-224, 1927.

LOEWEN K.G.; DERBYSHIRE J.B. Interferon induction with polyinosinic: polycytidylic acid in the newborn piglet. **Canadian J Vet Res** 50: 232-237, 1986.

LU R.; KANAI N.; BAO Y.; SCHUSTER V.L. Cloning *in vitro* expression, and tissue distribution of a human prostaglandin transporter cDNA (hPGT). **J Clin Invest** 98: 1142-1149, 1996.

MALPHIGI M. **De Structura Glandarum Conglobatarum**. London: Apud Richardum Chiswell, 1689.

MAMLUK, R.; CHEN, D.; GREBER, Y.; DAVIS, J.S.; MEIDAN, R. Characterization of messenger ribonucleic acid expression of prostaglandin F2 α and luteinizing hormone receptors in various bovine luteal cell types. **Biol Reprod** 58 (3): 849-56, 1998.

MARTAL J.; LACROIX M.C.; LOUDES C.; SAUNIER M.; WINTENBERGER-TORRES S. Trophoblastin, an anti-luteolytic protein present in early pregnancy in sheep. **J Reprod Fertil** 56: 63-73, 1979.

MARTAL J.; DEGRYSE E.; CHARPIGNY G.; ASSAL N.; REINAULD P.; CHARLIER M.; GAYE P.; LECOCQ J.P. Evidence for extended maintenance of the corpus luteum by uterine infusion of a recombinant trophoblast α -interferon (trophoblastin) in sheep. **J Endo** 127: R5-R8, 1990.

MASLAR I.A.; POWERS-CRADDOCK P.; ANSBACHER R. Decidual prolactin production by organ cultures of human endometrium, effects of continuous and intermittent progesterone treatment. **Biol Reprod** 34 (4): 741-50, 1986.

MAWHINNEY S.; ROCHE J.F. **Factors involved in oestrus cycle control in the bovine.** In Control of Reproduction in the cow, pp 511-530. ED. J. M. Sreenan, EEC, Luxembourg, 1978.

MCCRACKEN J.A.; SCHRAMM W.; OKULICZ W.C. Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF_{2 α} from the ovine uterus during the luteolysis and its abrogation in early pregnancy. **Anim Reprod Sci** 7: 31-55, 1984.

MCCRACKEN, J. A.; CUSTER, E. E; LAMSA, J. C. Luteolysis: a neuroendocrine mediated event. **Physiolog Rev** 79(2): 263-323, 1999.

MEAGER A. Biological assays for interferons. **J Immunol Methods** 261: 21-36, 2002.

MEYER M.D.; HANSEN P.J.; THATCHER W.W.; DROST M.; BADINGA L. Extension of corpus luteum lifespan and reduction of uterine secretion of prostaglandin F_{2 α} of cows in response to recombinant interferon- τ . **J Dairy Sci** 78: 1921-1931, 1995.

MIYAMOTO Y.; SKARZINSKY D. J.; OKUDA K. Is tumor necrosis factor α trigger for the initiation of endometrial prostaglandin F_{2 α} release at luteolysis in cattle? **Bio Reprod** 62: 1109-1115, 2000.

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

MORGAN G.L.; GEISERT R.D.; McCANN J.P.; BAZER F.W.; OTT T.L.; MIRANDO M.A.; STEWART M. Failure of luteolysis and extension of the interoestrous interval in sheep treated with the progesterone antagonist mifepristone (RU 486). **J Reprod Fertil** 98: 451-457, 1993.

MOOR R.M.; ROWNSON L.E.A. Influence of the embryo and uterus on luteal function in the sheep. **Nature** 210: 522-523, 1964.

MOOR R.M.; ROWNSON L.E.A. The corpus luteum of the sheep: functional relationship between the embryo and the corpus luteum. **J Endocrin** 34: 233-239, 1966.

MURAKAMI S.; MIYAMOTO Y.; SKARZYNSKI D.J.; OKUDA K. Effects of tumor necrosis factor α on secretion of prostaglandin E₂ and F_{2 α} in bovine endometrium throughout the estrous cycle. **Therio** 55: 1667-1678, 2001.

NAGAYA H.; KANAYA T.Y.; KAKI H.; TOBITA Y.; TAKAHASHI H. TAKAHASHI M.; HIRAKO M.; YOKOMIZO Y., INUMARU S. Establishment of a large-scale purification procedure for purified recombinant bovine interferon-tau produced by a silkworm-baculovirus gene expression system. **J Vet Med Sci.** 66(11):1395-401, 2004.

