RENATA DOS SANTOS SILVA

Papel da insulina sobre a esteroidogênese no corpo lúteo canino

RENATA DOS SANTOS SILVA

Papel da insulina sobre a esteroidogênese no corpo lúteo canino

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 a obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa

De acordo:

Orientador

São Paulo 2017

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

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3449
FMVZ
Silva, Renata dos Santos
Papel da insulina sobre a esteroidogênese no corpo lúteo canino. / Renata dos Santos Silva. -- 2017.
98 f.: il.

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

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa.

1. Insulina. 2. Corpo lúteo. 3. RNA-Seq. 4. Esteroidogênese. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO





FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Papel da insulina sobre a esteroidogênese e o transporte de glicose no corpo lúteo canino", protocolado sob o nº 2922/2013, utilizando 16 (dezesseis) cães, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 13/3/2013.

We certify that the Research "Insulin role on steroidogenesis and glucose trasnport in canine corpus luteum", protocol number 2922/2013, utilizing 16 (sixteen) dogs, under the responsibility Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 3/13/2013.

São Paulo, 18 de março de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SILVA, Renata dos Santos	
Título: Papel da insulina sobre a es	teroidogênese no corpo lúteo canino
	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 titulo de Doutor em Ciências
Data:/	
]	Banca Examinadora
Prof(a). Dr(a)	
	Julgamento:
Prof(a). Dr(a)	
	Julgamento:
Prof(a). Dr(a)	
	Julgamento:
Prof(a). Dr(a)	
Instituição:	Julgamento:
Prof(a). Dr(a)	
	Julgamento:

Dedicatória

À minha irmã **Adriana dos Santos Silva**, que sempre esteve ao meu lado em todas as etapas desta trajetória, me incentivando e apoiando em todos os momentos da minha vida. Obrigada pelo exemplo de honestidade, paciência, carinho e amor incondicional. Sem você nada disso teria sido possível. Palavras são pouco para agradecer. Amo você. Obrigada por tudo!

À minha sobrinha **Karina Silva Cordeiro**, que sempre incentivou e me apoiou em todos os momentos deste processo.

Aos meus pais **Ariomar Pereira da Silva** (*in memorian*) e **Maria Aparecida dos Santos Silva** (*in memorian*), por todo amor e dedicação que tiveram ao longo de nossa curta jornada juntos.

Agradecimentos

À minha orientadora, **Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa** pelos ensinamentos, conhecimentos, orientação e confiança a mim dispensado. Obrigada por todos esses anos de aprendizado, desde o início do mestrado, apenas acreditando que esta experiência daria certo; tornando assim possível esta jornada e proporcionando mais uma vez grande enriquecimento profissional e pessoal.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, por proporcionar infraestrutura de qualidade para um desenvolvimento científico e profissional adequado.

Aos professores, **Dra. Maria Angélica Miglino**, **Dr. José Roberto Kfoury Jr**, **Dr. Francisco Javier Hernandez-Blazquez**, por terem disponibilizado seus laboratórios imprescindíveis para a execução dos experimentos.

Ao professor **Dr Suraj Unniappan**, por sua recepção, atenção, compreensão e aprendizado durante meu estágio em seu laboratório na Universidade de Saskatchewan. Foi uma experiência profissional e pessoal que realmente levarei por toda à vida. Obrigada por esta oportunidade sem igual. Agradeço ainda sua equipe, em especial à **Sima Mortazavi** e **Azadeh Hatef** que me deram todo suporte necessário e estavam sempre dispostas a me ajudar com muita paciência e dedicação.

Ao **Dr Bruno Moura Monteiro**, pelas grandes contribuições na confecção da tese, com dicas e modificações importantes para o trabalho.

Aos colegas de laboratório, Antenor Bonfim, Valdir Pavanelo Jr., Nathia Rigoglio, Giuliano Gustavo Lesnau, Ana Paula Miskulin, Vanessa Uemura da Fonseca, Luciana Alves de Fátima, Liza Margareth Sousa, Gabriela Mendes, Taís Rebouças, Arnaldo Maruyama, Franscislene Garcia pela ajuda em vários momentos desta jornada, vocês fizeram e fazem parte desta conquista direta ou indiretamente. Obrigada pela companhia, pela paciência, pelos momentos agradáveis de convivência e amizade.

À **Sonia Elisabete Will**, pela indicação e estímulo para integrar a pós-graduação no setor de Anatomia e pela amizade.

A nossa querida secretária do Setor de Anatomia, **Jaqueline Santana**, pela simpatia, auxílio e acima de tudo muito paciência durante todo este período.

Aos técnicos, Ronaldo Agostinho, Edinaldo Farias (Índio), André Franciolli e Diogo Palermo, pela disponibilidade durante a realização dos experimentos, me auxiliando quando necessário.

Aos meus queridos professores de Graduação do Centro Universitário FIEO, pelos ensinamentos e momentos importantes para o início de minha formação Universitária. Em especial à professora **Dra**. **Marisa Vianna Ferraz** que mesmo distante, sempre torce e comemora cada nova conquista de seus sempre alunos; e a profa **Miriam Mitsue Hayashi** que me incentivou e orientou meus primeiros passos na pesquisa científica.

Aos amigos do **Instituto Butantan** que fizeram parte desta história, obrigada pela amizade, paciência, dicas e conselhos durante todo este tempo.

À **Dra. Ivana Carvalho** e sua grande equipe por permitir nossa entrada em seus mutirões de castração, e a todos os proprietários das cadelas que disponibilizaram o material para nossos experimentos.

Aos amigos e colegas de pós-graduação, com os quais compartilhei novas experiências e conhecimentos. Obrigada por cada conversa, cada auxílio, cada troca de experiência adquirida durante este tempo. Em especial agradeço a Pedro Bianchi, Aline Poscai, Amílton César dos Santos, Daniela Moraes de Oliveira e Túlio Yoshinaga por este tempo de convivência, por cada conversa, desabafo e experiências trocadas.

As minhas queridas amigas (Luluzinhas) Natalia Tieppo, Deborah Benetti, Ana Magalhães, Letícia Nogueira, Juliane Afonso e Vanessa Magalhães, que mesmo distantes foram de grande incentivo em todas as etapas deste processo, sempre vibrando e torcendo de maneira única a cada novo momento.

Ao Multiusuário de Bioinformática da Embrapa em Campinas, em especial ao Felipe

Rodrigues da Silva, pelas análises dos dados de RNA-Seq realizada durante este trabalho.

Á FAPESP (processo 2014/00739-9) pelo financiamento deste projeto, ao CNPq

(141353/2013-9) pela bolsa concedida durante este período e a CAPES (6773-15-0) pelo

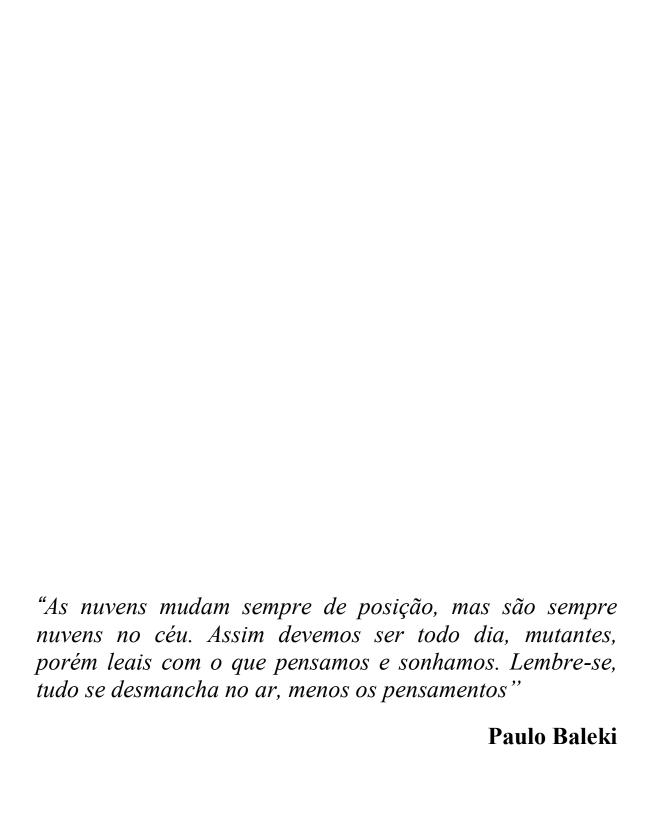
financiamento de meu período no exterior através do Programa de Doutorado Sanduíche no

Exterior (PDSE).

A todos que participaram direta ou indiretamente na realização desse trabalho, mesmo não

citados aqui saibam que tenho eterna gratidão por tudo.

A todos vocês, muito obrigada!



RESUMO

SILVA, R. S. **Papel da insulina sobre a esteroidogênese no corpo lúteo canino.** [Insulin role on steroidogenesis in canine corpus luteum]. 2017. 98 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O corpo lúteo (CL) canino apresenta períodos regulares de formação, atividade e regressão, marcados por intensa remodelação tecidual, o que depende diretamente de aporte energético, em alguns casos mediado pela insulina. Além de seu papel metabólico, a insulina, através de diferentes genes, pode desempenhar um papel fundamental na regulação da esteroidogênese, e consequentemente nas funções do CL de cadelas cíclicas. Nosso objetivo na primeira parte experimental foi mapear os genes diferencialmente expressos no CL, em diferentes estágios do diestro, diretamente relacionados à sinalização insulínica e a esteroidogênese no CL canino, caracterizando sua expressão gênica e proteica. A via secundária de captação de glicose também decorrente da sinalização insulínica foi abordada. Cadelas não gestantes foram submetidas à ovariosalpingohisterectomia a cada 10 dias entre os dias 10 e 60 (n=5/grupo) após a ovulação. Os CL coletados foram utilizados para sequenciamento de RNA (RNA-Seq) e validação por PCR em tempo real, e proteica por Western blotting e imunofluorescência. Na segunda parte experimental, através de cultivo celular, quantificamos a expressão dos genes relacionados à esteroidogênese após estímulo insulínico, e realizamos o bloqueio das vias phosphoinositide 3-kinase (PI3K), mitogen-activated protein kinase 14 (MAPK14) e mitogen-activated protein kinase 1(MAP2K1) para mensuração da produção de esteroides (n=4/grupo). Foram identificados sete genes diferencialmente expressos relacionados à sinalização insulínica: insulin receptor substrate (IRS1), phosphoinositide-3kinase regulatory subunit 3 (PI3KR3), phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit gamma (PI3KCG), mitogen-activated protein kinase 9 (MAPK9), mitogenactivated protein kinase 13 (MAPK13), mitogen-activated protein kinase 14 (MAPK14) e suppressor of cytokine signaling 1 (SOCSI), e dois genes, cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1 (CYP19A1) e hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta (HSD3B), identificados como envolvidos com a esteroidogênese. A via secundária de captação de glicose mostrou que adenylyl cyclase-associated protein (CAP1), CRK protooncogene, adaptor protein (CRKII) apresentaram aumento de sua expressão no período em que ocorre o aumento da produção de progesterona (P4), diferente de member of RAS oncogene family (RAP) e ras homolog family member Q (RHOQ) que apresentaram menor expressão gênica nos dias 40, coincidindo com o aumento de estradiol (E2) no diestro. Nos

experimentos em cultivo celular, sob estímulo insulínico, a expressão de *CYP19A1* não apresentou diferença quando as células eram provenientes do dia 20, diferentemente do dia 40, no qual houve aumento de expressão no grupo tratado com insulina. Em relação à expressão de *HSD3B*, houve aumento de expressão no dia 20 e 40. A produção de P4 apresentou diminuição com o bloqueio de PI3K, MAPK14 e MAP2K1, enquanto que a produção do E2 apresentou diminuição nos bloqueios com PI3K e MAPK14, e não houve diferença de produção com o bloqueio de MAP2K1. Em conjunto, estes dados sugerem que MAPK e PI3K podem modular a esteroidogênese no CL canino, provavelmente via expressão de *HSD3B* e *CYP19A1*. A ativação da via CAP-CrKII-RHOQ-RAP, não esta envolvida neste processo. Concluímos que a insulina é capaz de modular a esteroidogênese no CL canino e que a resposta hormonal ao estímulo insulínico depende do dia do diestro.

Palavras-chave: Insulina. Corpo lúteo. RNA-Seq. Esteroidogênese.

ABSTRACT

SILVA, R.S. **Insulin role on steroidogenesis in canine corpus luteum.** [Papel da insulina sobre a esteroidogênese no corpo lúteo canino]. 2017. 98 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The canine corpus luteum (CL) has regular periods of formation, activity and regression marked by intense tissue remodeling, which depends directly on energy supply in some cases mediated by insulin. In addition to its metabolic role, insulin, through different genes, may play a key role in the regulation of steroidogenesis, and consequently in the CL functions of cyclic bitches. Our objective in the first experimental part was to map the differentially expressed genes in CL, at different stages of the diestrus, directly related to insulin signaling and steroidogenesis in canine CL, characterizing their gene and protein expression. The secondary pathway of glucose uptake also resulting from insulin signaling was addressed. Non-pregnant dogs were submitted to ovariosalpingohisterectomy every 10 days between days 10 and 60 (n=5/group) post- ovulation. The collected CL was used for RNA sequencing (RNA-Seq), validation by real-time PCR and protein for Western blotting and immunofluorescence. In the second experimental part, through cell culture we identified different responses of luteal cells after insulin stimulation under the expression of differentially expressed steroidogenesis genes. We also performed phosphoinositide 3-kinase (PI3K), Mitogen-activated protein kinase 14 (MAPK14) and mitogen-activated protein kina 1 (MAP2K1) pathway blockade to measure steroids production (n = 4/group). Seven differentially expressed genes related to insulin signaling were identified: insulin receptor substrate IRS1), phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit (PI3KR3),phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit gamma (PI3KCG), mitogenactivated protein kinase 9 (MAPK9), mitogen-activated protein kinase 13 (MAPK13), mitogen-activated protein kinase 14 (MAPK14) and suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1), in addition to two genes, cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1 (CYP19A1) and hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta (HSD3B), identified as being involved with steroidogenesis. The secondary glucose uptake pathway showed that adenylyl cyclase-associated protein 1 (CAP1) and CRK Proto-Oncogene, Adaptor Protein (CRKII) increased expression in the period of increased production of progesterone (P4). different than member Of RAS Oncogene Family (RAP) and ras homolog family member Q (RHOQ) showed less gene expression on days 40 p.o., coinciding with the increase of estradiol (E2). In the cell culture experiments under insulin stimulation, the expression of CYP19A1 did not present

difference when the cells were coming from day 20, unlike day 40, in which there was increased expression in the group treated with insulin. HSD3B expression increased on days 20 and 40. The production of P4 presented a decrease with PI3K, MAPK14 and MAP2K1, while that production of E2 decreased with PI3K and MAPK14 blockade, and did not alter with MAP2K1 blockade. Together, these data suggest that MAPK and PI3K can modulate steroidogenesis in the canine CL, probably via HSD3B and CYP19A1 expression. The activation of the CAP-CrKII-RHOQ-RAP pathway is not involved in this process. We conclude that insulin is able modulate steroidogenesis in canine CL and that hormonal response to insulin stimulus depends on the day of the diestrus.

Keywords: Insulin. Corpus luteum. RNA-Seq. Steroidogenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Etapas do cultivo celular para o bloqueio de PI3K, MAP2K1 e MAPK14. (A) Células luteínicas foram mantidas em DMEM suplementado com soro fetal bovino a 10% até atingirem 90% de confluência (B) Bloqueio por 1 hora das vias PI3K, MAP2K1 e MAPK14. (C) Estímulo com insulina por 24 horas. (D) Coleta do meio de cultivo e mensuração de P4 e E2	44
Figura 2 -	Expressão gênica de IRS1 (A), MAPK9 (B), MAPK13 (C), MAPK14 (D), PI3KCG (E), PI3KR3(F), SOCS1 (G), HSD3B (H) e CYP19A1 (I) no CL canino durante o diestro (10 – 60 dias após a ovulação). Dados apresentam as médias ± desvio padrão da expressão relativa dos genes (n = 30). Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos (P < 0,05)	47
Figura 3 -	Expressão proteica dos genes diferencialmente expressos relacionados à sinalização insulínica e a esteroidogênese no CL canino. Blots ilustrativos e gráficos representam o conteúdo expresso em unidades arbitrárias (UA)/50-100 μ g de proteína em relação ao GAPDH. As barras representam a média \pm desvio padrão de n = 30. Barras com letras diferentes indicam diferença significativa (P < 0,05) entre os grupos.	48
Figura 4 -	Fotomicrografia de imunofluorescência de CL de cadelas em diferentes momentos do diestro. Setas brancas indicam a marcação citoplasmática tecidual em vermelho ou verde. Aumento 40x. Barra 50 μm. A: IRS1; B MAPK9; C: MAPK13; D: MAPK14; E: PI3KR3; F: PI3KCG; G: SOCS1; H: HSD3B; I: P450arom	49
Figura 5 -	Expressão gênica e proteica de <i>CAP</i> , <i>CrKII</i> , <i>RHOQ</i> e <i>RAP</i> . Expressão gênica: dados apresentam as médias ± desvio padrão da expressão relativa dos genes (n = 30). Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. Expressão da proteína no corpo lúteo canino:	

	blots ilustrativos e gráficos representam o conteúdo expresso em unidades arbitrárias (UA)/50-100 μg de proteína em relação ao GAPDH. As barras representam a média ± desvio padrão de n = 4. Barras com letras diferentes indicam diferença significativa (P < 0,05) entre os grupos. Genes - A: <i>RAP</i> ; B: <i>RHOQ</i> ; C: <i>CAP1</i> ; D: <i>CRKII</i> ; Proteínas - E: RAP; F: RHOQ; G: CAP1; H: CRKII	53
Figura 6 -	Perfis metabólicos de insulina (mU/mL; A) e de glicose (mg/dL; B) durante o diestro canino (n = 30; 5 animais por grupo). Os dados são apresentados como média e desvio padrão. O asterisco indica uma diferença significativa (P <0,05)	54
Figura 7 -	Concentração média \pm SEM de P4 (A) e E2 (B) no plasma periférico cadelas durante o diestro. Diferentes letras indicam diferença significativa (p $<$ 0,05)	54
Figura 8 -	(A) Curva dose resposta - concentração de progesterona (ng/,ml) em meio de cultivo de células luteínicas caninas do dia 30 pós ovulação tratadas com diferentes concentrações de insulina. (B) Mensuração de progesterona (ng/ml) em meio de cultura sob estímulo insulínico (100 ng/ml). (C) Mensuração de estradiol (pg/ml) em meio de cultura sob estímulo insulínico (100 ng/ml)	55
Figura 9 -	Concentração de progesterona e estradiol em meio de cultivo de células luteínicas caninas com adição de insulina e bloqueio das vias PI3K, MAPK14 e MAP2K1 por 1 hora. (A) Concentração de Progesterona (ng/ml); controle com insulina e tratamento com insulina + bloqueio de PI3K. (B) Concentração de Progesterona (ng/ml); controle com insulina e tratamento com insulina + bloqueio de MAPK14. (C) Concentração de Progesterona (ng/ml); controle com insulina e tratamento com insulina + bloqueio de MAP2K1. (D) Concentração de Estradiol (pg/ml); controle com insulina e tratamento com insulina + bloqueio de PI3K. (E) Concentração de Estradiol (pg/ml); controle com insulina e tratamento	

	com insulina + bloqueio de MAPK14. (F) Concentração de Estradiol (pg/ml); controle com insulina e tratamento com insulina + bloqueio de MAP2K1	56
Figura 10 -	Expressão gênica de CYP19A1 no dia 20 (A) e 40 (B), e expressão gênica	
	de HSD3B do dia 20 (C) e 40 (D), no CL canino durante o diestro em	
	cultivo celular com estímulo insulínico. Dados apresentam as médias \pm	
	desvio padrão da expressão relativa dos genes (n = 4). * indica diferença	
	estatística entre os grupos (P < 0,05)	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Primers e sondas utilizados no PCR em tempo	
	real	38
Tabela 2 -	Anticorpos primários e secundários utilizados na técnica de imunofluorescência.	40
Tabela 3 -	Anticorpos primários utilizados na técnica de Western blotting	42
Tabela 4 -	Regressão linear com as correlações realizadas em diferentes comparações durante o diestro canino: hormônios em relação aos genes; hormônios em relação às proteínas; genes da esteroidogêneses em relação aos genes da sinalização insulínica e proteínas da esteroidogênese em relação às proteínas da sinalização	
	insulínica.	51

LISTA DE ABREVIATURAS

% - porcentagem

< - menor

 \geq - maior ou igual

°C - graus Celsius

μg - micrograma

μl - microlitro

μm - micrometro

ABB – tampão de bloqueio de anticorpo

Akt - proteína quinase B

ANOVA - análise de variância

ATP – adenosina trifosfato

BSA - albumina sérica bovina

C3G – cyanidin-3-Glucoside

CAP1 – adenylyl cyclase-associated protein 1

Cbl – Cbl proto-oncogene

CD4 – cluster of differentiation 4

CD8 - cluster of differentiation 8

cDNA - ácido desoxirribonucleico complementar

CL - corpo lúteo

CLL – corpos lúteos

COX1 – Cytochrome c oxidase I

COX2 - Cytochrome c oxidase II

CrKII - CRK Proto-Oncogene, Adaptor Protein

CYP17- Cytochrome P450 family 17

CYP19A1 – cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1

CYP1A1- cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1

DAPI – 4',6-diaminino-2-fenilindole

DEs – diferencialmente expressos

DNA - ácido desoxirribonucleico

Domínio PTB - Domínio de ligação à fosfotirosina

 $E2 - 17\beta$ -estradiol

E₂ - estrógenos

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

ERK- extracellular signal-regulated kinases

FDR – taxa de detecção falsa

FPKM - fragments per kilobase of exon per million fragments mapped

FSH – hormônio foliculo estimulante

g - força g

GAPDH – glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GDP – difosfato de guanosina

GLUT4 - transportador de glicose tipo 4

GO – Gene ontology

GTP - guanosina trifosfato

HIF1A - hypoxia inducible factor 1 alpha subunit

HRP – peroxidase de cavalo

HSD3B - hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta

IGFI - insulin like growth factor 1

IgG - imunoglobulina G

IL10 – interleukin 10

IL12 – interleukin 12

IL6 – interleukin 6

IL8 – interleukin 8

INRS – insulin receptor

IPG – inositol phosphoglycans

IRS – insulin receptor substrate

kDa - kilodaltons

Kg - quilograma

LH - hormônio luteinizante

Log – logaritmo

M - molar

MAPK - Mitogen-activated protein kinase

MAP2K1 - Mitogen-activated protein kinase 1

MAPK13 – Mitogen-activated protein kinase 13

MAPK14 – Mitogen-activated protein kinase 14

MAPK9 – Mitogen-activated protein kinase 9

MAPKp38 - P38 mitogen-activated protein kinases

mg - miligrama

MKI67 – Marker Of Proliferation Ki-67

mL - mililitro

mM – milimolar

mRNA - ácido ribonucleico mensageiro

N = número

NFKB – nuclear fator NF kappa B

ng - nanograma

nM - nanomolar

O2- oxigênio

OSH – ovariosalpingohisterectomia

p.o. – após a ovulação

p110 – subunidade catalítica do PI3K

P4 – progesterona

P450scc – Cholesterol side-chain cleavage enzyme

P450c17 – steroid 17α -monooxygenase, 17α -hydroxylase,

p58 - subunidade regulatória da PI3K

Pb – pares de bases

PBS - solução tampão fosfato

PCR - reação em cadeia pela polimerase

PDK - pyruvate dehydrogenase kinase

Pg -picograma

PGE2 – prostaglandina E2

PGF -prostaglandina

pH - potencial hidrogêniônico

PI3KCG – phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit gamma

PI3K – phosphoinositide 3-kinase

PI3KR3 – phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 3

PKB – Protein kinase B (Akt = Protein kinase B, PKB)

PMSF – fenilmetanossulfonilfluoreto

PPIA - peptidylprolyl isomerase A

PRL – prolactina

PVDF – fluoreto de polivilideno

R = razão

Raf- Ras-activated cytoplasmic serine kinase and MAP kinase activator

RAP1 – Member Of RAS Oncogene Family

Ras- Intracellular signal transducer

RELA - RELA proto-oncogene, NF-kB subunit

RHOQ – ras homolog family member Q

RNA - ácido ribonucleico

RNA-Seq – sequenciamento de ácido ribonucleico

RPL32 – ribosomal protein L32

RPM - rotação por minuto

SDS - dodecil sulfato de sódio

SH – sarcoma homologo

Shc - colágeno homologo Src

SLC2A1 - solute carrier family 2 member 1

SLC2A4 - solute carrier family 2 member 4

SOCS1 – suppressor of cytokine signaling 1

STAR - steroidogenic acute regulatory protein

Tc10 - G protein signaling protein

TGFB - Transforming growth factor beta-1

TNF - tumor necrosis factor

Tris-HCL – tris base cloreto de hidrogênio

TTBS - tampão base trifosfato com Tween

UA – unidades arbitrárias

UI - unidade internacional

V – voltagem

VEGF - vascular endothelial growth factor A

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO2	5
2 Revisão de literatura	7
2.1 Ciclo reprodutivo da cadela	7
2.2. Corpo lúteo da cadela2	8
2.3. Mecanismos de ação da insulina	1
2.4 O papel da insulina Na reprodução	2
3 MATERIAL E MÉTODOS3	5
3.1 Animais e desenho experimental	5
3.2 Construção das bibliotecas e sequenciamento	6
3.3 AnÁlises de dados RNA-seq3	6
3.4 PCR em tempo real3	7
3.5 Imunofluorescência3	8
3.6 Extração de proteínas totais para Western blotting4	0
3.7 Western blotting4	1
3.8 Cultivo celular4	3
3.9 Análise Estatística4	5
4 Resultados4	5
4.1 RNA-seq	5
4.2 Expressão gênica de IRS1, MAPK9, MAPK13, MAPK14, PI3KCG, PI3KR3, SOCSI	Ι,
HSD3B e CYP19A1 no CL canino4	6
4.3 Quantificação e localização das proteínas IRS1, MAPK9, MAPK13, MAPK14 PI3KCG, PI3KR3, SOCS1, HSD3B e P450arom no CL canino4	-
4.4 CORRELAÇão entre as concentrações plasmáticas de Insulina, Glicose, P4 e E2 e o genes e proteínas, e correlação entre a expressão dos genes e proteínas d esteroidogênese e genes e proteínas da sinalização insulínica	a

4.5 Expressão gênica e proteica de CAP, CrKII, RHOQ e RAP da via secundária da
sinalização insulínica para captação de glicose no CL canino52
4.6 Perfil plasmático de insulina, Glicose, Progesterona e estradiol durante o diestro 53
4.7 Bloqueio de vias específicas da sinalização insulínica para a produção de esteroides 55
4.8 Efeito do estímulo insulínico na Expressão CYP19A1 e HSD3B em células luteínicas
caninas56
5 Discussão57
6 Conclusões63
Referências64
ANEXO A72

1 INTRODUÇÃO

O corpo lúteo (CL) é uma glândula endócrina complexa com o papel central na regulação de vários processos reprodutivos, tais como, a preparação, estabelecimento e manutenção da gravidez (LONERGAN; FORDE, 2015), através da secreção de progesterona (P4) realizada por este órgão (STOUFFER, 2006; STOCCO; TELLERIA; GIBORI, 2007).

A formação do CL ocorre durante a fase do ciclo estral conhecida como diestro, caracterizada por uma alta atividade proliferativa durante sua formação (HOFFMANN et al., 2004; PAPA; HOFFMANN, 2011), que sofre uma queda considerável a partir do dia 25 após a ovulação (p.o.), quando a formação do CL está completa. Dentre os diversos mecanismos de regulação da função do CL são evidenciados mecanismos de regulação parácrina e autócrina, (ONCLIN; VERSTEGEN; CONCANNON, 2000; HOFFMANN; BÜSGES; BAUMGÄRTNER, 2004; HOFFMANN et al., 2004; KOWALEWSKI et al., 2011; PAPA, HOFFMANN, 2011; KOWALEWSKI, 2014).

Como o CL apresenta períodos regulares de formação, atividade e regressão marcados por intensa remodelação tecidual, um aporte energético torna-se indispensável para exercer as atividades ovarianas de maneira plena. Diferentes trabalhos apontam este aporte nutricional desempenhado pela glicose, considerado o principal substrato energético para a atividade ovariana (DUPONT; SCARAMUZZI, 2016), como visto no endométrio (FRANÇA et al., 2015), no folículo e CL de vacas (NISHIMOTO et al., 2006) e no CL canino (PAPA, et al., 2014).

Estudos recentes identificaram a presença do transportador de glicose 4 (GLUT4 / gene *SLC2A4*) e do receptor de insulina (*INSR*) no CL canino (SOUSA et al., 2016), elementos diretamente relacionados a cascata de sinalização insulínica para captação de glicose em tecidos considerados classicamente insulino-sensíveis, como o tecido adiposo e muscular esquelético (WHITE; KAHN, 1994). No CL de cadelas, esta expressão (*INSR* e GLUT4 / *SLC2A4*) ocorre no citoplasma de células luteínicas de forma tempo-dependente ao longo do diestro, e a menor expressão dos respectivos genes acontece no dia 40 após a ovulação, coincidindo com aumento plasmático de estradiol (E2) (SOUSA et al., 2016). Por fim, demonstramos que a insulina estimula a captação de glicose pelas células luteínicas aumentando a captação na ordem de 2,7 vezes. Estes achados sugerem que a insulina apresente um papel crucial para a formação, manutenção e atividades do CL (SOUSA et al., 2016).

Os efeitos da insulina nos tecidos reprodutivos já foram estudados por diversos grupos que demonstraram que esta molécula está envolvida com a produção de esteroides em diferentes espécies (PORETSKY et al., 1999; FAN et al., 2009; SETO-YOUNG et al., 2011; KIM et al., 2015; DUPONT; SCARAMUZZI, 2016) e apresenta efeito direto sobre as enzimas envolvidas na esteroidogênese ovariana por meio da atuação sobre seu próprio receptor (NESTLER, 1998). Além disso, evidências substanciais indicam que a insulina, o insulin like growth factor 1 (IGFI) e outros fatores de crescimento intra-ovarianos podem modular a esteroidogênese basal (URBAN; VELDHUIS, 1992), como visto em estudos *in vitro*, nos quais a insulina estimulou a esteroidogênese em células da granulosa e da teca, aumentando a produção de P4 e andrógenos (DUPONT; SCARAMUZZI, 2016), agindo principalmente na modulação de processos pós-transcricionais para síntese de enzimas que participam da esteroidogênese.

Algumas ações da insulina podem ainda envolver mediadores de baixo peso molecular como o inositol phosphoglycan (IPG), também conhecido como mediador putativo da insulina, ou segundo mensageiro (NESTLER, 1998; PORETSKY et al., 1999), que regula positivamente de forma direta a expressão de enzimas esteroidogênicas, principalmente a cholesterol side-chain cleavage enzyme (P450scc), a steroid 17α-monooxygenase, 17α-hydroxylase (P450c17) e a cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1 (CYP19A1 / proteína P450arom). Quando ocorre a associação da insulina com o seu receptor, os mediadores são gerados por meio de hidrólise dos lipídios glicosilfosfatidilinositol e/ou por espécies de proteínas localizadas na monocamada externa da membrana celular (SALTIEL, 1990). Estes medidores são, então, internalizados e alteram as atividades de algumas enzimas e do metabolismo celular (CHEANG; ESSAH; NESTLER, 2004). Esta associação é descrita como mediadora da estimulação insulínica na esteroidogênese, pois a ativação e internalização desta molécula aumentam a produção de enzimas (NESTLER, 1998).

Com base nas informações descritas, na primeira parte dos experimentos, nós hipotetizamos que a insulina, através da ativação de genes específicos, possa interferir na expressão de genes ligados a esteroidogênese no CL canino, de forma positiva ou negativa, contribuindo para a regulação das funções luteínicas. Com isso, no presente estudo, a tecnologia de sequenciamento de RNA (RNA-Seq) foi utilizada para determinar o transcriptoma do CL canino, e, através destes resultados, mapear os genes diferencialmente expressos diretamente relacionados à sinalização insulínica e a esteroidogênese no CL canino, caracterizando sua expressão gênica e proteica e correlacioná-los entre si.

Na segunda parte dos experimentos, nossa hipótese foi determinar o ponto específico onde os genes ligados à insulina possam interagir diretamente com a esteroidogênese. Com isso, com o intuito de determinar qual molécula efetora da cascata de sinalização insulínica interfere na produção de esteroides no CL realizamos em cultivo celular o bloqueio de pontos específicos da via de sinalização insulínica seguido de estímulo insulínico, e determinamos as concentrações de E2 e P4 no meio de cultivo. Com o auxílio das ferramentas de nova geração, podemos explorar de maneira mais ampla todos os genes envolvidos com a sinalização da insulina e verificar sua interação com a expressão das enzimas esteroidogênicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CICLO REPRODUTIVO DA CADELA

O ciclo estral da cadela difere consideravelmente quando comparado com a maioria das outras espécies domésticas, por se tratar de um período bastante longo (CONCANNON, 2009). A cadela é considerada monoéstrica de ovulações espontâneas, com subsequente fase luteínica que dura de 55 a 75 dias (média de 60 dias) caracterizada pela produção de progesterona (P4) (CONCANNON, 2011).

As fases do ciclo estral canino são divididas distintamente em anestro, proestro, estro e diestro, sendo este ciclo controlado pelo eixo hipotálamo-hipófise-ovários, através da atuação dos hormônios folículo estimulante (FSH), luteinizante (LH), 17β estradiol (E2) e P4 (CONCANNON, 2009).

O anestro é o período de quiescência do aparelho reprodutivo, sua duração pode variar de 15 a 165 dias, e nesta fase, observam-se flutuações pulsáteis de FSH, LH e E2, enquanto que a P4 se mantém em concentrações extremamente baixas. Esta fase termina com um aumento na secreção pulsátil de LH (CONCANNON, MCCANN; TEMPLE, 1989).

O proestro geralmente apresenta uma duração de 3 a 17 dias, na qual se observa o desenvolvimento e amadurecimento dos folículos ovarianos. A concentração de FSH durante o proestro é reduzida gradativamente, concomitante a uma elevação nos níveis séricos de E2 que apresenta um pico no final do proestro e então declina rapidamente antes da onda de LH e do início do estro. O fim do proestro é caracterizado pelo aumento da concentração de P4 e redução do E2 (CONCANNON, 2009).

O estro tem duração variável de 3 a 21 dias, compreende o período de aceitação do macho pela fêmea, no qual ocorre queda na concentração sérica de E2. Observa-se neste período uma onda pré-ovulatória de LH, enquanto o FSH é liberado em pulsos que aumentam sua amplitude antes da ovulação, ambos estimulados pelo E2, sendo que a onda de LH é um indício do início da ovulação. A concentração de P4 começa a aumentar antes da ovulação devido à luteinização dos folículos, em conjunto com o pico de LH (CONCANNON, 2009).

A fase que se segue é o diestro (fase luteínica), caracterizada por uma alta atividade proliferativa durante a formação do CL, tal como indicado pelo aumento da expressão do antígeno *MKI67* (HOFFMANN et al., 2004; PAPA, HOFFMANN, 2011), que sofre uma queda considerável a partir do dia 25 após a ovulação, quando a formação do CL está completa.

Em contraste com a maioria das espécies de mamíferos, a cadela tem uma fase luteínica semelhante entre cadelas prenhes e não prenhes (ONCLIN; VERSTEGEN, 1997), diferenciando-se apenas quando o declínio gradual da P4 se transforma em uma queda acentuada em cadelas gestantes indicando o início do parto (CONCANNON, 2011), e a prolactina (PRL) que apresenta diminuição das concentrações pré-parto (KOWALEWSKI et al., 2011).