NAGATA S.; MANTEI N.; WEISSMANN C. The structure of one of the eight or more distinct chromosomal genes for human interferon- α . **Nature** 287: 401, 1980.

NARDELLI B.; LAFLEUR D.W.; CHINCHILLA D.; TSAREVA T.; GUOXIAN C.; MATHER D.; SHAH D.; GIRI J.; RUBEN S.M.; COLEMAN T.A.; MOORE P.A. IFN- κ , a novel type I interferon. **Eur Cytokine Network** 11: 39, 2000.

NARUMYIA S.; FITZGERALD G.A. Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. **J Clin Invest** 108: 25-30, 2001.

NELSON D.L.; COX M.M. **Princípios de Bioquímica**. Rio de Janeiro. Sarvier. 2002 3.ed. 975 p.

NISWENDER G.D.; JUENGEL J.L.; SILVA P.J. Mechanism controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiol Rev** 80:1-29, 2000.

NISWENDER G.D. Molecular control of luteal secretion of progesterone. **Reproduction** 123 (3): 333-339, 2002.

NOMURA T.; LU R.; PUCCI M.L.; SCHUSTER V.L. The two-step model of prostaglandin signal termination: in vitro reconstitution with the prostaglandin transporter and prostaglandin 15 dehydrogenase. **Mol Pharmacol** 65: 973-978, 2004.

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

OKUDA K.; MIYAMOTO Y.; SKARZYNSKI D.J. Regulation of endometrial prostaglandin F_{2 α} synthesis during luteolysis and early pregnancy in cattle. **Dom Anim Endoc** 23: 255-264, 2002.

OTT T.L.; VAN HEEKE G.; HOSTETLER C.E.; SCHALUE T.K.; OLMSTED J.J.; JOHNSON H.M.; BAZER F.W. Intrauterine injection of recombinant ovine interferon-tau extends the interestrous interval in sheep. **Therio** 40: 757-769, 1993.

PACE-ASCIAC C.R. Developmental aspects of the prostaglandin biosynthetic and catabolic systems. **Semin Perinatol** 4: 15-21, 1980.

PARENT J.; VILLENEUVE C.; ALEXENKO A.P.; EALY A.D.; FORTIER M.A. Influence of different isoforms of recombinant trophoblastic interferons on prostaglandin production in cultured bovine endometrial cells. **Biol Reprod** 68: 1035-1043, 2003.

PARENT M.; MADORE E.; MACLAREN L.A.; FORTIER M.A. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase in the bovine endometrium during the oestrus cycle and early pregnancy. **Reproduction** 131: 573-582, 2006.

PERKS C.M.; PETERS A.R.; WATHES D.C. Follicular and luteal expression of insulin-like growth factors I and II and the type I IGF receptor in the bovine ovary. **J Reprod Fertil** 116: 157-165, 1999.

PIPER P.J.; VANE J.R.; WILLIE J.H. Inactivation of prostaglandins by the lungs. **Nature** 91: 600-604, 1970.

PRU J.K.; AUSTIN K.J.; HAAS A.L.; HANSEN T.R. Pregnancy and interferon-tau upregulate gene expression of members of the 1-8 family in the bovine uterus. **Biol. Reprod** 65: 1471-1480, 2001a.

PRU J.K.; RUEDA B.R.; AUSTIN K.J.; THATCHER W.W.; GUZELOGLU A.; HANSEN T.R. Interferon-tau suppresses prostaglandin $F_{2\alpha}$ secretion independently of the mitogen-activated protein kinase and nuclear factor $\kappa\beta$ pathways. **Biol Reprod** 64: 965-973, 2001b.

PUCCI M.L.; BAO Y.; CHAN B. Cloning of mouse prostaglandin transporter PGT cDNA species-specific substrate affinities. **Am J Physiol** 277: R734-R741, 1999.

REDMER D.A.; REYNOLDS L.P. Angiogenesis in the ovary. **Rev Reprod** 1(3): 182-92, 1996.

REID L.E.; BRASNETT A.H.; GILBERT C.S.; PORTER A.C.G.; GEWERT D.R.; STARK G.R.; KERR I.M. A single DNA response element can confer inducibility by both α - and γ -interferons. **Proc Natl Acad Sci** 84: 840-844, 1989.

ROBERTS R.M.; CROSS J.C.; LEAMAN D.W. Interferons as hormones of pregnancy. **Endocr Rev** 13: 432-452, 1992.