2.2. CORPO LÚTEO DA CADELA

O corpo lúteo (CL) é uma glândula endócrina temporária, que passa por um processo de desenvolvimento, manutenção e regressão, atingindo atividade secretória plena quando sua formação está completa (STOUFFER, 2006).

A produção de P4 feita pelo CL tem origem folicular iniciando-se ainda no proestro, após a onda de LH e atinge valores de 5ng/mL pouco antes da ovulação (CONCANNON, MCCANN; TEMPLE, 1989). Ocorre então um aumento contínuo dos níveis de P4 até atingir 30 a 35 ng/mL entre os dias 15 a 25, diminuindo gradativamente para níveis de < 1 ng/mL (CONCANNON, 1993; HOFFMANN et al., 2004) no início do anestro ovariano. Estas observações indicam que a P4 é um dos hormônios fundamentais que regem o ciclo reprodutivo da cadela.

O E2 apresenta concentrações variáveis e valores intermediários de 15 a 30 pg/mL, sendo mais elevado na metade do diestro em torno do dia 40, declinando depois (CONCANNON, 2009).

Os mecanismos de regulação da função do CL, em cadelas gestantes ou não, têm sido amplamente estudados. Durante as primeiras 2 a 4 semanas de diestro o apoio gonadotrófico não é necessário para a manutenção luteínica (CONCANNON, 1980; OKKENS et al., 1986). Recentemente, a prostaglandina E2 (PGE2) foi proposta como um dos fatores luteotróficos mais importantes agindo localmente durante o diestro (KOWALEWSKI; MUTEMBEI; HOFFMANN, 2008; KOWALEWSKI et al., 2011).

A concentração de PRL sérica em cadelas não prenhes apresenta aumento de sua expressão a partir do dia 15 após a ovulação (p.o.) com queda significativa na segunda metade do diestro, enquanto que em cadelas prenhes a maior expressão ocorre na metade da gestação, com diminuição no momento pré-parto (KOWALEWSKI et al., 2011). Quando as concentrações de P4 estão declinando no decorrer do diestro, observa-se um aumento na disponibilidade do LH (HOFFMANN; RIESENBECK; KLEIN, 1996). Assim, a luteólise ocorre apesar de um aumento na disponibilidade de hormônios gonadotróficos, hormônios estes considerados luteotróficos, portanto, mecanismos parácrinos e/ou autócrinos devem estar envolvidos no controle da função luteínica e precisam ser elucidados.

Além de PGE2 como fator luteotrófico nas primeiras 2 a 4 semanas após ovulação, outros vários fatores estão potencialmente envolvidos na manutenção do CL durante este período. Entre eles estão componentes do sistema imune, por exemplo, cluster of differentiation 4 e 8 (CD4 e CD8), em conjunto com citocinas produzidas por eles, tais como: interleukin 8, 10 e 12 (IL8, IL10 e IL12); tumor necrosis factor (TNF) ou transforming growth factor beta-1 (TGFB); fatores tróficos como IGF; e vascular endothelial growth factor A (VEGF) (HOFFMANN et al., 2004; MARIANI et al., 2006; GRAM et al., 2015).

Nosso grupo apresentou pela primeira vez que as células do CL canino são capazes de realizar captação de glicose sob estímulo insulínico mediado pela proteína cinase B (AKT), seguido pelo aumento do transportador de glicose 4 (GLUT4), além de caracterizar a expressão de receptor de insulina (INSR), transportador de soluto 2 membro 4 (SLC2A4/ proteína GLUT4), interleucina 6 (IL6) e o RELA proto-oncogene (RELA/ NFKB p65). Em adição, verificamos a influência de baixas concentrações de O2 sobre a expressão do fator indutível por hipóxia (HIF1A), transportador de soluto 2 membro 1 (SLC2A1), e a produção de P4 e expressão de 3-beta-hidroxiesteróide-desidrogenase (HSD3B) (SOUSA et al., 2016). Em conjunto, estes dados nos mostraram que a insulina regula algumas ações do CL, e que o

ambiente hipóxico interage neste processo e na captação de glicose, participando assim da sua manutenção e funcionalidade (SOUSA et al., 2016).

Em cadelas não prenhes, a lenta regressão da fase do CL é caracterizada pela diminuição na produção de P4, conhecida como fase funcional, seguida pela diminuição do tamanho das células, chamada luteólise estrutural. Esta fase está diretamente relacionada ao processo de apoptose que estas células sofrem (SONNACK, 2009), fato este observado a partir do dia 45 p.o.. Com esta cessação na produção de P4, ocorre à perda de componentes e da integridade celular, redução do suprimento vascular, aumenta a proliferação do tecido conjuntivo e a desorganização celular, degeneração e fagocitose das células luteínicas (SUGINO; OKUDA, 2007).

O lento declínio de P4 é associado com a progressiva redução na expressão da enzima HSD3B (KOWALEWSKI, et al., 2006; KOWALEWSKI; HOFFMANN, 2008). A prostaglandina F2 alfa (PGF) endógena, ao contrário do que ocorre em cadelas prenhes, parece não desempenhar um papel crucial na regressão luteínica, para a qual a atividade luteínica do cytochrome c oxidase I (COX1) é baixa durante o diestro, enquanto a do cytochrome c oxidase II (COX2) aumenta apenas durante o rápido crescimento observado nas primeiras semanas após a onda de LH e, embora o receptor de prostaglandina seja constitutivamente expresso, o que explica a sensibilidade às prostaglandinas exógenas, não há evidência de expressão da PGF sintetase (KOWALEWSKI, et al., 2006).

Esta regressão parece envolver funções celulares constitutivas: envolve baixa, mas evidente atividade apoptótica, onde células imunológicas CD8 e TNF positivas aumentam do dia 45 aos dias 60 a 75 (ENGEL et al., 2005), porém não apresenta indícios de produção de prostaglandina endógena e citocinas ao longo do diestro (LUZ et al., 2006; CONCANNON, 2009). Além destes fatores, não foram encontradas alterações na síntese de prostaglandina, citocinas, LH, prolactina ou expressão de receptores que pudessem justificar essa lenta regressão (FERNANDES et al., 1987). Mesmo diante de muitas tentativas, os mecanismos desencadeadores desse processo ainda não foram completamente elucidados e têm sido extensivamente estudados.

Com especial interesse em contribuir para o entendimento dos processos que levam a regressão luteínica, nosso grupo atualmente trabalha buscando elucidar o papel do E2 no processo de regressão luteínica na cadela não-gestante. Dados preliminares indicam que os genes relacionados a apoptose aumentam sua expressão após o aumento plasmático de E2 observado no dia 40 após a ovulação (BONFIM NETO, 2014).

2.3. MECANISMOS DE AÇÃO DA INSULINA

A transdução do sinal da insulina tem sido intensivamente estudada principalmente em músculos, figado e tecido adiposo, porém, quando falamos de reprodução, algumas, senão todas as vias que participam da sinalização insulínica parecem apresentar funcionalidade em células do ovário de diferentes espécies (DUPONT; SCARAMUZZI, 2016).

A sinalização intracelular da insulina em tecidos insulino-sensíveis tem início com a ligação do hormônio a um receptor específico de membrana, uma proteína heterotetramérica com atividade cinase intrínseca (TANIGUCHI; EMANUELLI; KAHN, 2006). Uma vez ligada à subunidade, a insulina estimula a autofosforilação da região intracelular (TANIGUCHI; EMANUELLI; KAHN, 2006), após esta ação o INSR ativa a fosforilação de vários substratos proteicos, como os membros da família dos substratos do receptor de insulina (IRS1, 2, 3 e 4), Shc, Gab-1 e Cbl (PESSIN; SALTIEL, 2000).

Os principais IRS são IRS1 e o IRS2, que quando fosforilados em resíduos de tirosina se ligam e ativam proteínas com domínio homólogas sarcomas (SH), como a phosphoinositide 3-kinase (PI3K) (TANIGUCHI; EMANUELLI; KAHN, 2006).

A PI3K é uma das principais proteínas envolvidas na mediação do sinal insulínico, visto que participa facilitando diferentes vias ligadas à ação da insulina, tais como: a captação de glicose, o efeito anti-lipolítico, a síntese de glicogênio, a supressão da gliconeogênese e o transporte de glicose (ENGELMAN; LUO; CANTLEY, 2006). Estes transportadores, GLUT, atuam por difusão facilitada, sendo sua capacidade de transporte bidirecional e, de fato, é o gradiente do substrato que determinará a direção intra ou extracelular da glicose (THORENS; MUECKLER, 2010; DENG; YAN, 2016). PI3K possui uma subunidade regulatória (p85) e uma subunidade catalítica (p110). A p85 contém domínio SH2, que se liga ao IRS1 e a p110 possui um domínio SH3, que se ligará a outras proteínas (ENGELMAN; LUO; CANTLEY, 2006). A PI3K atua diretamente na fosforilação e ativação da AKT (PESSIN; SALTIEL, 2000; HEMMINGS; RESTUCCIA, 2015).

A AKT é composta de duas isoformas (AKT1 e AKT2), sendo uma das principais efetoras da PI3K e medeiam muitas das respostas da insulina, fosforilando diversos substratos (SALE; SALE, 2007). A AKT pode regular o metabolismo da glicose em diversos níveis, pois aumenta a captação de glicose via tecidos responsivos a insulina (HEMMINGS; RESTUCCIA, 2015), induzindo a translocação de GLUT4 para a membrana plasmática (THORENS; MUECKLER, 2010); pode estimular a síntese de glicogênio no figado e

músculo; estimula a lipogênese no tecido adiposo, além da transcrição de genes específicos (ACCILI, 2001).

Vale ressaltar que para ocorrer uma eficiente sinalização insulínica são necessárias vias alternativas que complementam o funcionamento adequado desta cascata de eventos. A ativação da via Ras-Raf-Mek-Erk resulta na ativação das proteínas cinases ativadoras de mitoses (MAPK) (DOMINICI et al., 2005). A via MAPK, apesar de apresentar um possível efeito sobre a translocação de GLUT4 para a membrana plasmática, parece estar envolvida com a regulação da expressão gênica e controle do crescimento e diferenciação celular, envolvida com os efeitos promotores do crescimento deste hormônio e parecendo ser relativamente dispensável na regulação metabólica estimulada pela insulina (SALTIEL; KAHN, 2001; PIROLA; JOHNSTON; VAN OBBERGHEN, 2004).

Além disso, para a captação de glicose, a insulina apresenta uma via de sinalização secundária, onde, Cbl proto-oncogene (Cbl) está associado com a adenylyl cyclase-associated protein 1*CAP* (RIBON et al., 1998). Após a fosforilação, o complexo Cbl-CAP migra para a membrana celular e interage com a proteína CRK proto-oncogene adaptor protein (CrkII), que também está constitutivamente associada com a proteína C3G, que é uma proteína trocadora de nucleotídeos que catalisa a troca de GTP por GDP da proteína ras homolog family member Q (RHOQ) ativando-a. Uma vez ativada, *RHOQ* causa um segundo sinal para a translocação da proteína GLUT4, em paralelo à ativação da via da PI3K (CHIANG et al., 2001).

2.4 O PAPEL DA INSULINA NA REPRODUÇÃO

Os efeitos da insulina nos tecidos reprodutivos já foram estudados por diversos grupos que demonstraram que esta molécula está envolvida com a produção de esteroides em diferentes espécies (PORETSKY et al., 1999; FAN et al., 2009; SETO-YOUNG et al., 2011; KIM et al., 2015; DUPONT; SCARAMUZZI, 2016).

Algumas ações neste processo podem envolver mediadores de baixo peso molecular como o inositol phosphoglycans (IPG), também conhecido como mediador putativo da insulina, ou segundo mensageiro (NESTLER, 1998; PORETSKY et al., 1999), que regula positivamente de forma direta a expressão de enzimas esteroidogênicas, principalmente a cholesterol side-chain cleavage (P450scc), steroid-17α-monooxygenase, 17α-hydroxylase (P450c17) e a cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1 (CYP19A1 / proteína

P450arom). Quando ocorre a associação da insulina com o seu receptor, os mediadores são gerados por meio de hidrólise dos lipídios glicosilfosfatidilinositol e/ou por espécies de proteínas localizadas na monocamada externa da membrana celular (SALTIEL, 1990). Estes medidores são então internalizados e alteram as atividades de algumas enzimas e do metabolismo celular (CHEANG; ESSAH; NESTLER, 2004). Esta associação é descrita como mediadora da estimulação insulínica na esteroidogênese, pois a ativação e internalização desta molécula aumentam a produção de enzimas (NESTLER, 1998).

Outro mecanismo descrito relacionado a essa interação é a ligação pela ativação da via Ras-Raf-Mek-Erk (PORETSKY et al., 1999), principalmente pela ativação da P38 mitogenactivated protein kinases (MAPKp38) da sinalização insulínica (SETO-YOUNG et al., 2011).

Diferentes estudos *in vivo* visam compreender como esta interação é estabelecida. Em células luteínicas de ratas, a insulina aumenta a clivagem da cadeia lateral do colesterol, resultando em maior produção de P4, o que é atribuído ao aumento da concentração proteica do citocromo P450scc, sistema responsável pela conversão do colesterol em P4 (STEIN; BUSSMANN; TESONE, 1995).

Está bem estabelecido que a insulina interfere na diferenciação e proliferação de células somáticas no desenvolvimento das gônadas e a maturação dos oócitos (DEVOTO et al., 1999; SEKAR; GARMEY; VELDHUIS, 2000; BEHL; KAUL, 2002), além da esteroidogênese gonadal, na medida que folículos e os CL vão crescendo, ocorre um aumento na capacidade esteroidogênica de ambos, que resulta em aumento da produção de E2 e P4 respectivamente.

O efeito da insulina sobre a esteroidogênese parece ainda ser associado com a diminuição dos seus principais efetores ligados a captação de glicose, com a queda da fosforilação de Akt, ERK e AMPK (SCARAMUZZI et al., 2015). Com o aumento da ingestão de dietas ricas em glicogênicos, os tratamentos além de aumentarem as concentrações de glicose no plasma, aumentaram também o número de folículos em vacas (SCARAMUZZI et al., 2006), porém, reduziam a concentração de E2 e da expressão de *CYP19A1*.

Foi observado o aumento nos níveis de E2 circulante em resposta ao tratamento com insulina: os principais mecanismos propostos para esta interação foram que a insulina tem efeito direto nos funções ovarianas, principalmente em relação à expressão de aromatase, e este processo ocorre independente da pulsatilidade de LH (BUTLER; PELTON; BUTLER, 2004).

In vitro, já foi observado que em hepatócitos, a insulina exerce um efeito conservador da expressão gênica da CYP11A1 2C e 3A, que são sistemas enzimáticos responsáveis pelo catabolismo hepático da P4, conforme verificado em bovinos sob elevadas concentrações de insulina (LEMLEY et al., 2008). Mao e colaboradores (MAO et al., 2001) observaram que células luteínicas de suínos tratadas com insulina produzem mais P4 que as células do grupo controle, e este efeito é atribuído à maior produção do mRNA da proteína STAR e do citocromo CYP11A1, o que levou estes autores a concluírem que o aumento da insulina na fase de maturação folicular interfere na função luteínica subsequente.

Em células da granulosa de humanos foi visto que a insulina tem a capacidade de modular a proteína *STAR*, fator limitante da velocidade na biossíntese dos hormônios esteroides (DEVOTO et al., 1999), e tal processo parece ser promovido por mecanismos póstranscricionais, neste caso aumentando a estabilidade do mRNA.

Em peixes, estudos indicam que a insulina pode estimular a produção de E2 em folículos ovarianos pela atividade estimulante do gene *CYP1A1* (PAUL et al., 2010). Em concentrações supra-fisiológicas, houve um efeito estimulador na clivagem e maturação de oócitos de vacas (GONG et al., 2002) e como consequência, aumento na produção de esteroides, no entanto, em células da granulosa de bovinos, doses elevadas de insulina não estimulam a atividade da aromatase (BHATIA; PRICE, 2001).

A produção de P4 induzida por insulina em ovário humano é dependente da ativação de MAPKp38, mas não é dependente da MAPK-ERK-1 como visto por Seto-Young e colaboradores (SETO-YOUNG et al., 2011), que bloquearam as vias PI3K, MAPKp38 e MAPK1 em cultura.

Com base nas evidências relatadas, a relação insulina e esteroidogenese no CL canino bem como sua dependência e/ou influência do perfil hormonal necessitam de melhor caracterização para que a regulação da função luteínica nas cadelas possa ser compreendida de maneira mais ampla.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E DESENHO EXPERIMENTAL

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil (protocolo comissão de ética 2719/2012). Foram utilizadas 30 cadelas sem raça definida (com idade entre 1 e 3 anos e peso médio de 10 Kg) e clinicamente sadias. A função ovariana foi monitorada por meio da determinação dos níveis séricos de P4, em dias alternados (a cada 2 dias), a partir do surgimento dos sinais de proestro (edema e secreção vulvar sanguinolenta) e o dia da ovulação (dia 0) foi definido como o dia em que a concentração de P4 atingiu valores ≥ 5 ng/mL (CONCANNON, MCCANN; TEMPLE, 1989).

As fêmeas foram distribuídas em 6 grupos, de acordo com o dia em que foram submetidas à ovariosalpingohisterectomia (OSH): 10 (n = 5), 20 (n = 5), 30 (n = 5), 40 (n = 5), 50 (n = 5) ou 60 (n = 5) dias após a ovulação. No dia da intervenção cirúrgica, foi utilizado o seguinte protocolo anestésico: medicação pré-anestésica composta por acepromazina 0,2% na dose de 0,05 mg/Kg de peso vivo associada ao cloridrato de tramadol na dose de 3 mg/Kg. Para indução anestésica foi utilizado propofol na dose de 3 mg/Kg e cloridrato de quetamina 1 mg/Kg; e para a manutenção, o fármaco de escolha foi o isofluorano.