ROBERTS R.M.; LIU L.; ALEXENKO A. New and atypical families of type I interferons in mammals : comparative functions, structures, and evolutionary relationships. **Prog Nucl Acids Res Mol Biol** 56: 287-325, 1997.

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

ROBINSON R.S.; MANN G.E.; LAMMING G.E.; WHATES D.C. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. **Reprod** 122: 965-979, 2001.

ROBINSON R.S.; FRAY M.D.; WHATES D.C.; LAMMING G.E.; MANN G.E. In vivo expression of interferon-tau mRNA by the embryonic trophoblast and uterine concentrations of interferon-tau protein during early pregnancy in the cow. **Mol Reprod Devel** 73: 470-474, 2006.

ROCHE J.F.; PRENDERVILLE D.J.; DAVIS W.D. Calving rate following fixed-time insemination after a 12-day progesterone treatment in dairy cows, beef cows and heifers. **Vet Rec** 101: 417-418; 1977.

RODRIGUEZ-SALABERRY C.; CALDARI-TORRES C.; GREEN E.S.; BADINGA L. Conjugated linoleic acid reduces phorbol ester-induced prostaglandin F_{2α} production by bovine endometrial cells. **J Dairy Sci** 89: 3826-3832, 2006.

RUBINSTEIN S.; FAMILLETTI P.C.; PETSKA S. Convenient assay for interferons. **J Virology** 2: 755-758, 1981.

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. **J Reprod Fertil** 115: 15-21, 1997.

SANTOS J.E.; THATCHER W.W.; CHEBEL R.C.; CERRI R.L.; GALVÃO K.L. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. **Anim Reprod Sci** 82-83: 513-535, 2004.

SARTORI R.; GUMEN A.; GUENTHER J.N.; SOUZA A.H.; WILTBANK M.C. Comparison of artificial insemination (IA) versus embryo transfer in lactating dairy cows. **J Dairy Sci** 86 (Suppl.1), 238, 2003.

SAS. SAS/STATTM user's guide (release 6.03). Cary, NC: SAS Institute Inc; 1988.

SCARAMUZZI R.J.; BAIRD D.T. The oestrous cycle of the ewe after active immunization against prostaglandin F_{2α}. **J Reprod Fertil** 46: 39-47, 1976.

SCHÄFER-SOMI S. Cytokines during early pregnancy of mammals: a review. **Anim Reprod Sci** 75: 73-94, 2003.

SCHAMS D.; AMSELGRUBER W.; EINSPANIER R.; SINOWATZ F.; GOSPODAROWICZ D. Localization and tissue concentration of basic fibroblast growth factor in the bovine corpus luteum. **Endocrine** 2: 907-912, 1994.

SCHAMS D.; BERISHA B. Angiogenic factors (VEGF, FGF and IGF) in the bovine corpus luteum. **J Reprod Dev** 48: 233-242, 2002.

SCHAMS D.; BERISHA B. Regulation of corpus luteum function in cattle- an overview. **Reprod Dom Anim** 39(4): 241-251; 2004.

SCHMITT R.A.; GEISERT R.D.; ZAVY M.T.; SHORT E.C.; BLAIR R.M. Uterine cellular changes in 2',5'- oligoadenylate synthetase during the bovine estrous cycle and early pregnancy. **Biol. Reprod** 48: 460-466, 1993.

SCHUSTER V.L. Molecular mechanism of prostaglandin transport. **Annu Rev Physiol** 60: 221-242, 1998.

SCHUSTER V.L. Prostaglandin transport. **Prostagl Other Lipid Mediat** 68-69: 633-647, 2002.

SCHWARTZMAN, R.A.; CIDLOWSKI, J.A. Apoptosis, the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. **Endoc Rev.** 14: 133-51, 1993.

SEN G.C; LENGYEL P. The interferon system: a bird's eye view of the biochemistry. **J Biol Chem** 267: 5017, 1992.

SHEMESH M.; FREIDMAN S.; GUREVICH M.; STRAM Y.; FIELDS M.; SHORE L.S. Luteinizing hormone receptors and its mRNA in the bovine endometrium. **Physiol Pharmacolog** 47 (Suppl. 1), p. 15-27, 1996a.

SHEMESH M.; GUREVICH M.; SHORE L.S.; DAVIDSON I.; FREIDMAN S.; DOMBROVSKI L. Regulation of cicloxygenase and products of the cicloxygenase pathway in the bovine uterus. **Reprod Dom Anim** 31: 431-436, 1996b.

SILVIA W. J.; LEWIS G. S.; McCRACKEN J. A.; THATCHER W. W.; WILSON Jr. L. Hormonal regulation of uterine secretion of PGF 2α durin luteolysis in ruminants. **Biol Reprod** 45: 655-663, 1991.

SINHA A.E.; PRAZEN B.J.; FRAGA C.G.; SYNOVEC R.E. Valve-based comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection: instrumentation and figures-of-merit. **J Chromatogr A.** 1019(1-2):79-87, 2003.

SIROIS J.; FORTUNE J. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle monitored by real time ultasonography. **Biol Reprod** 39: 308-317, 1988.

SKARZINSKY D. J.; OKUDA K. Sensitivity of bovine corpora lutea to prostaglandin F 2α is dependent on progesterone, oxytocin, and prostaglandins. **Biol Reprod** 60: 1292-1298, 1999.

SKARZINSKY D. J.; UENOYAMA Y.; KOTWICA J.; OKUDA K. Noradrenaline stimulates the production of prostaglandin F 2α in cultured bovine endometrial cells. **Bio Reprod** 60: 277-282, 1999.

SKARZINSKY D. J.; MIYAMOTO Y.; OKUDA K. Production of prostaglandin F 2α by cultured bovine endometrial cells in response to tumor necrosis factor α : a cell type specificity and intracellular mechanisms. **Biol Reprod** 62: 1116-1120, 2000.

SLOTTA K.H.; RUSCHIG H.; FELS E. Reindarstellung der hormone aus dem corpus luteum. **Berich Dtsch Chem Gesellschaft** 67; 1270, 1934.

SMITH W.L.; MARNETT L.J.; DE WITT D.L. Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. **Pharmacol Ther** 49: 153-179, 1991.

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

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

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

SPENCER T.E.; BAZER F.W. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. **Reprod Biol Endocr** 2: 49, 2004.

SPENCER T.E.; JOHNSON G.A.; BAZER F.W.; BURGHARDT R.C. Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reproduction* 128: 657-668, 2004.

SREENAN, J.M; MULVEHILL, P. The application of long and short-term progestagen treatments for oestrus cycle control in heifers. **J Reprod Fertil** 45 : 867-869 ; 1975.

STAGGS K.L.; AUSTIN K.J.; JOHNSON G.A.; TEIXEIRA M.G.; TALBOTT C.T.; DOOSLEY V.A.; HANSEN T.R. Complex induction of bovine uterine proteins by interferon-tau. **Biol Reprod** 59: 293-297, 1998.

STARK G.R.; KERR I.M.; WILLIAMS B.R.; SILVERMAN R.H.; SCHREIBER R.D. How cells respond to interferons. **Annu Rev Biochem** 67: 227, 1998.

STEVENSON K.R.; RILEY P.R.; STEWART H.J.; FLINT A.P.; WHATES D.C. Localization of oxytocin receptor mRNA in the ovine uterus during the oestrous cycle and early pregnancy. **J Mol Endocrinol** 12: 93-105, 1994.

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

STEWART M.D.; JOHNSON G.A.; BAZER F.W.; SPENCER T.E. Interferon-tau (IFN- τ) regulation on IFN-stimulated gene expression in cell lines lacking specific IFN-signaling components. **Endocrinology** 142: 1786-1794, 2001.

STOJKOVIC M.; BUTTNER M.; ZAKHARTCHENKO V.; RIEDL J.; REICHENBACH H.-D; WENIGERKIND H.; BREM G.; WOLF E. Secretion of interferon-tau by bovine embryos in long-term culture; comparison of in vivo derived, in vitro produced, nuclear transfer and demi-embryos. **Anim Reprod Sci** 55: 151-162, 1999.

STRINDEN S.T.; SHAPIRO S.S. Progesterone-altered secretory proteins from cultured human endometrium. **Endocrinology** 112(3): 862-870; 1983.

SUH D.Y.; HUNT T.K.; SPENCER E.M. Insulin-like growth factor-I reverses the impairment of wound healing induced by corticosteroids in rats. **Endocrinology** 131(5): 2399-403, 1992.

TANIGUCHI T.; MANTEI N.; SCHWARZSTEIN M.; NAGATA S.; MURAMATSU M.; WIESSMANN C. Human leukocyte and fibroblast interferons are structurally related. **Nature** 285: 547, 1980.