Após a dissecação, os corpos lúteos (CLL) coletados foram divididos em 2 partes: (1) a primeira parte foi imediatamente armazenada em nitrogênio líquido para extração de RNA e sequenciamento de RNA (RNA-Seq), além de validação por PCR em tempo real e Western blotting; e (2) a outra parte do material foi fixada em solução paraformoaldeído 4% por 24 horas para imunofluorescência.

No dia da intervenção cirúrgica, amostras de sangue (3 ml) foram coletadas para determinação dos níveis hormonais de P4, E2, insulina e glicose durante o diestro através dos níveis plasmáticos. Para P4, o menor nível de detecção a ser considerado foi de 0,02 ng/ml, com coeficiente de variação de inter-ensaio (CV) de 6,93%, e intra-ensaio de 10%. Para o E2, o menor nível de detecção foi de 0,5 pg/ml, com inter-ensaio de CV de 7,03 e intra-ensaio de 10%. Para a dosagem de insulina foram utilizados Kits de radioimunoensaio onde, a curva padrão variou de 2 a 200 uU/ml, com sensibilidade de 89%, enquanto a glicemia foi analisada

através do método enzimático colorimétrico de glicoseoxidase da empresa CELM a 505 nm (LOTT; TURNER, 1975).

3.2 CONSTRUÇÃO DAS BIBLIOTECAS E SEQUENCIAMENTO

Foram utilizadas 3 cadelas de cada um dos 6 momentos após a ovulação (10, 20, 30, 40 50 ou 60 dias) para o sequenciamento de RNA (n = 18 ao todo). Todas as bibliotecas RNA-Seq foram construídas a partir de 150 ng de RNA, usando Truseq RNA sample Prep (Ilumina, San Diego, CA, EUA), de acordo com o procedimento padrão do fabricante. A qualidade das bibliotecas produzidas foi avaliada usando o Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) utilizando um chip de DNA 1000.

As amostras foram consideradas válidas quando apresentados fragmentos de 260 pares de bases (pb). A quantificação das bibliotecas individuais foi realizada utilizando o PCR em tempo real por meio do kit de KAPA Biblioteca de Quantificação (KAPA Biosystems, Willmigton, MA, EUA).

O sequenciamento foi realizado com Ilumina HiqSeq 200 usando o protocolo *pair-end reads* e o Ilumina TruSeq PE kit cluster v3-cBotHS (Ilumina, San Diego, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Em cada *lane*, 6 amostras foram sequenciadas gerando 42 milhões de *reads* por amostra.

3.3 ANÁLISES DE DADOS RNA-SEQ

O Software Casava 8.2 (Ilumina, San Diego, CA, EUA) foi utilizado para obter os dados processados. As leituras foram mapeadas em relação ao genoma de referência (canis_familiaris. CanFam 3.1.75.dna.toplevel.fa) usando TopHat v2.0.9 e as transcrições foram montadas usando o pacote Cufflinks. A abundância relativa de transcritos de fragmentos de RNA-Seq foi medida pelo Cufflinks em FPKM (fragmentos por quilobase de exons por milhão de fragmentos mapeados).

Para cada gene, os níveis de expressão foram comparados entre os grupos. A expressão diferencial dos genes foi analisada pela razão do log de FPKM dividido pelo desvio

padrão da razão log. Um gene expresso diferencialmente foi considerado se o valor de P ajustado foi de FDR < 0,05. Em seguida, realizou-se uma análise de enriquecimento de categorias, usando o Gene Ontology, entre os genes diferencialmente expressos para se determinar quais genes estavam relacionados à sinalização insulínica e a esteroidogênese.

3.4 PCR EM TEMPO REAL

Após a técnica de RNA-Seq, os genes escolhidos para validação que apresentaram expressão diferencial em relação à sinalização insulínica e a esteroidogênese foram submetidos ao PCR em tempo real a partir de todas as amostras coletadas (n = 30).

A concentração e a qualidade do RNA foi determinada usando o biofotometro BioPhotometer Thermo Scientific NanoDrop™ 2000c (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e a integridade foi analisada por electroforese através de gel de agarose 2%. As amostras (1 mg de RNA total) foram transcritas para cDNA (DNA complementar) utilizando Superscript III transcriptase reversa (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As reações de PCR foram realizadas utilizando um fluorômetro automatizado ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e placas de 96 poços ópticos. Cada amostra (250 ng de RNA total) foi analisada em duplicata.

Como controle interno das reações foi utilizado à amplificação dos genes constitutivamente expressos gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), proteína ribossomal 32 (*RPL32*) e ciclofilina (peptidylprolyl isomerase A, *PPIA*), a fim de normalizar os resultados obtidos para os genes-alvo. Baseado no programa Normfinder (ANDERSEN; JENSEN; ØRNTOFT, 2004), os genes *GAPDH* e *PPIA* foram selecionados como os genes de referência ideais para as análises.

Os genes alvo utilizados encontram-se listados na tabela 1. O cálculo da eficiência para os genes alvo e referência foram feitos através do programa "LinRegPCR" (RAMAKERS et al., 2003) seguido do método matemático de Livak e Schmittgen (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Para isso, considerou-se a eficiência média com base na curva de amplificação individual de cada amostra.

Tabela 1 - Primers e sondas utilizados no PCR em tempo real

Gene	Sequencia	Sondas	GenBank nº *
			(TaqMan Assays)
IRS1	Forward ACCTGCGTTCAAGGAGGTCTG		XM543274
	Reverse CGGTAGATGCCAATCAGGTTC		
МАРК9	Cf02700828_m1		XM_843410.1
MAPK13	Cf02740243_s1		XM_845291.1
MAPK14	Cf02727830_m1		NM_001003206.1
PI3KR3	Cf02666180_m1		XM_856314.1
PI3KCG	Cf02700696_m1		XM_540385.2
SOCS1	Cf02702129_s1		XM_547126.2
HSD3B	Forward GGGTACTCAGCTCCTGTTGGAA	TGCCCAGGCTAGTGTGCCGATCTT	
	Reverse GCCACCTCTATGGTGCTGGTAT		
CYP19A1	Forward CCCCAAGCCCAATGA ATTTACTCTT	CCTGTAAGGAACATTCTTTG	
	Reverse CGAGGTCCAAAGCCAAA TGG		
RHOQ	Cf02730625_m1		XM_531808.2
CAP1	Cf02705995_g1		XM_532545.2
CRK	Cf02723159_m1		XM_003435202.3
RAP	Cf02689453_g1		XM_531808.2
PPIA	ID Cf03986523_Gh		XM_843327.1
GAPDH	Forward ACGGGAAGTCCATCTC	ATGTTGGCAGGATCTC	
	Reverse CACCAGCATCACCCCATTTG		
RPL32	Cf03986518_m1		XM_854019.1

Fonte: (SILVA, RS, 2017).

3.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Os CL (n = 30) foram fixados em paraformaldeído 4% e embebidos em resina Paraplast® seguindo o procedimento padrão para inclusão de material. Os cortes teciduais (2 µm) foram desparafinizados em xilol (duas vezes de 5 minutos), rehidratados em uma série de

etanol em concentrações decrescentes (duas vezes em etanol a 100%, e uma vez em etanol a 95%, 70%, e 50% durante 2 min) e em água destilada por 20 minutos.

As lâminas foram incubadas com solução peroxidade 0.3% por 30 minutos, seguido de rápida lavagem com água destilada. Os cortes foram incubados em solução PBS com Kodak Photo-Flo, solução PBS com Triton X-100 e solução PBS/ABB (Antibody Blocking Buffer - 5ml de Protein block, 1.5g de BSA 3%, 25ul Triton-X 0.05%, 45 ml PBS) por 10 minutos cada. Após estes procedimentos, os cortes foram incubados com seus respectivos anticorpos primários em temperatura ambiente (tabela 2). Todos os anticorpos primários e secundários foram diluídos no reagente DakoCytomation (Dako Laboratories, USA).

No dia seguinte, os cortes foram lavados em água destilada, seguido lavagem com PBS com Kodak Photo-Flo, PBS com Triton X-100 e PBS/ABB por 10 minutos cada. As lâminas foram incubadas com anticorpos secundários específicos para cada corte por 60 minutos em temperatura ambiente (Tabela 2). Após este período, os cortes foram lavados em água destilada, seguido de lavagem com PBS com Kodak Photo-Flo, PBS com Triton X-100 e novamente com PBS com Kodak Photo-Flo por 10 minutos, solução Kodak Photo-Flo diluída em água destilada por cinco minutos e lavagem com água destilada por três minutos. Antes da montagem, as lâminas secaram em temperatura ambiente no escuro por 60 minutos.

Após este período, as lâminas foram montadas utilizando VectaShield contendo DAPI para coloração nuclear (azul; Vector Laboratories). As lâminas foram fotografadas em microscópio com marcador fluorescente Nikon Eclipse Invertido (Nikon Canadá) e as imagens foram captadas usando uma câmera Nikon DS-QI1MC monocromática conectada a um computador e NISElements Dell HP Workstation com o Software Imaging (Nikon Canadá).

Tabela 2 - Anticorpos primários e secundários utilizados na técnica de imunofluorescência

Anticorpos Primários	Isotipo	Fornecedor (n°ordem)	Diluição	
IRS1	IgG monoclonal de camundongo	NP_005535.1	1:500	
МАРК9	IgG monoclonal de coelho	Ab179461	1:200	
MAPK13	IgG monoclonal de camundongo	TA505878	1:100	
MAPK14	IgG policional de coelho	Ab7952	1:100	
PI3KR3	IgG policional de coelho	Ab74136	1:50	
PI3KCG	IgG monoclonal de camundongo	TA505226	1:150	
SOCS1	IgG policional de coelho	TA321592	1:50	
HSD3B	IgG policional de coelho	Orb5478	1:100	
P450arom	P450arom IgG policional de coelho		1:100	
Anticorpos Secundários				
Alexa Fluor® 488	IgG policional de coelho	A-11008	1:400	
Texas Red-X	IgG Monoclonal de camundongo	T-6391	1:100	

Fonte: (SILVA, RS, 2017).

3.6 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS PARA WESTERN BLOTTING

Para determinação das proteínas, foi realizada a extração das proteínas totais. Os CL (n=5 por grupo) foram homogeneizados em Polytron PT 3000 KINEMATICA® (Brinkman, Westbury, USA) em tampão de lise hipotônico contendo 10 mM de TRIS/HCL 5 mM de EDTA, pH 7,5, na presença de uma mistura de inibidores de proteases, tais como benzamidina (20μg/ml), pepstatina (1μg/ml), leupeptina (0,5μg/ml), apoproteína (0,1μg/ml) e PMSF (fenilmetasulfonilfluoreto, 100μg/ml). O homogenato foi centrifugado a 1000g durante

dez minutos a 4 °C, após o procedimento, o sobrenadante foi armazenado para os experimentos posteriores. A concentração proteica das amostras foi analisada através do método de Bradford (BRADFORD, 1976) (Protein Assay Kit; Bio-Rad, Califórnia, USA), comparando as medidas obtidas para as amostras com a curva padrão de albumina lida a 595 nm.

3.7 WESTERN BLOTTING

As amostras de proteína (50-100 μg) foram separadas em um mini gel SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis), de concentração entre 8 e 12%, a 100 V. Antes da aplicação no gel, as amostras foram acrescidas de solução de Laemmli (glicerol 15%, Tris 0,05M, azul de bromofenol a 0,05%, SDS 9%) com 6% de 2-mercaptoetanol. Após a separação em gel, foi realizada a transferência eletroforética para uma membrana de imuno-blot PVDF (Trans-Blot, BIORAD), sob corrente constante de 120 mA, durante 2 horas, a 4°C, em tampão Tris (Tris HCl 12,5 mM, glicina 95 mM, metanol 20%, pH 8,3).

Em seguida, a membrana foi bloqueada usando a solução RapidBlock 10x (AMRESCO, Catalog M325) por cinco minutos, seguido com incubação com anticorpo primário 4° C por 16 horas (Tabela 3). As diluições foram determinadas de acordo com a recomendação do fabricante, quando necessário, foi realização testes de diluição para uma determinada proteína. Após a incubação com o primeiro anticorpo, foram realizadas três lavagens em TTBS e incubação com o anticorpo secundário, ligado a HRP (horseradish peroxidase). Após lavagens em TTBS, o sinal foi detectado pela adição de um substrato para peroxidase (ECL Western blotting analysis system, GE Healthcare). As membranas foram analisadas no aparelho Bio-Rad ChemiDoc™ MP e no programa Image Lab 4.0.1 (BioRad).

Tabela 3 - Anticorpos primários utilizados na técnica de Western blotting.

Anticorpos Primários	Isotipo	Fornecedor (n°ordem)	GEL	Peso	Diluição
IRS1	IgG monoclonal de camundongo	NP_005535.1	8%	~185kDa	1:1000
MAPK9	IgG monoclonal de coelho	Ab179461	12%	~48kDa	1:1000
MAPK13	IgG monoclonal de camundongo	TA505878	12%	~40kDa	1:200
MAPK14	IgG policional de coelho	Ab7952	12%	~38kDa	1:200
PI3KR3	IgG policional de coelho	Ab74136	8%	~84kDa	1:500
PI3KCG	IgG monoclonal de camundongo	TA505226	8%	~110kDa	1:200
SOCS1	IgG policional de coelho	TA321592	12%	~24kDa	1:1000
HSD3B	IgG policional de coelho	Orb5478	12%	~41kDa	1:100
P450arom	IgG policional de coelho	NB100-1596	12%	~55kDa	1:500
RHOQ	IgG monoclonal de camundongo	NB110-57616	10%	~25kDa	1:1000
CAP1	IgG policional de coelho	NBP1-31718	10%	~55kDa	1:1000
CRK	IgG policional de coelho	bs-2763R	10%	~40kDa	1:500
RAP	IgG policional de coelho	NM_198679	10%	~123kDa	1:1000
GAPDH	Policional de camundongo	АН996	-	~40kDa	1:10000

3.8 CULTIVO CELULAR

Para o primeiro experimento em cultivo celular, foram utilizados ovários com CL de cadelas da primeira metade do diestro (10-30 dias / n=4). Para o segundo experimento, foram utilizados CL do dia 20 p.o, quando P4 sérica atinge concentração máxima, (n=4) e CL do dia 40, quando E2 sérico atinge concentração máxima durante o diestro (n=4).

Após remoção cirúrgica, os CL foram imersos imediatamente em solução tampão fosfato (PBS) contendo solução antibiótica e antimicótica a 1% (10.000 UI de penicilina, 10 mg de estreptomicina e 25 μg de anfotericina B por ml; A5955; Sigma Aldrich, USA) e transportados em gelo ao laboratório.

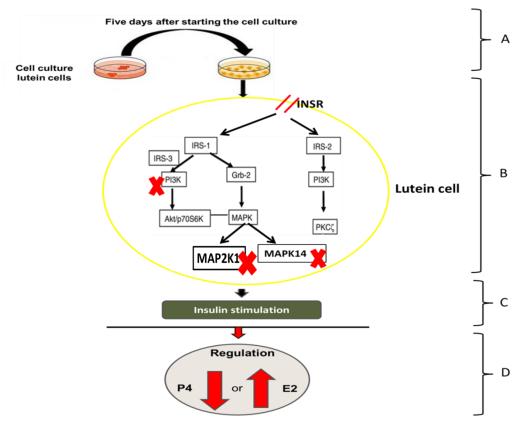
Em capela de fluxo laminar (Pachane Pa420, Pachane Equipamentos para Laboratórios LTDA, Brasil), o tecido ovariano adjacente foi dissecado e o tecido luteínico remanescente foi dissociado enzimaticamente com colagenase tipo 1 (1 mg/ml; C0130; Sigma Aldrich, USA) diluída em DMEM pH 7,2 - 7,4 (41965-039; Gibco BRL) por 1 hora sob agitação (60 movimentos / min) à temperatura de 37 °C, em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

A suspensão foi centrifugada por 10 min a 200g, a amostra ressuspensa em DMEM e filtrada em rede de 150 μm de diâmetro para remover os tecidos não digeridos. O filtrado foi novamente centrifugado por 10 min a 200g, ressuspenso em solução tampão de lise de eritrócitos (0,16 M NH₄Cl; 0,01 M Tris-HCl pH 7,2-7,4) diluído em DMEM por 10 min, centrifugado por 10 min a 200g e ressuspenso em DMEM. As células, foram colocadas em placas de 96 poços e incubadas a 37 °C sob atmosfera umidificada (5% de CO₂). As células foram observadas e fotografadas e a troca do meio de cultivo foi realizada a cada 24 horas.

Previamente, realizamos uma curva dose-resposta para determinação da concentração de insulina a ser utilizada. Determinada a concentração de insulina, uma nova curva foi realizada, para definir o tempo de tratamento para a insulina permanecer em cultivo celular. Foi realizado teste em meio suplementado com insulina a 100ng/mL (100mg, I6634; Sigma Aldrich, USA), nos tempos 0, 6, 12 e 24 horas. As amostras apresentaram aumento da concentração de progesterona apenas em 24 horas, sendo este tempo utilizado para os experimentos posteriores. Para determinar qual a concentração dos bloqueadores de MAP2K1, MAPK14 e PI3K deveria ser utilizada, também foram realizadas curvas doseresposta.

Para o primeiro experimento, o delineamento foi definido da seguinte forma: células mantidas em meio livre de insulina (C = grupo controle); meio suplementado com de insulina (CI = grupo controle tratado com insulina) (100mg, I6634; Sigma Aldrich, USA); e grupo com bloqueadores específicos + estímulo insulínico: 50 uM de bloqueador de MAP2K1 (PD98059 sigma); 25uM de bloqueador de MAPK14 (SB203580 sigma); e 5uM de bloqueador de PI3K (LY294002 sigma). Os bloqueios ocorreram durante 1 hora, seguido de estímulo com insulina por 24 horas, e após este período as amostras de meio de cultivo foram coletadas para dosagem de P4 e E2 (Figura 1). Para cada tratamento, foram coletados um total de cinco poços de cada placa de cultivo.