- TAKAHASHI H. TAKAHASHI M.; NAGAYA H.; HIRAKO M.; SAWAI K.; MINAMIHASHI A.; INUMARU S.; YOKOMIZO Y.; GESHI M.; OKANO A.; OKUDA K. Establishment of a specific radioimmunoassay for bovine interferon tau. **Therio**. 63(4):1050-60, 2004.
- THATCHER W. W.; TERQUI M.; THIMONIER J.; MAULEON P. Effects of estradiol-17 β on peripheral plasma concentration of 15-keto-13, 14-dihydro PGF $_{2\alpha}$ and luteolysis in cyclic cattle. **Prostaglandins** 3 (4): 745-756, 1986.
- THATCHER W.W.; BINELLI M.; BURKE J.; STAPLES C.; AMBROSE J.D.; COELHO S. Antiluteolytic signals between the conceptus and endometrium. **Therio** 47: 131-140, 1997.
- THORBURN G.D.; COX R.I.; CURRIE W.B. Prostaglandin F and progesterone concentrations in the utero-ovarian venous plasma of the ewe during the oestrous cycle and early pregnancy. **J Reprod Fertil** (Suppl) 18:151-8, 1973.
- TSUBOI K. SUGIMOTO Y. ICHIKAWA A. Prostanoid receptor subtypes. **Prost Other Lipid Mediat** 68-69: 535-556, 2002.
- 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. **J Reprod Fertil** 90: 625-634, 1990.
- VILLA-GODOY A; IRELAND J. J.; WORTMAN J. A.; AMES N. K.; FOGWEL R. L. Luteal function in heifers following destruction of ovarian follicles. **J Anim Sci** 53 (supl 1): 372, 1981.
- WADES D.E.; LEWIS G.S. Exogenous prostaglandin F $_{2\alpha}$ stimulates utero-ovarian release of prostaglandin F $_{2\alpha}$ in sheep: a possible component of the luteolytic mechanisms of action of exogenous prostaglandin F $_{2\alpha}$. **Domest Anim Endocrinol** 13: 383-398, 1996.
- WHATES D.C.; HAMON M. Localization of oestradiol, progesterone and oxytocin receptors in the uterus during the oestrous cycle and early pregnancy of the ewe. **J Endocrinology** 138: 479-491, 1993.
- WHATES D.C.; MANN G.E.; PAYNE J.H.; RILEY P.R.; STEVENSON K.R.; LAMMING G.E. Regulation of oxytocin, oestradiol and progesterone receptor concentrations in different uterine regions by oestradiol, progesterone and oxytocin in ovariectomized ewes. **J Endocrinol** 151: 375-393, 1996.
- WINKELMANN G.L.; ROBERTS R.M.; JAMES PETERSON A.; ALEXENKO A.P.; EALY A.D. Identification of the expressed forms of ovine interferon-tau in the perimplantation conceptus: sequence relationships and comparative biological activities. **Biol Reprod** 61: 1592-1600, 1999.
- WINTERSTEINER O.; ALLEN W.M. Crystalline progestin. **J Biol Chem** 107: 321-336, 1934.

WISHART, D.F. Observations on the oestrus cycle of the Friesian heifer. **Vet Rec** 90 (21): 595-7; 1972

WISHART D.F.; YOUNG I.M.; DREW S.B. A comparison between the pregnancy rates of heifers inseminated once or twice after progestin treatment. **Vet Rec** 101:230-231, 1977.

WOAD K.J.; BAXTER G.; HOGG C.O.; BRAMLEY T.A.; WEBB R.; ARMSTRONG D.G. Expression of mRNA encoding insulin-like growth factors I and II and the type 1 IGF receptor in the bovine corpus luteum at defined stages of the oestrous cycle. **J Reprod Fertil** 120: 293–302, 2000.

WOLFENSON D.; THATCHER W.W.; DROST M.; CATON D.; FOSTER D.B.; LEBLANC M.M. Characteristics of prostaglandin F measurements in the ovarian circulation during the oestrus cycle and early pregnancy in the cow. **J Reprod Fert** 75: 491-499, 1985.

WOODING F.B. Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. **Placenta** 13: 101-113, 1992.

WOODY C.O.; FIRST N.L.; POPE A.L. Effect of exogenous progesterone on estrous cycle length. **J Anim Sci** 26: 139-141, 1967.

XIAO C.; LIU W. J. M.; SIROIS J.; GOFF A. K. Regulation of cyclooxygenase-2 and prostaglandin F synthase gene expression by steroid hormones and interferon- τ in bovine epithelial cells. **Endocrinology** 139: 2293-2299, 1998.