Figura 1 – Etapas do cultivo celular para o bloqueio de PI3K, MAP2K1 e MAPK14. (A) Células luteínicas foram mantidas em DMEM suplementado com soro fetal bovino a 10% até atingirem 90% de confluência (B) Bloqueio por 1 hora das vias PI3K, MAP2K1 e MAPK14. (C) Estímulo com insulina por 24 horas. (D) Coleta do meio de cultivo e mensuração de P4 e E2.



Fonte: (SILVA,RS, 2017).

Para o segundo experimento, os grupos experimentais foram divididos da seguinte maneira: grupo controle, cultivado em meio livre de insulina; e meio suplementado com insulina a 100ng/mL (100mg, I6634; Sigma Aldrich, USA). O estímulo com insulina ocorreu pelo período de 24 horas. Para a determinação da expressão dos genes relacionados à

esteroidogênese, considerados como diferencialmente expressos após o RNA-Seq, as células foram raspadas e colocadas em tubos livres de RNAse contendo 250 µl de TRIzol® (foram coletados cinco poços por placa para cada tratamento), congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C para análise por PCR em tempo real após a extração do RNA total.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de expressão gênica e proteica e dosagens hormonais foram avaliados quanto a sua normalidade (teste Kolmogorov-Smirnov) e variâncias (teste de Bartlett) para a escolha adequada do teste a ser realizado, sendo que, para distribuição normal e variâncias iguais foi aplicado o teste paramétrico ANOVA seguido pelo pós-teste de comparação múltipla Bonferroni, e quando não paramétrico, foi aplicado o teste de Kruskal Wallis seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Dunn. Além disso, as variáveis foram confrontadas entre si pelo teste de correlação de Pearson. A análise de correlação linear foi utilizada para avaliar a correlação entre os (1) hormônios insulina, glicose, P4 e E2 e os genes e proteínas; (2) genes e proteínas relacionados à esteroidogênese em relação aos genes e proteínas da sinalização insulínica. Os dados de validação foram analisados através do programa estatístico GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, USA) e os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. Os valores considerados significativos apresentam coeficiente de variação acima de 0,8 com significância de P ≤ 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 RNA-SEQ.

Um total de 771.208.718 *reads* foram gerados pelo Illumina HiScanSeq, com um tamanho médio de 100 bp, média de 42 milhões de *reads* por amostra. Através do software TopHat, 673.577.446 (87,3%) *reads* foram mapeados no genoma canino de referência. A análise de bioinformática detectou a presença de 34.408 genes nas amostras analisadas, sendo

que deste total 9.000 ainda não foram anotados no genoma de *Canis familiaris*. Observou-se que 29.011 genes apresentaram algum nível de expressão gênica em algum momento do diestro, porém, a análise de expressão gênica temporal revelou a presença de 5.116 genes diferencialmente expressos em pelo menos uma comparação. Foram identificados sete genes diretamente relacionados à sinalização insulínica: o insulin receptor substrate 1 (*IRS1*), envolvido com o início da sinalização insulínica, o phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 3 (*PI3KR3*) e phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit gamma (*PI3KCG*), que são isoformas da *PI3K* envolvidas na fosforilação de AKT, as mitogenactivated protein kinase 9 (*MAPK9*), mitogen-activated protein kinase 133 (*MAPK13*) e mitogen-activated protein kinase 14 (*MAPK14*) envolvidas na proliferação celular e o suppressor of cytokine signaling 1 (*SOCS1*), conhecido como um dos principais reguladores da sinalização insulínica. Das enzimas esteroidogênicas, foram identificadas dois transcritos diferencialmente expressos, a hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta (*HSD3B*) e a cytochrome P450 family 19 subfamily A member 1 (CYP19A1 / Aromatase).

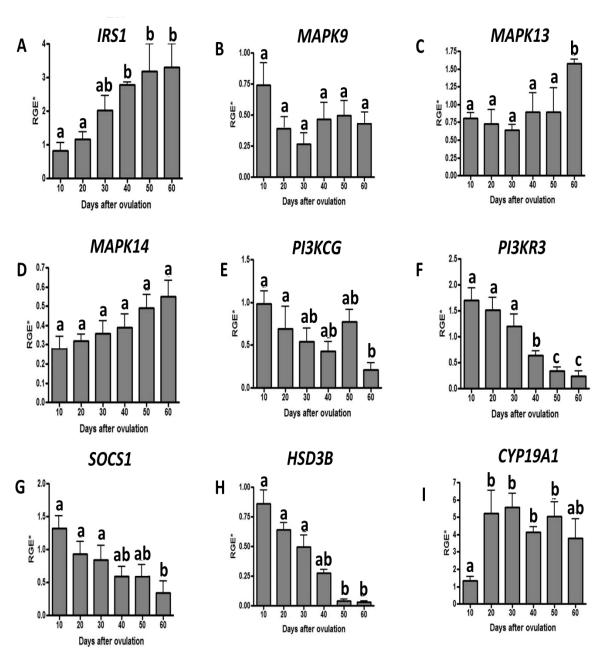
Utilizou-se a análise de PCR em tempo real para validar os resultados obtidos pelo RNA-Seq. Os genes foram selecionados depois de terem sido identificados como diferencialmente expressos. Os resultados de correlação (r) mostram que os níveis de expressão dos genes detectados por qPCR foram consistentes com os resultados da análise de RNA-Seq: CYP19A1 - r = 0.9651 e P = 0.0018, HSD3B - r = 0.9727 e P = 0.001, IRS1 - r = 0.9607 e P = 0.0023, MAPK13 - r = 0.9652 e P = 0.0018, MAPK14 - r = 0.9453 e P = 0.0044, PI3KCG - r = 0.9212 e P = 0.0091 e SOCS1 - r = 0.9317 e P = 0.0068. Apenas a MAPK9 (r = 0.2074 e P = 0.6933) e PI3KR3 (r = 0.7771 e P = 0.0690), não apresentaram alto coeficiente de variação.

4.2 EXPRESSÃO GÊNICA DE *IRS1*, *MAPK9*, *MAPK13*, *MAPK14*, *PI3KCG*, *PI3KR3*, *SOCS1*, *HSD3B* E *CYP19A1* NO CL CANINO

No CL canino, a análise do transcriptoma mostra que a expressão de *IRS1* é menor aos 10, 20 e 30 dias p.o., apresentando um aumento significativo na segunda metade do diestro, a partir do dia 40 (Figura 2A). Os valores apresentados entre os membros da família MAPK diferem entre si em relação a sua expressão: *MAPK9* e MAPK14 não apresentam diferença de expressão (Figura 2B e 2D); *MAPK13* apresentou sua expressão de forma constante ao longo

do ciclo, apresentando elevação de sua expressão no dia 60 (Figura 2C), . Diferentemente do que apresenta a expressão de *PI3KCG* (Figura 2E) e *PI3KR3*(Figura 2F), que diminui perceptivelmente no final do diestro. *SOCS1* apresenta expressão constante ao longo do diestro, com diminuição entre dias 30 e 60 (Figura 2G). A expressão da *HSD3B* diminui no decorrer do ciclo, significativamente a partir do dia 40, (Figura 2H), enquanto a *CYP19A1* apresenta aumento de sua expressão do dia 20 permanecendo elevada (Figura 2I).

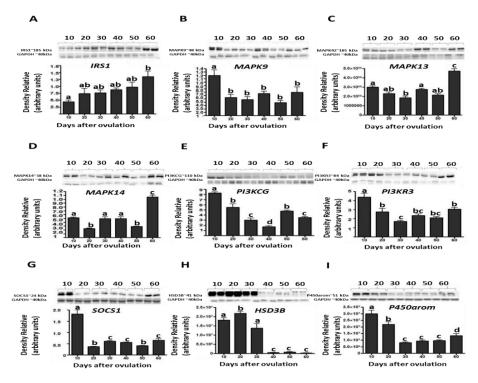
Figura 2 – Expressão gênica de IRS1 (A), MAPK9 (B), MAPK13 (C), MAPK14 (D), PI3KCG (E), PI3KR3(F), SOCS1 (G), HSD3B (H) e CYP19A1 (I) no CL canino durante o diestro (10-60 dias após a ovulação). Dados apresentam as médias \pm desvio padrão da expressão relativa dos genes (n=30). Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos (P < 0.05).



4.3 QUANTIFICAÇÃO E LOCALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS IRS1, MAPK9, MAPK13, MAPK14, PI3KCG, PI3KR3, SOCS1, HSD3B E P450AROM NO CL CANINO

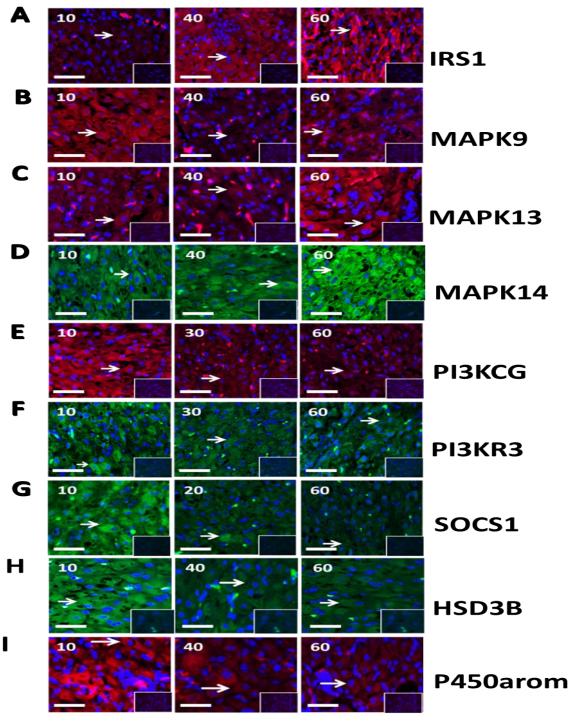
A análise proteica no CL canino apresenta na maioria dos casos semelhança com os resultados da expressão gênica dos genes diferencialmente expressos da sinalização insulínica e da esteroidogênese. IRS1 (Figura 3A), MAPK13 (Figura 3C), MAPK14 (Figura 3D) apresentam maior expressão proteica no dia 60 do diestro, no período de regressão do CL, enquanto que, MAPKK9 (Figura 3B) PI3KCG (Figura 3E), PI3KR3 (Figura 3F), e SOCS1 (Figura 3G) apresentam maior expressão no dia 10 do diestro canino. HSD3B apresenta maior expressão na primeira metade do diestro canino (Figura 3H). Apenas a expressão da P450arom apresenta perfil diferente de expressão em relação ao seu gene, onde a proteína diminui sua expressão a partir do dia 30 (Figura 3I).

Figura 3 - Expressão proteica dos genes diferencialmente expressos relacionados à sinalização insulínica e a esteroidogênese no CL canino. Blots ilustrativos e gráficos representam o conteúdo expresso em unidades arbitrárias (UA)/50-100 μ g de proteína em relação ao GAPDH. As barras representam a média \pm desvio padrão de n = 30. Barras com letras diferentes indicam diferença significativa (P < 0,05) entre os grupos.



Através da imunofluorescência foi possível verificar a intensidade da marcação apresentada entre os principais momentos do diestro canino, para ilustrar as diferenças de marcação detectadas pelos experimentos de Western blotting, (Figura 4).

Figura 4 - Fotomicrografía de imunofluorescência de CL de cadelas em diferentes momentos do diestro. Setas brancas indicam a marcação citoplasmática tecidual em vermelho ou verde. Aumento 40x. Barra 50 μ m. A: IRS1; B MAPK9; C: MAPK13; D: MAPK14; E: PI3KR3; F: PI3KCG; G: SOCS1; H: HSD3B; I: P450arom.



4.4 CORRELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE INSULINA, GLICOSE, P4 E E2 E OS GENES E PROTEÍNAS, E CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DOS GENES E PROTEÍNAS DA ESTEROIDOGÊNESE E GENES E PROTEÍNAS DA SINALIZAÇÃO INSULÍNICA

Através da regressão linear, realizamos as seguintes correlações: níveis hormonais de insulina, glicose, P4 e E2, em relação à expressão de genes e proteínas, e ainda, correlações entre as enzimas esteroidogênicas em relação aos genes da sinalização insulínica, assim como correlação entre estas proteínas (Tabela 4).

A insulina apresentou correlação com o gene e proteína *PI3KCG* (r =0,012140427; r=0,047730685). Enquanto a glicose apresentou correlação com o gene *HSD3B* (r=0,015873896) e com as proteínas CYP19A1 (r=0,030213144) e IRS1 (r=0,056497412).

O E2 apresentou correlação com o gene *CYP19A1* (r= 0,050237221) e com as proteínas IRS1 (r= 0,050237221), SOCS1 (r= 0,048853349) e MAPK13 (r= 0,047884083). Enquanto a P4, apresentou correlação gênica e proteica com *HSD3B* (r= 0,005205679; r= 0,000252), *MAPK13* (r= 0,022473671; r= 0,00544288). O gene *HSD3B*, ainda apresentou correlação com o gene *PI3KR3* (r= 0,0500197). Por fim, sua proteína apresentou correlação com as proteínas IRS1 (r= 0,0436804) e MAPK14 (r=0,000314411).

Nas correlações entre as enzimas esteroidogênicas e a sinalização insulínica, vimos que, gene e proteína *CYP19A1* apresenta correlação com o gene e proteína *IRS1* (r= 0,00026997; r= 0,035703567) e *PI3KCG* (r= 0,048493172; r= 4,89983E-07), e ainda a proteína CYP19A1 apresentou correlação com as proteínas MAPK9 (r= 0,025902), PI3KR3 (r= 2,47E-06) e SOCS1 (r= 0,000158148).

Gene e proteína *HSD3B* apresentaram correlação com gene e proteína *IRS1* (r= 0,008835415; r= 0,046339498). O gene *HSD3B* ainda apresentou correlação com o gene *PI3KR3* (r= 0,032693559). Em relação às proteínas ainda foi visto correlação entre HSD3B e a MAPK13 (r= 0,028241072), MAPK14 (r= 0,024548622) e a PI3KCG (r= 0,021594062).

Tabela 4 – Regressão linear com as correlações realizadas em diferentes comparações durante o diestro canino: hormônios em relação aos genes; hormônios em relação às proteínas; genes da esteroidogêneses em relação aos genes da sinalização insulínica e proteínas da esteroidogênese em relação às proteínas da sinalização insulínica.

Genes vs Hormones	R2	P-value	Equation
Insulin x PI3KCG	0,243727	0,012140427	$y = 0.0055x^2 - 0.2196x + 2.205$
Glucose x HSD3B	0,227665	0,015873896	$y = 3E + 06x^{-3,629}$
E2 x HSD3B	0,175426	0,037169733	$y = -0.0003x^2 + 0.0093x + 0.479$
P4 x HSD3B	0,292948	0,005205679	$y = -0.0009x^2 + 0.0548x - 0.112$
P4 x IRS1	0,165343	0,0436804	$y = 0.0025x^2 - 0.1602x + 3.890$
P4 x MAPK13	0,206533046	0,022473671	$y = 0.0012x^2 - 0.072x + 1.625$
P4 x PI3KR3	0,156846	0,050019721	$y = -0.0006x^2 + 0.0685x + 0.103$
rotein vs Hormones	R2	P-value	Equation
Insulin x PI3KCG	0,159786	0,047730685	y = 1473,8x ² - 221554x + 7E+0
Glucose x CYP19A1	0,188304	0,030213144	y = 4884,5x ² - 1E+06x + 1E+08
Glucose x IRS1	0,149194	0,056497412	$y = -1422,5x^2 + 421203x - 2E + 0$
E2 x CYP19A1	0,156574	0,050237221	y = 784,27x ² - 298017x + 2E+0
E2 x MAPK13	0,159585	0,047884083	y = 1444,7x ² - 135566x + 6E+0
E2 x SOSC1	0,158327	0,048853349	y = 664,29x ² - 215588x + 1E+0
P4 x HSD3B	0,448295	0,000252	$y = -5880,9x^2 + 783148x - 1E + 0$
P4 x MAPK13	0,290418	0,005442884	y = 3180,2x ² - 182469x + 5E+0
P4 x MAPK14	0,437997	0,000314411	$y = 8340x^2 - 525276x + 1E + 07$
GENES VS GENES	R2	P-value	Equation
CYP19A1 x IRS1	0,445066	0,00026997	$y = -0.0261x^2 + 0.6225x + 0.68$
CYP19A1 X PI3KCG	0,158792	0,048493172	y = 0,0178x ² - 0,2532x + 1,169
HSD3B X IRS1	0,262475	0,008835415	$y = -0.7967x^2 - 1.334x + 3.110$

HSD3B X PI3KR3 0,183411 0,032693559 $y = -4,0698x^2 + 5,5399x - 0,0624$

PROTEIN VS PROTEINS	R2	P-value	Equation
CYP19A1 x IRS1	0,177934	0,035703567	$y = -3E-10x^2 - 0.2185x + 1E+07$
CYP19A1 X MAPK9	0,197814	0,025902	$y = -6E - 09x^2 + 0,4236x + 2E + 06$
CYP19A1 X PI3KCG	0,674370726	4,89983E-07	$y = 94085x^2 - 3E + 06x + 4E + 07$
CYP19A1 X PI3KR3	0,626216	2,47E-06	$y = 1E-09x^2 + 1,0926x + 1E+07$
CYP19A1 X SOCS1	0,469239	0,000158148	$y = 1E-08x^2 + 0.0139x + 4E+06$
HSD3B X IRS1	0,161641	0,046339498	$y = 4E-08x^2 - 1,0175x + 1E+07$
HSD3B X MAPK13	0,192479	0,028241072	$y = 1E-09x^2 - 0.0811x + 3E+06$
HSD3B X MAPK14	0,201115	0,024548622	y = -9E-10x ² - 0,1297x + 7E+06
HSD3B X PI3KCG	0,208976	0,021594062	$y = -2E - 08x^2 + 0,5153x + 3E + 06$

Fonte: (SILVA, RS, 2017).

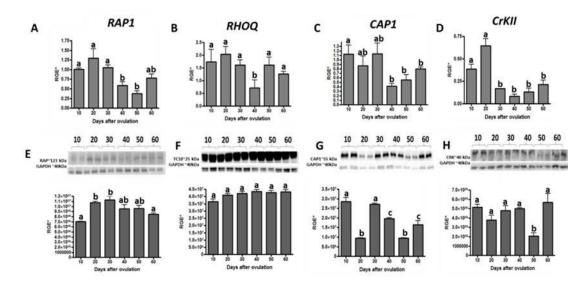
4.5 EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DE *CAP*, *CRKII*, *RHOQ* E *RAP* DA VIA SECUNDÁRIA DA SINALIZAÇÃO INSULÍNICA PARA CAPTAÇÃO DE GLICOSE NO CL CANINO

A fim de verificar se outros genes da sinalização insulínica que não se apresentaram diferencialmente expressos pela técnica de RNA-Seq, possam estabelecer alguma modulação da esteroidogênese, selecionamos a via secundária para a captação se glicose para observar sua expressão gênica e proteica no CL canino.

A representação quantitativa do gene member of RAS Oncogene Family (*RAP1*) mostra maior expressão na primeira metade do diestro (Figura 5A), enquanto a marcação proteica apresenta um aumento significativo de sua expressão a partir do dia 20 do diestro (Figura 5E). O gene ras homolog family member Q (*RHOQ* / antigo *TC10*), apresenta diminuição de sua expressão apenas no dia 40 do ciclo (Figura 5B), enquanto sua expressão proteica permanece constante ao longo do diestro (Figura 5F). A expressão gênica da

proteína adenylyl cyclase-associated protein 1 (*CAPI*) mantém-se constante até o dia 30 (Figura 5C), sendo que no dia 40 há queda brusca em sua expressão, enquanto a expressão proteica apresenta menor expressão no dia 20 e 50 do diestro (Figura 5G). A expressão do gene CRK Proto-Oncogene, Adaptor Protein (*CRKII*) mantém-se estável até o dia 20, diminuindo de maneira brusca no dia 30 (Figura 5D), enquanto sua expressão proteica apresenta diminuição de sua expressão apenas no dia 50 do diestro canino (Figura 5H).

Figura 5 - Expressão gênica e proteica de CAP, CRKII, RHOQ e RAP. Expressão gênica: dados apresentam as médias \pm desvio padrão da expressão relativa dos genes (n = 30). Barras com letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos. Expressão da proteína no corpo lúteo canino: blots ilustrativos e gráficos representam o conteúdo expresso em unidades arbitrárias (UA)/50-100 μ g de proteína em relação ao GAPDH. As barras representam a média \pm desvio padrão de n = 4. Barras com letras diferentes indicam diferença significativa (P < 0,05) entre os grupos. Genes - A: RAP; B: RHOQ; C: CAPI; D: CRKII; Proteínas - E: RAP; F: RHOQ; G: CAPI; H: CRKII.

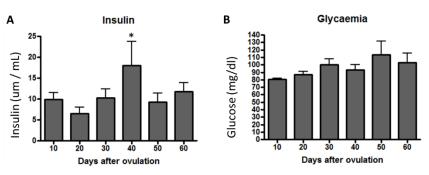


Fonte: (SILVA, RS, 2017).

4.6 PERFIL PLASMÁTICO DE INSULINA, GLICOSE, PROGESTERONA E ESTRADIOL DURANTE O DIESTRO

A insulinemia foi maior no dia 40 (Figura 6A), enquanto não houve diferença significativa entre as médias de glicemia no decorrer do diestro (P > 0.05) (Figura 6B).

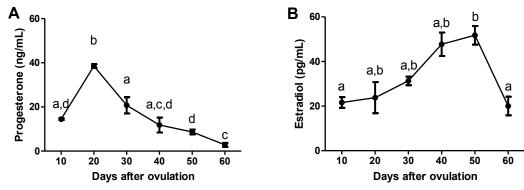
Figura 6 – Perfis metabólicos de insulina (mU/mL; A) e de glicose (mg/dl; B) durante o diestro canino (n = 30; 5 animais por grupo). Os dados são apresentados como média e desvio padrão. O asterisco indica uma diferença significativa (P < 0.05).



Fonte: (SILVA, RS, 2017).

O perfil plasmático esteroidogênico das cadelas variou em relação ao diestro. P4 é abundante durante a fase de desenvolvimento e apresentou a maior concentração plasmática no dia 20 p.o. (P <0,0001) decrescendo gradualmente depois (Figura 7A). As concentrações de E2 atingiram as concentrações plasmáticas mais elevadas no dia 50 p.o., que diferiram significativamente dos dias 10 e 60 p.o. (Figura 7B).

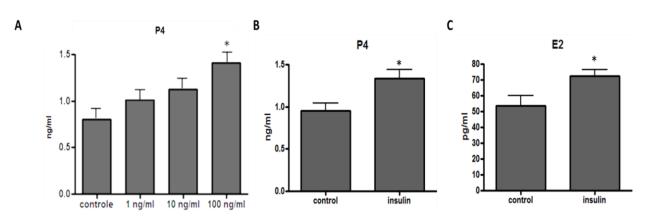
Figura 7 - Concentração média \pm SEM de P4 (A) e E2 (B) no plasma periférico cadelas durante o diestro. Diferentes letras indicam diferença significativa (p <0,05)



4.7 BLOQUEIO DE VIAS ESPECÍFICAS DA SINALIZAÇÃO INSULÍNICA PARA A PRODUÇÃO DE ESTEROIDES

Para determinação da concentração de insulina, previamente o meio de cultivo foi suplementado com diferentes doses de insulina: insulina a 1, 10 e 100ng/mL (100mg, I6634; Sigma Aldrich, USA) para estabelecimento de uma curva dose resposta. As amostras de meio de cultivo foram coletadas após 24 horas para dosagem de P4. A concentração de 100ng/ml de insulina apresentou diferença significativa em relação às demais concentrações testadas (P = 0,01), com isso, foi utilizada como concentração padrão para os posteriores tratamentos com bloqueadores (figura 8A). A mensuração de P4 e E2 foi realizada sob estímulo insulínico de 100ng/ml, onde observamos o aumento das concentrações hormonais em relação ao grupo controle tanto de P4 (P=0.0023), como de E2 (P=0.0016) (figura 8B e 8C).

Figura 8 – (A) Curva dose resposta - concentração de progesterona (ng/,ml) em meio de cultivo de células luteínicas caninas do dia 30 pós ovulação tratadas com diferentes concentrações de insulina. (B) Mensuração de progesterona (ng/ml) em meio de cultura sob estímulo insulínico (100 ng/ml). (C) Mensuração de estradiol (pg/ml) em meio de cultura sob estímulo insulínico (100 ng/ml).

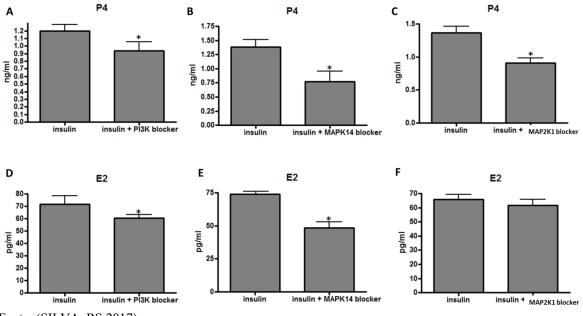


Fonte: (SILVA, RS, 2017).

A produção de esteroides sofreu uma modificação significativa de sua expressão, a depender do bloqueio realizado. A concentração de P4 diminuiu com o bloqueio de PI3K (P=0.0026; r=0.8671) (Figura 9A), MAPK14 (P=0.0009; r=0.9072) (Figura 9B) e MAP2K1 (P=0.0407; r=0.6493) (Figura 9C), enquanto que a concentração do E2 apresentou diminuição de sua expressão nos bloqueios com PI3K (P=0.0008; r=0.9676) (Figura 9D) e MAPK14

(P=<0.0001; r=0.9902) (Figura 9E), não houve diferença de expressão com o bloqueio de MAP2K1 (P=0.0704; r=0.4639) (Figura 9F).

Figura 9 – Concentração de progesterona e estradiol em meio de cultivo de células luteínicas caninas com adição de insulina e bloqueio das vias PI3K, MAPK14 e MAP2K1 por 1 hora. (A) Concentração de Progesterona (ng/ml); controle com insulina e tratamento com insulina + bloqueio de PI3K. (B) Concentração de Progesterona (ng/ml); controle com insulina e tratamento com insulina + bloqueio de MAPK14. (C) Concentração de Progesterona (ng/ml); controle com insulina e tratamento com insulina + bloqueio de MAP2K1. (D) Concentração de Estradiol (pg/ml); controle com insulina e tratamento com insulina + bloqueio de PI3K. (E) Concentração de Estradiol (pg/ml); controle com insulina e tratamento com insulina + bloqueio de MAPK14. (F) Concentração de Estradiol (pg/ml); controle com insulina e tratamento com insulina + bloqueio de MAP2K1.

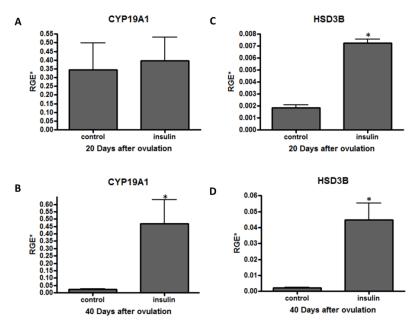


Fonte: (SILVA, RS 2017).

4.8 EFEITO DO ESTÍMULO INSULÍNICO NA EXPRESSÃO *CYP19A1* E *HSD3B* EM CÉLULAS LUTEÍNICAS CANINAS

A expressão dos genes diferencialmente expressos *CYP19A1* e *HSD3B* apresenta diferença após estímulo insulínico em cultivo celular, em células do dia 20 (com aumento plasmático de P4) e 40 (aumento plasmático de E2). A expressão de *CYP19A1* não apresentou diferença de sua expressão no dia 20 (P=0.0682; r=0.5745) (Figura 10A), diferentemente do dia 40 (P= <0.0001; r=0.9655) que apresentou aumento de sua expressão em relação ao controle (Figura 10B). Em relação à expressão de *HSD3B*, houve aumento de sua expressão no dia 20 (P=<0.0001; r=1.0) (Figura 10C) e 40 (P=0.0042; r=0.7134) em relação ao grupo controle (Figura 10C).

Figura 10 – Expressão gênica de CYP19A1 no dia 20 (A) e 40 (B), e expressão gênica de HSD3B do dia 20 (C) e 40 (D), no CL canino durante o diestro em cultivo celular com estímulo insulínico. Dados apresentam as médias ± desvio padrão da expressão relativa dos genes (n = 4). * indica diferença estatística entre os grupos (P < 0,05).



Fonte: (SILVA, RS, 2017).

5 DISCUSSÃO

Esta pesquisa traz um estudo inédito sobre o transcriptoma do CL de cadelas, assim como as inter-relações moleculares entre a via insulínica e a esteroidogênese. Baseado nos genes diferencialmente expressos detectados através da análise de RNA-seq, este estudo sugere que exista uma interação específica entre a via insulínica e a esteroidogênese ao longo do diestro de cadelas. Além disso, foi demonstrado que o estímulo insulínico pode modular a expressão de enzimas esteroidogênicas e a produção hormonal em células luteínicas.

A análise entre os resultados RNA-Seq e qPCR apresentou alta correlação para os genes *CYP19A1*, *HSD3B*, *IRS1*, *MAPK13*, *MAPK14*, *PI3KCG*, *SOCS1*, mostrando que RNA-Seq torna-se uma ferramenta eficiente para encontrar genes diferencialmente expressos, como já demonstrado por outros pesquisadores (NAGALAKSHMI et al., 2008; SAMBORSKI et al., 2013; MARTÍNEZ-LÓPEZ; OCHOA-ALEJO; MARTÍNEZ, 2014). Apesar de recente, quando falamos de estudos relacionados à reprodução animal, a análise dos transcriptomas, utilizando ferramentas de nova geração, já é descrita em diferentes órgãos reprodutivos, como em folículo ovariano de ovinos e mulheres (BONNET *et al.*, 2013;

YERUSHALMI *et al.*, 2014) e em tecido ovariano de primatas, bovinos e caprinos (BABBITT *et al.*, 2012; CÁNOVAS *et al.*, 2014; LAN *et al.*, 2014; LING *et al.*, 2014). A avaliação do transcriptoma é um passo fundamental para a compreensão do complexo processo de formação de tecido, especialmente quando genes pouco expressos estão envolvidos, mesmo que apresente baixa correlação na comparação de algum gene validado pelo PCR com o RNA-Seq, como visto no caso dos genes *MAPK9* e *PI3KR3* (NAGALAKSHMI et al., 2008).

O gene *IRS1* ativa a via PI3K para a captação de glicose e a via MAPK para a diferenciação celular (PESSIN; SALTIEL, 2000). Como os genes *PI3KCG* e *PI3KR3* apresentam diminuição da sua expressão durante o diestro, é esperado que ocorra diminuição captação de glicose principalmente na fase de regressão do CL.

No CL canino a análise do transcriptoma mostra que a expressão de *IRS1* é maior na segunda metade do diestro, indo de encontro com a diminuição das enzimas esteroidogênicas *HSD3B* que apresenta queda na sua expressão a partir do dia 40, como visto nas correlações tanto gênicas, como proteica. Tal ação sugere um feedback negativo desempenhado pelo *IRS1*, dando indícios da interação entre estas vias. O *IRS1* apresenta a função de regulador negativo das enzimas esteroidogenicas após sua fosforilação e ativação da *PI3K* (PORETSKY et al., 1999). A modulação da esteroidogênese via IRS1 ocorre com a associação com a PI3K, através da interação com os sítios de ligação YMXM/YXXM e SH2, onde, quando ocorre a ativação desta associação, induz a esteroidogênese, tal efeito foi descrito em folículos ovarianos de carpas por Mukherjee e colaboradores (MUKHERJEE et al., 2017).

Porém, indiretamente, diferentes genes modulam a expressão de *IRS1* interferindo diretamente em suas ações. Uma correlação negativa entre a expressão de *SOCS1* e a expressão de *IRS1* foi evidenciada no CL canino em nossos experimentos, demonstrando fortemente a importância da modulação de *IRS1* por *SOCS* e como consequência a modulação da sinalização insulínica. SOCS1 têm sido extensivamente estudado, no contexto da ação da insulina, demonstrando-se principalmente que seus membros são capazes de inibir a via de sinalização da insulina através da inibição da fosforilação do *IRS1*, devido à competição no local de encaixe sobre o receptor de insulina (LEBRUN; VAN OBBERGHEN, 2008). Neste contexto, apesar da clara correlação entre o *IRS1* e a enzima *HSD3B*, fica evidente que tal ação só poderia ser estabelecida uma vez que a interação *IRS1-SOCS1* ocorra simultaneamente, demonstrando assim a complexidade deste processo.

Ainda em relação à importância de *SOCS1* na interação com a sinalização insulínica, este gene apresenta um forte impacto na modulação do *INSR* (GALIC, 2014), causando sua

fosforilação via inibição de JAKs (KAWAZOE et al., 2001); no CL canino o *INSR* apresenta expressão gênica e proteica durante todo o diestro, como visto em trabalho recente (SOUSA et al., 2016). Adicionalmente, SOCS1 é descrito ainda como regulador de IGF1 (ZONG et al., 2000), gene este que nos resultados de RNA-seq apresenta-se também diferencialmente expresso.

O estímulo insulínico no cultivo celular demonstrou a capacidade direta de modulação não apenas sobre a produção de P4 e E2, como também dos genes CYP19A1 e HSD3B, que sofreram aumento da expressão relativa em relação ao controle. Em geral, os efeitos desse hormônio nas células ovarianas de mamíferos são positivos, estimulando a proliferação das células da granulosa, do CL, a atividade da aromatase e a produção de esteroides, além de ser um fator regulador da maturação oocitária (DULEBA et al., 1997). Esta interação demonstrada no CL canino esta em concordância com resultados semelhantes na literatura, que descreve, a expressão relativa dos genes HSD3B e CYP19A1 maior em todos os folículos cultivados com elevada concentração de insulina, além de apresentar níveis elevados de E2 (FERREIRA et al., 2016), semelhante ao encontrado em estudos em células ovarianas de caprinos que evidenciaram o mesmo comportamento (CHAVES et al., 2011). Itoh e colaboradores (ITOH et al., 2002) relataram que só a presença de concentrações de insulina promove a produção de E2 nos folículos de bovinos, assim como em folículos de caprinos (FERREIRA et al., 2016) e carpas (PAUL et al., 2013). Adicionalmente, uma vez que no dia 40 a expressão de HSD3B encontra-se diminuída, em comparação à primeira metade do diestro, após estímulo insulínico sua expressão aumenta de maneira significativa, o que sugere modulação positiva direta. Tal comportamento sugere co-dependência entre estas vias e como consequência uma importância substancial da insulina na modulação de enzimas chaves para a esteroidogênese. Apesar da interação direta entre a insulina e esteroidogênese ter sido evidenciada nestes experimentos, um passo crucial para definir como este processo acontece, foi o bloqueio de pontos específicos para melhor caracterização funcional desta ação.

O bloqueio de vias específicas da sinalização insulínica mostra que essa interação possa ocorrer principalmente pela via PI3K e MAPK, uma vez que o bloqueio destes elementos causou a diminuição evidente da produção de P4 e E2.