YANCOPOULOS G.D.; DAVIS S.; GALE N.W.; RUDGE J.S.; WIEGAND S.J.; HOLASH J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. **Nature** 407: 242–248, 2000.

ZAMBETTI G.P.; LEVINE A.J. A comparison of the biological activities of wild-type and mutant p 53. **FASEB J** 7: 855-865, 1993.

ANEXO

PROTOCOLO PARA CULTIVO DE CÉLULAS BEND

PREPARO DE MEIO DE CULTIVO

Ingredientes:

Meio Hams F-12 (N6760 - Sigma)

Meio MEM (M0643 – Sigma)

Soro fetal bovino (10270-106 - Gibco)

Soro eqüino (16051-114 – Gibco))

Solução antibiótica e antimicótica (ABAM) (A9909 - Sigma)

Insulina (I5500 – Sigma)

Preparo:

1. Colocar 1000 mL de água bidestilada num béquer de 4000 mL.
2. Adicionar 10.7 g de F-12 e 9.62 g de MEM, deixe dissolver.
3. Adicionar 400 IU de insulina
4. Adicionar 3.37 g de bicarbonato de sódio
5. Ajustar pH para 7.3
6. Adicionar água bidestilada até completar o volume de 1600 mL.
7. Filtrar 4 alíquotas de 400 mL em garrafas de 500 mL estéreis
8. Armazenar o meio a 4° C.
9. Para preparar meio com soro (para cultivo) adicionar 50 mL de FBS, 50 mL of de soro equino e 5 mL de ABAM para cada garrafa de 400 mL de meio. O meio de cultivo completo pode ser armazenado a 4° C por duas semanas. O meio deverá ser aquecido por no mínimo 2 horas antes de ser utilizado.

DESCONGELAMENTO DAS CELULAS

1. Remover a ampola do botijão de L N₂ colocá-la em banho-maria a 37°C.
2. Inverter a amostra a cada 30s e colocá-la de volta no banho-maria até que ela seja descongelada.
3. Despejar o conteúdo do criovial em frascos de cultivo T25 (frasco de cultivo pequeno).
4. Adicionar 5 mL de meio de cultivo completo e acondicionar no incubador a 37° por 24 h.
5. Remover o meio antigo e adicionar 5 mL de meio fresco.
6. Recolocar o frasco no incubador até as células atingirem confluência
7. Quando as células alcançarem confluência de 90 %, elas estarão prontas para serem tripsinizadas.

TRIPSINIZAÇÃO

1. Remover o meio antigo
2. Para frascos T175 adicionar 10mL de tripsina; para frascos T25 adicionar 2 mL de tripsina.
3. Recolocar o frasco no incubador a 37° por 10 minutos e bater levemente no fundo do frasco para desalojar as células.
4. Se as células não estiverem completamente descoladas, adicionar mais tripsina (volume igual ao depositado primeiramente) e repetir o passo 3.
5. Quando as células estiverem desalojadas, adicionar meio de cultivo completo em volume igual ou superior ao de tripsina usada para parar a tripsinização.

6. Despejar o conteúdo do frasco num tubo de 15mL e retirar uma alíquota de 20uL para a contagem das células em câmara de Newbawer, e centrifugar o restante da suspensão por 10 min a 1000 RPM.
7. Remover o meio antigo com cuidado para não tocar no pellet.
8. Ressuspender o pellet em meio de cultivo completo (com soro) de modo a perfazer 10^6 células por mL.
9. Transferir 2mL células/meio para frasco T175 .
10. Adicionar 50 mL de meio cultivo com soro para frascos T175.
11. Acondicionar a 37°C até a confluência.

CONGELAMENTO

1. Proceder com a tripsinização até o passo 8.
2. Após a centrifugação, suspender as células em FBS na concentração de 2 milhões de células por mL de soro.
4. Pingar vagorosamente nesta suspensão, uma solução de DMSO 20% (v/v) em FBS em mesmo volume da suspensão de células.
5. Alojara células em criotubos de 2mL. Tomar nota da data, nome e número de passagem.
6. Manter a -15°C por 2 horas.
7. Manter a -70°C por 24h.
8. Armazenar as células em LN_2 .
9. Anotar o local de armazenamento, o número de passagem, data, nome da pessoa que congelou as células no banco de células.
10. Descongelar e testar 1 amostra por congelamento num teste de viabilidade.