A PI3K, já é descrita por sua interação com o E2 via fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PtdIns (3,4,5) P3) e 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK(PDPK1)) que ativa AKT (SCHEID; WOODGETT, 2003). Em estudo semelhante ao descrito em nosso trabalho, em ovários de carpas, diferentes concentrações do bloqueador para PI3K, LY294002, foram utilizadas com posterior adição de insulina, e os resultados demonstraram a diminuição da

produção de esteroides *in vitro* (PAUL et al., 2013). Estes resultados corroboram com a ideia de que esta ligação *PI3K* regule a esteroidogênese, e sugerimos ainda que esta interação ocorra principalmente com a modulação das enzimas *CYP19A1* e *HSD3B*, uma vez que *CYP19A1* apresentou correlação direta com o gene e proteína *PI3KCG* e ainda com o gene *PI3KR3*, e *HSD3B* apresentou correlação com o gene *PI3KR3* e a proteína *PI3KCG* durante o diestro canino. Em adição, estudos sugerem que o aumento da esteroidogênese mediada pela insulina é dependente da ativação da via PI3K: foi demonstrado que a falha no inibidor específico de *PI3K* estingue o efeito estimulador da insulina na produção de P4 em culturas de células da granulosa de humanos (DUPONT; SCARAMUZZI, 2016) diferente do que ocorre quando há a indução de insulina com ativação da PI3K em folículos ovarianos de carpas, onde foi demonstrado o aumento da produção de E2 (PAUL et al., 2013).

O bloqueio de MAPK, no CL de diferentes espécies *in vitro* e *in vivo*, indica que as MAPK podem participar da regulação estrutural e funcional do CL (MAIZELS et al., 2001; DEWI; ABAYASEKARA; WHEELER-JONES, 2002). O bloqueio da MAP2K1 e MAPK14 em cultivo celular demonstra com mais clareza que a depender da isoforma expressa no CL canino, sua interação na modulação da produção de esteroides pode ocorrer de maneira distinta, uma vez que apenas o bloqueio de MAPK14 apresentou efeito na diminuição da produção tanto de P4 quanto de E2, o que não ocorreu com o bloqueio de MAP2K1 em relação à produção de E2.

Nossos dados demonstram que a expressão proteica de *CYP19A1* encontra-se positivamente correlação com MAPK9, e em contrapartida, a proteína *HSD3B* apresenta correlação negativa com MAPK13 e MAPK14. Em relação ao perfil hormonal E2 e P4 apresentaram correlação com a MAPK13 e a P4 ainda apresenta correlação com a MAPK14. Diferentes ensaios sugerem a sinergia destas duas vias, como por exemplo, estudos da síntese de P4 em células luteínas, células da granulosa e células da teca, demonstram que a ativação dependente de MAPK pela insulina/LH aumenta a produção de P4 (DEWI; ABAYASEKARA; WHEELER-JONES, 2002; TAJIMA et al., 2003), assim como em cultura de células da teca, na qual o aumento da sinalização da MAPK leva à inibição da produção de esteroides e diminui a atividade da *CYP19A1* e de outras enzimas. Sabe-se ainda que a ativação de genes específicos interfere na regulação das enzimas produtoras de esteroides pela ativação da via Ras-Raf-Mek-Erk (PORETSKY et al., 1999), principalmente pela ativação da MAPKp38 (SETO-YOUNG et al., 2011). Diante deste cenário, acreditamos que a depender da expressão da isoforma diferencialmente expressa das MAPK, sua função do CL canino é capaz de modular positivamente ou negativamente as enzimas *CYP19A1* e *HSD3B*, assim

como o perfil plasmático de P4 e E2 ao longo do diestro, e que o bloqueio ou deficiência, principalmente da MAPK14, mesmo com o estímulo insulínico, afeta diretamente a função luteínica.

Em modelo representativo da interação da sinalização insulínica em folículos ovarianos de peixes, sugere-se que as vias de transdução de sinal da insulina com a esteroidogênese envolva a ativação do IRS1, seguida da fosforilação da PI3K e ativação da AKT, com fosforilação da MAPK com a propagação de sinal extracelular levando o aumento da produção de esteroides (MUKHERJEE et al., 2017). Baseado em conjunto nos dados aqui apresentados, acreditamos que tal interação possa ocorrer de forma semelhante no CL canino, e que a falha em alguns destes mecanismos, principalmente a inibição da MAPK ou da PI3K, possa estabelecer um efeito direto na produção de esteroides.

Apesar de diferentes genes relacionados à sinalização insulínica serem descritos na literatura como envolvidos com a modulação da esteroidogênese, muitos deles ainda não tiveram seu papel caracterizado, porém, apresentam grande relação com a manutenção e atividade desenvolvida pelo CL.

Em trabalho anterior de nosso grupo, vimos que após estimulação com insulina, as células luteínicas caninas foram capazes de aumentar a captação de glicose, como comprovado pela fosforilação da Akt, e pelo aumento de expressão de GLUT4 (SOUSA et al., 2016). Agora, pela primeira vez vimos que, a expressão gênica e proteica dos elementos ligados à via secundária de captação de glicose ocorre em todos os dias pesquisados, relacionados mais fortemente aos períodos onde há grande necessidade de glicose para a manutenção do CL (PAPA, et al., 2014). Supõe-se que, assim, tanto a via da PI3K quanto a via CAP-CrKII-RHOQ-RAP tem papel fundamental na sinalização insulínica para que haja o transporte de todo o GLUT4 para a membrana, assim como visto anteriormente em células de adipócitos 3T3L1 (CHIANG et al., 2001), a fim de conseguir translocar toda a glicose necessária para manter a homeostase do CL.

Corroborando com nossos resultados, pesquisas demonstram a importância desta via secundária na captação de glicose. A PI3K, sozinha, parece não ser suficiente para a captação de glicose, visto que, o bloqueio da fosforilação de Cbl inibe completamente a estimulação da translocação de GLUT4 pela insulina (BAUMANN et al., 2000). Assim, a ativação desta via funcionaria em paralelo a PI3K para estimular a translocação total de GLUT4 (CHIANG et al., 2001).

A expressão gênica e proteica de *IRS1*, associada à de *INSR* (SOUSA et al., 2016), pode ainda ativar mediadores de baixo peso molecular como o inositol phosphoglycan (IPG)

(NESTLER, 1998; PORETSKY et al., 1999), uma vez que derivados deste inositol têm sido relatados para ajudar a ação da insulina, estimulando a captação de glicose pela translocação de GLUT4 (DANG et al., 2010), como visto em células do músculo esquelético de camundongos (YAP et al., 2007), Deste modo, a sinergia entre a ativação da PI3K e a via CAP-CrKII-RHOQ-RAP, como vista em trabalhos anteriores (CHIANG et al., 2001), e provavelmente com a ativação das IPGs (DANG et al., 2010; YAP et al., 2007), torna-se essencial para a manutenção e atividade desempenhadas pelo CL, a fim de conseguir translocar GLUT4 e captar toda a glicose necessária para manter a homeostase deste órgão. Porém, esta via não apresenta ligação alguma com a interação da insulina com a esteroidogênese de forma direta, o que não exime sua importância na funcionalidade e atividade exercida durante o diestro canino.

6 CONCLUSÕES

Com base nos dados aqui relatados podemos concluir que:

- O estímulo insulínico em células luteínicas caninas é capaz de modular a expressão das enzimas esteroidogênicas e a produção de esteroides.
- O bloqueio prévio de pontos específicos da via de sinalização insulínica, mesmo sob estímulo insulínico, diminui a produção de esteroides de forma dependente na primeira metade do diestro canino.
- Tanto a via da PI3K, quanto a via CAP-CrKII-RHOQ-RAP, devem contribuir significativamente no papel fundamental na sinalização insulínica para que haja a captação de glicose para manter a homeostase do CL, porém, a via secundária não apresenta ligação específica com a esteroidogênese.
- As correlações que se estabeleceram entre os genes, proteínas da cascata de sinalização insulínica, as enzimas esteroidogênicas e ainda os perfis plasmáticos de insulina, P4 e E2 estudos indicam que a regulação da função do CL canino possa também ser atribuída à insulina.

REFERÊNCIAS

- ACCILI, D. Receptor tyrosine kinases. In: Leskiw SM, ed. MCR Syllabus 2001: Introduction to molecular and cellular research: secondary title: **Endocrine Society**, 2001.
- ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ØRNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Res**, v. 64, n. 15, p. 5245-5250, 2004.
- BABBITT, C. C.; TUNG, J.; WRAY, G. A.; ALBERTS, S. C. Changes in gene expression associated with reproductive maturation in wild female baboons. **Genome Biol Evol**, v. 4, n. 2, p. 102-109, 2012.
- BAUMANN, C. A.; RIBON, V.; KANZAKI, M.; THURMOND, D. C.; MORA, S.; SHIGEMATSU, S.; BICKEL, P. E.; PESSIN, J. E.; SALTIEL, A. R. CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 202-207, 2000.
- BEHL, R.; KAUL, R. Insulin like growth factor 1 and regulation of ovarian function in mammals. **Indian J Exp Biol**, v. 40, n. 1, p. 25-30, 2002.
- BHATIA, B.; PRICE, C. A. Insulin alters the effects of follicle stimulating hormone on aromatase in bovine granulosa cells in vitro. **Steroids**, v. 66, n. 6, p. 511-519, 2001.
- BONFIM NETO, A. P. O papel do 17β-estradiol no processo luteolítico de cadelas não prenhes Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2014. 52 p.
- BONNET, A.; CABAU, C.; BOUCHEZ, O.; SARRY, J.; MARSAUD, N.; FOISSAC, S.; WOLOSZYN, F.; MULSANT, P.; MANDON-PEPIN, B. An overview of gene expression dynamics during early ovarian folliculogenesis: specificity of follicular compartments and bidirectional dialog. **BMC Genomics**, v. 14, p. 904, 2013.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, n., p. 248-254, 1976.
- BUTLER, S. T.; PELTON, S. H.; BUTLER, W. R. Insulin increases 17 beta-estradiol production by the dominant follicle of the first postpartum follicle wave in dairy cows. **Reproduction**, v. 127, n. 5, p. 537-545, 2004.
- CÁNOVAS, A.; REVERTER, A.; DEATLEY, K. L.; ASHLEY, R. L.; COLGRAVE, M. L.; FORTES, M. R.; ISLAS-TREJO, A.; LEHNERT, S.; PORTO-NETO, L.; RINCÓN, G.; SILVER, G. A.; SNELLING, W. M.; MEDRANO, J. F.; THOMAS, M. G. Multi-tissue omics analyses reveal molecular regulatory networks for puberty in composite beef cattle. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e102551, 2014.
- CHAVES, R. N.; ALVES, A. M.; FAUSTINO, L. R.; OLIVEIRA, K. P.; CAMPELLO, C. C.; LOPES, C. A.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. How the concentration of insulin affects the development of preantral follicles in goats. **Cell Tissue Res**, v. 346, n. 3, p. 451-456, 2011.

- CHEANG, K. I.; ESSAH, P.; NESTLER, J. E. A Paradox: the roles of inositolphosphoglycans in mediating insulin sensitivity and hyperandrogenism in the polycystic ovary syndrome. **Hormones (Athens)**, v. 3, n. 4, p. 244-251, 2004.
- CHIANG, S. H.; BAUMANN, C. A.; KANZAKI, M.; THURMOND, D. C.; WATSON, R. T.; NEUDAUER, C. L.; MACARA, I. G.; PESSIN, J. E.; SALTIEL, A. R. Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. **Nature**, v. 410, n. 6831, p. 944-948, 2001.
- CONCANNON, P. Effects of hypophysectomy and of LH administration on luteal phase plasma progesterone levels in the beagle bitch. **J Reprod Fertil**, v. 58, n. 2, p. 407-410, 1980.
- CONCANNON, P. W.; MCCANN, J. P.; TEMPLE, M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. **J Reprod Fertil Suppl**, v. 39, n., p. 3-25, 1989.
- CONCANNON, P. W. Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. **J Reprod Fertil Suppl**, v. 47, n., p. 3-27, 1993.
- CONCANNON, P. W. Endocrinologic control of normal canine ovarian function. **Reprod Domest Anim**, v. 44 Suppl 2, n., p. 3-15, 2009.
- CONCANNON, P. W. Reproductive cycles of the domestic bitch. **Anim Reprod Sci**, v. 124, n. 3-4, p. 200-210, 2011.
- DANG, N. T.; MUKAI, R.; YOSHIDA, K.; ASHIDA, H. d-Pinitol and myo-Inositol stimulate translocation og glucose transporter 4 in skeletal muscle of C57BL/6 mice. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v. 75, n. 5. P. 1062-1067, 2010.
- DENG, D.; YAN, N. GLUT, SGLT, and SWEET: Structural and mechanistic investigations of the glucose transporters. **Protein Sci**, v. 25, n. 3, p. 546-558, 2016.
- DEVOTO, L.; CHRISTENSON, L. K.; MCALLISTER, J. M.; MAKRIGIANNAKIS, A.; STRAUSS, J. F. Insulin and insulin-like growth factor-I and -II modulate human granulosalutein cell steroidogenesis: enhancement of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) expression. **Mol Hum Reprod**, v. 5, n. 11, p. 1003-1010, 1999.
- DEWI, D. A.; ABAYASEKARA, D. R.; WHEELER-JONES, C. P. Requirement for ERK1/2 activation in the regulation of progesterone production in human granulosa-lutein cells is stimulus specific. **Endocrinology**, v. 143, n. 3, p. 877-888, 2002.
- DOMINICI, F. P.; ARGENTINO, D. P.; MUÑOZ, M. C.; MIQUET, J. G.; SOTELO, A. I.; TURYN, D. Influence of the crosstalk between growth hormone and insulin signalling on the modulation of insulin sensitivity. **Growth Horm IGF Res**, v. 15, n. 5, p. 324-336, 2005.
- DULEBA, A. J.; SPACZYNSKI, R. Z.; OLIVE, D. L.; BEHRMAN, H. R. Effects of insulin and insulin-like growth factors on proliferation of rat ovarian theca-interstitial cells. **Biol Reprod**, v. 56, n. 4, p. 891-897, 1997.
- DUPONT, J.; SCARAMUZZI, R. J. Insulin signalling and glucose transport in the ovary and ovarian function during the ovarian cycle. **Biochem J**, v. 473, n. 11, p. 1483-1501, 2016.

- ENGEL, E.; KLEIN, R.; BAUMGÄRTNER, W.; HOFFMANN, B. Investigations on the expression of cytokines in the canine corpus luteum in relation to dioestrus. **Anim Reprod Sci**, v. 87, n. 1-2, p. 163-176, 2005.
- ENGELMAN, J. A.; LUO, J.; CANTLEY, L. C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. **Nat Rev Genet**, v. 7, n. 8, p. 606-619, 2006.
- FAN, H. Y.; LIU, Z.; SHIMADA, M.; STERNECK, E.; JOHNSON, P. F.; HEDRICK, S. M.; RICHARDS, J. S. MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. **Science**, v. 324, n. 5929, p. 938-941, 2009.
- FERNANDES, P. A.; BOWEN, R. A.; KOSTAS, A. C.; SAWYER, H. R.; NETT, T. M.; OLSON, P. N. Luteal function in the bitch: changes during diestrus in pituitary concentration of and the number of luteal receptors for luteinizing hormone and prolactin. **Biol Reprod**, v. 37, n. 4, p. 804-811, 1987.
- FERREIRA, A. C.; MASIDE, C.; SÁ, N. A.; GUERREIRO, D. D.; CORREIA, H. H.; LEIVA-REVILLA, J.; LOBO, C. H.; ARAÚJO, V. R.; APGAR, G. A.; BRANDÃO, F. Z.; FIGUEIREDO, J. R.; CAMPELLO, C. C. Balance of insulin and FSH concentrations improves the in vitro development of isolated goat preantral follicles in medium containing GH. **Anim Reprod Sci**, v. 165, n., p. 1-10, 2016.
- FRANÇA, M. R.; MESQUITA, F. S.; LOPES, E.; PUGLIESI, G.; VAN HOECK, V.; CHIARATTI, M. R.; MEMBRIVE, C. B.; PAPA, P. C.; BINELLI, M. Modulation of periovulatory endocrine profiles in beef cows: consequences for endometrial glucose transporters and uterine fluid glucose levels. **Domest Anim Endocrinol**, v. 50, n., p. 83-90, 2015.
- GALIC, S.; SACHITHANANDAN, N.; KAY, T.; STEINBEG, G. R. Suppressor of cytokine signalling (SOCS) proteins as guardians of inflammatory responses critical for regulating insulin sensitivity. **Biochem. J**. v. 461, p. 177–188, 2014.
- GONG, J. G.; LEE, W. J.; GARNSWORTHY, P. C.; WEBB, R. Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows. **Reproduction**, v. 123, n. 3, p. 419-427, 2002.
- GRAM, A.; HOFFMANN, B.; BOOS, A.; KOWALEWSKI, M. P. Expression and localization of vascular endothelial growth factor A (VEGFA) and its two receptors (VEGFR1/FLT1 and VEGFR2/FLK1/KDR) in the canine corpus luteum and utero-placental compartments during pregnancy and at normal and induced parturition. **Gen Comp Endocrinol**, v. 223, n., p. 54-65, 2015.
- HEMMINGS, B. A.; RESTUCCIA, D. F. The PI3K-PKB/Akt pathway. Cold Spring Harb Perspect Biol, v. 7, n. 4, p., 2015.
- HOFFMANN, B.; RIESENBECK, A.; KLEIN, R. Reproductive endocrinology of bitches.: secondary title: **Animal Reproduction Science**, 1996. 42, 275-288 p.
- HOFFMANN, B.; BÜSGES, F.; BAUMGÄRTNER, W. Immunohistochemical detection of CD4-, CD8- and MHC II-expressing immune cells and endoglin in the canine corpus luteum at different stages of dioestrus. **Reprod Domest Anim**, v. 39, n. 6, p. 391-395, 2004.

- HOFFMANN, B.; BÜSGES, F.; ENGEL, E.; KOWALEWSKI, M. P.; PAPA, P. Regulation of corpus luteum-function in the bitch. **Reprod Domest Anim**, v. 39, n. 4, p. 232-240, 2004.
- ITOH, T.; KACCHI, M.; ABE, H.; SENDAI, Y.; HOSHI, H. Growth, antrum formation, and estradiol production of bovine preantral follicles cultured in a serum-free medium. **Biol Reprod**, v. 67, n. 4, p. 1099-1105, 2002.
- KAWAZOE, Y. N.; NAKA, T. F.; KOHZAKI, H.; MORITA, Y.; NARAZARI, M.; SAITOH, H.; NAKAGAWA, R.; UCHIYAMA, S. Signal transducer and activator of transcription (STAT)-induced STAT inhibitor 1 (SSI-1)/suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) inhibits insulin signal transduction pathway through modulating insulin receptor substrate 1 (IRS-1) phosphorylation. **J. Exp. Med.** v. 193, p. 263–269, 2001.
- KIM, S. Y.; EBBERT, K.; CORDEIRO, M. H.; ROMERO, M.; ZHU, J.; SERNA, V. A.; WHELAN, K. A.; WOODRUFF, T. K.; KURITA, T. Cell autonomous phosphoinositide 3-kinase activation in oocytes disrupts normal ovarian function through promoting survival and overgrowth of ovarian follicles. **Endocrinology**, v. 156, n. 4, p. 1464-1476, 2015.
- KOWALEWSKI, M.; SCHULER, G.; TAUBERT, A.; ENGEL, E.; HOFFMANN, B. Expression of cyclooxygenase 1 and 2 in the canine corpus luteum during diestrus. **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7, p. 1423-1430, 2006.
- KOWALEWSKI, M. P.; SCHULER, G.; TAUBERT, A.; ENGEL, E.; HOFFMANN, B. Expression of cyclooxygenase 1 and 2 in the canine corpus luteum during diestrus. **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7, p. 1423-1430, 2006.
- KOWALEWSKI, M. P.; MUTEMBEI, H. M.; HOFFMANN, B. Canine prostaglandin E2 synthase (PGES) and its receptors (EP2 and EP4): expression in the corpus luteum during dioestrus. **Anim Reprod Sci**, v. 109, n. 1-4, p. 319-329, 2008.
- KOWALEWSKI, M. P.; HOFFMANN, B. Molecular cloning and expression of StAR protein in the canine corpus luteum during dioestrus. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 116, n. 3, p. 158-161, 2008.
- KOWALEWSKI, M. P.; MICHEL, E.; GRAM, A.; BOOS, A.; GUSCETTI, F.; HOFFMANN, B.; ASLAN, S.; REICHLER, I. Luteal and placental function in the bitch: spatio-temporal changes in prolactin receptor (PRLr) expression at dioestrus, pregnancy and normal and induced parturition. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 9, n., p. 109, 2011.
- KOWALEWSKI, M. P. Luteal regression vs. prepartum luteolysis: regulatory mechanisms governing canine corpus luteum function. **Reprod Biol**, v. 14, n. 2, p. 89-102, 2014.
- LAN, D.; XIONG, X.; WEI, Y.; XU, T.; ZHONG, J.; ZHI, X.; WANG, Y.; LI, J. RNA-Seq analysis of yak ovary: improving yak gene structure information and mining reproduction-related genes. **Sci China Life Sci**, v. 57, n. 9, p. 925-935, 2014.
- LEBRUN, P.; VAN OBBERGHEN, E. SOCS proteins causing trouble in insulin action. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 192, n. 1, p. 29-36, 2008.

- LEMLEY, C. O.; BUTLER, S. T.; BUTLER, W. R.; WILSON, M. E. Short communication: insulin alters hepatic progesterone catabolic enzymes cytochrome P450 2C and 3A in dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 91, n. 2, p. 641-645, 2008.
- LING, Y. H.; XIANG, H.; LI, Y. S.; LIU, Y.; ZHANG, Y. H.; ZHANG, Z. J.; DING, J. P.; ZHANG, X. R. Exploring differentially expressed genes in the ovaries of uniparous and multiparous goats using the RNA-Seq (Quantification) method. **Gene**, v. 15, n. 1, p. 148-153, 2014.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods, v.25, n.4, p.402-408, 2001.
- LONERGAN, P.; FORDE, N. The Role of Progesterone in Maternal Recognition of Pregnancy in Domestic Ruminants. **Adv Anat Embryol Cell Biol**, v. 216, n., p. 87-104, 2015.
- LOTT, J. A.; TURNER, K. Evaluation of Trinder's glucose oxidase method for measuring glucose in serum and urine. **Clin Chem**, v. 21, n. 12, p. 1754-1760, 1975.
- LUZ, M.; CESÁRIO, M.; BINELLI, M.; LOPES, M. Canine corpus luteum regression: apoptosis and caspase-3 activity. **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7, p. 1448-1453, 2006.
- MAIZELS, E. T.; MUKHERJEE, A.; SITHANANDAM, G.; PETERS, C. A.; COTTOM, J.; MAYO, K. E.; HUNZICKER-DUNN, M. Developmental regulation of mitogen-activated protein kinase-activated kinases-2 and -3 (MAPKAPK-2/-3) in vivo during corpus luteum formation in the rat. **Mol Endocrinol**, v. 15, n. 5, p. 716-733, 2001.
- MAO, J.; TREACY, B. K.; ALMEIDA, F. R.; NOVAK, S.; DIXON, W. T.; FOXCROFT, G. R. Feed restriction and insulin treatment affect subsequent luteal function in the immediate postovulatory period in pigs: progesterone production in vitro and messenger ribonucleic acid expression for key steroidogenic enzymes. **Biol Reprod**, v. 64, n. 1, p. 359-367, 2001.
- MARIANI, T. C.; DO PRADO, C.; SILVA, L. G.; PAARMANN, F. A.; LIMA, M. C.; CARVALHO, I.; CAMPOS, D. B.; ARTONI, L. P.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; PAPA, P. C. Immunohistochemical localization of VEGF and its receptors in the corpus luteum of the bitch during diestrus and anestrus. **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7, p. 1715-1720, 2006.
- MARTÍNEZ-LÓPEZ, L. A.; OCHOA-ALEJO, N.; MARTÍNEZ, O. Dynamics of the chili pepper transcriptome during fruit development. **BMC Genomics**, v. 15, n., p. 143, 2014.
- MUKHERJEE, D.; MAJUMDER, S.; ROY MOULIK, S.; PAL, P.; GUPTA, S.; GUHA, P.; KUMAR, D. Membrane receptor cross talk in gonadotropin-, IGF-I-, and insulin-mediated steroidogenesis in fish ovary: An overview. **Gen Comp Endocrinol**, v. 240, n., p. 10-18, 2017.
- NAGALAKSHMI, U.; WANG, Z.; WAERN, K.; SHOU, C.; RAHA, D.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. **Science**, v. 320, n. 5881, p. 1344-1349, 2008.
- NESTLER, J. E. Inositolphosphoglycans (IPGs) as mediators of insulin's steroidogenic actions. **J Basic Clin Physiol Pharmacol**, v. 9, n. 2-4, p. 197-204, 1998.

- NISHIMOTO, H.; MATSUTANI, R.; YAMAMOTO, S.; TAKAHASHI, T.; HAYASHI, K. G.; MIYAMOTO, A.; HAMANO, S.; TETSUKA, M. Gene expression of glucose transporter (GLUT) 1, 3 and 4 in bovine follicle and corpus luteum. **J Endocrinol**, v. 188, n. 1, p. 111-119, 2006.
- OKKENS, A. C.; DIELEMAN, S. J.; BEVERS, M. M.; LUBBERINK, A. A.; WILLEMSE, A. H. Influence of hypophysectomy on the lifespan of the corpus luteum in the cyclic dog. **J Reprod Fertil**, v. 77, n. 1, p. 187-192, 1986.
- ONCLIN, K.; VERSTEGEN, J. P. In vivo investigation of luteal function in dogs: effects of cabergoline, a dopamine agonist, and prolactin on progesterone secretion during midpregnancy and -diestrus. **Domest Anim Endocrinol**, v. 14, n. 1, p. 25-38, 1997.
- ONCLIN, K.; VERSTEGEN, J. P.; CONCANNON, P. W. Time-related changes in canine luteal regulation: in vivo effects of LH on progesterone and prolactin during pregnancy. **J Reprod Fertil**, v. 118, n. 2, p. 417-424, 2000.
- PAPA, P. C.; HOFFMANN, B. The corpus luteum of the dog: source and target of steroid hormones? **Reprod Domest Anim**, v. 46, n. 4, p. 750-756, 2011.
- PAPA, P. E. C.; SOUSA, L. M.; SILVA, R. O. S.; DE FÁTIMA, L. A.; DA FONSECA, V. U.; DO AMARAL, V. C.; HOFFMANN, B.; ALVES-WAGNER, A. B.; MACHADO, U. F.; KOWALEWSKI, M. P. Glucose transporter 1 expression accompanies hypoxia sensing in the cyclic canine corpus luteum. **Reproduction**, v. 147, n. 1, p. 81-89, 2014.
- PAUL, S.; PRAMANICK, K.; KUNDU, S.; KUMAR, D.; MUKHERJEE, D. Regulation of ovarian steroidogenesis in vitro by IGF-I and insulin in common carp, Cyprinus carpio: stimulation of aromatase activity and P450arom gene expression. **Mol Cell Endocrinol**, v. 315, n. 1-2, p. 95-103, 2010.
- PAUL, S.; PRAMANICK, K.; KUNDU, S.; ROY MOULIK, S.; PAL, P.; MUKHERJEE, D. Involvement of PI3 kinase and MAP kinase in IGF-I and insulin-induced ovarian steroidogenesis in common carp Cyprinus carpio. **Gen Comp Endocrinol**, v. 181, n., p. 98-106, 2013.
- PESSIN, J. E.; SALTIEL, A. R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 106, n. 2, p. 165-169, 2000.
- PIROLA, L.; JOHNSTON, A. M.; VAN OBBERGHEN, E. Modulation of insulin action. **Diabetologia**, v. 47, n. 2, p. 170-184, 2004.
- PORETSKY, L.; CATALDO, N. A.; ROSENWAKS, Z.; GIUDICE, L. C. The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. **Endocr Rev**, v. 20, n. 4, p. 535-582, 1999.
- RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPREZ, R. H.; MOORMAN, A. F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neurosci Lett**, v. 339, n. 1, p. 62-66, 2003.
- RIBON, V.; PRINTEN, J. A.; HOFFMAN, N. G.; KAY, B. K.; SALTIEL, A. R. A novel, multifuntional c-Cbl binding protein in insulin receptor signaling in 3T3-L1 adipocytes. **Mol Cell Biol**, v. 18, n. 2, p. 872-879, 1998.

- SALE, E.; SALE, G. Protein kinase B: signalling roles and therapeutic targeting: secondary title: Cellular and Mollecular Life Sciences, 2007.
- SALTIEL, A. R. Second messengers of insulin action. **Diabetes Care**, v. 13, n. 3, p. 244-256, 1990.
- SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799-806, 2001.
- SAMBORSKI, A.; GRAF, A.; KREBS, S.; KESSLER, B.; REICHENBACH, M.; REICHENBACH, H. D.; ULBRICH, S. E.; BAUERSACHS, S. Transcriptome changes in the porcine endometrium during the preattachment phase. **Biol Reprod**, v. 89, n. 6, p. 134, 2013.
- SCARAMUZZI, R. J.; CAMPBELL, B. K.; DOWNING, J. A.; KENDALL, N. R.; KHALID, M.; MUÑOZ-GUTIÉRREZ, M.; SOMCHIT, A. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. **Reprod Nutr Dev**, v. 46, n. 4, p. 339-354, 2006.
- SCARAMUZZI, R. J.; ZOUAÏDI, N.; MENASSOL, J. B.; DUPONT, J. The effects of intravenous, glucose versus saline on ovarian follicles and their levels of some mediators of insulin signalling. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 13, n., p. 6, 2015.
- SCHEID, M. P.; WOODGETT, J. R. Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt. **FEBS Lett**, v. 546, n. 1, p. 108-112, 2003.
- SEKAR, N.; GARMEY, J. C.; VELDHUIS, J. D. Mechanisms underlying the steroidogenic synergy of insulin and luteinizing hormone in porcine granulosa cells: joint amplification of pivotal sterol-regulatory genes encoding the low-density lipoprotein (LDL) receptor, steroidogenic acute regulatory (stAR) protein and cytochrome P450 side-chain cleavage (P450scc) enzyme. **Mol Cell Endocrinol**, v. 159, n. 1-2, p. 25-35, 2000.
- SETO-YOUNG, D.; AVTANSKI, D.; VARADINOVA, M.; PARK, A.; SUWANDHI, P.; LEISER, A.; PARIKH, G.; PORETSKY, L. Differential roles of MAPK-Erk1/2 and MAPK-p38 in insulin or insulin-like growth factor-I (IGF-I) signaling pathways for progesterone production in human ovarian cells. **Horm Metab Res**, v. 43, n. 6, p. 386-390, 2011.
- SONNACK, M. Untersuchungen zur Bildung, Regression und Funktionalität des Corpus Luteum der nicht graviden Hündin, morphologische und biochemische Aspekte: secondary title. Justus-Liebig- Universität Gießen: Diss med vet, 2009.
- SOUSA, L. M.; SILVA, R.; FONSECA, V.; LEANDRO, R.; DI VINCENZO, T.; ALVES-WAGNER, A. B.; MACHADO, U. F.; PAPA, P. Is the canine corpus luteum an insulinsensitive tissue? **J Endocrinol**, v.231, n.3, p.223-233, 2016.
- STEIN, P.; BUSSMANN, L. E.; TESONE, M. In vivo regulation of the steroidogenic activity of rat luteal cells by insulin. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 52, n. 4, p. 329-335, 1995.
- STOCCO, C.; TELLERIA, C.; GIBORI, G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. **Endocr Rev**, v. 28, n. 1, p. 117-149, 2007.

STOUFFER, R. Structure, Function, and Regulation of the Corpus Luteum. In: NEILL JD.: secondary title: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, 2006. 3, 475-526 p.

SUGINO, N.; OKUDA, K. Species-related differences in the mechanism of apoptosis during structural luteolysis. **J Reprod Dev**, v. 53, n. 5, p. 977-986, 2007.

TAJIMA, K.; DANTES, A.; YAO, Z.; SOROKINA, K.; KOTSUJI, F.; SEGER, R.; AMSTERDAM, A. Down-regulation of steroidogenic response to gonadotropins in human and rat preovulatory granulosa cells involves mitogen-activated protein kinase activation and modulation of DAX-1 and steroidogenic factor-1. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, n. 5, p. 2288-2299, 2003.

TANIGUCHI, C. M.; EMANUELLI, B.; KAHN, C. R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 7, n. 2, p. 85-96, 2006.

THORENS, B.; MUECKLER, M. Glucose transporters in the 21st Century. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 298, n. 2, p. E141-145, 2010.

URBAN, R. J.; VELDHUIS, J. D. Endocrine control of steroidogenesis in granulosa cells. **Oxf Rev Reprod Biol**, v. 14, n., p. 225-262, 1992.

WHITE, M. F.; KAHN, C. R. The insulin signaling system. **J Biol Chem**, v. 269, n. 1, p. 1-4, 1994.

YAP, A., NISHIUMI, S.; YOSHIDA, K., ASHIDA, H. Rat L6 myotubes as an in vitro model system to study GLUT4-dependent glucose uptake stimulated by inositol derivatives. **Cytotechnology**. v. 55, P. 103–108, 2007.

YERUSHALMI, G. M.; SALMON-DIVON, M.; YUNG, Y.; MAMAN, E.; KEDEM, A.; OPHIR, L.; ELEMENTO, O.; COTICCHIO, G.; DAL CANTO, M.; MIGNINI RENZINU, M.; FADINI, R.; HOURVITZ, A. Characterization of the human cumulus cell transcriptome during final follicular maturation and ovulation. **Mol Hum Reprod**, v. 20, n. 8, p. 719-735, 2014.

ZONG, C. S.; CHAN, J.; LEVY, D. E,.; HORVATH, C.; SADOWKI, B.; WANG, L. H. Mecanismo f STAT3 activation by Insulin-like Growth fator I receptor. **J. Biol. Chem.** v. 275, n. 19, p. 15099–15105, 2000.

ANEXO A – Primeiro artigo submetido com os dados gerais do sequenciamento: Ana Paula Mattoso Miskulin Cardoso; <u>Renata Santos Silva</u>; Liza Sousa; Ines Giometti; Jochen Bick; Stefan Bauersachs; Paula Carvalho Papa: "GLOBAL ANALYSIS OF GENE EXPRESSION IN THE CORPUS LUTEUM OF NON-PREGNANT BITCHES" submetido na revista <u>BMC Genomics</u>.

Global gene expression of transcriptomes in corpus luteum of non-pregnant bitches

ABSTRACT

The mechanisms regulating corpus luteum (CL) function and life span in non-pregnant bitches are not completely understood, although many inputs have been added in the last 4 decades. Under these circumstances new generation high-performance sequencing technologies appear as an effective tool for studying large-scale transcriptome and scanning different molecular pathways that might be activated at the same time. In the present study, we performed RNAseq technology to compare the difference in CL mRNA expression during diestrus. The corpora lutea were submitted to RNA sequencing strategy (RNA-seq). Illumina HiScanSeq generated a total of 771.208.718 reads (approximately 42 million per sample), which showed an average lengh of 100bp. The software Cufflinks revealed that the reads corresponded to 34.408 genes, from which 9000 were not annotated to the canine genome and 29.011 showed some level of expression in at least one of the studied time points. Additionally, the analyses showed that 5116 genes were differentially expressed, although 1106 among them were not annotated yet to the canine genome. A total of 5116 genes were differentially expressed (DE), although 1106 among them were not annotated yet to the canine genome. Gene ontology (GO) and KEEG analysis showed that the plenty of genes were related to cell proliferation, cell survival and angiogenesis and the immune system regulated luteal formation and regression. This study provides mega data that could drive researches reproduction related to the regulation of CL lifespan.

2.1 INTRODUCTION

The domestic dog (*Canis lupus familiaris*) is classified as a monoestrus, i.e., non-seasonal breeder with a long period of luteal activity (diestrus) and it is known that the canine reproductive function is controlled by specific mechanisms (KOWALEWSKI, 2012). So, the corpus luteum (CL) seems to be a key gland in the regulation of the reproductive cycle in dogs (KOWALEWSKI, 2014). This gland is responsible to produce progesterone (P4) and 17β-estradiol (E2) in pregnant and non-pregnant bitches.

In contrast to other species, the duration of functional CL in dogs is almost identical in pregnant and non-pregnant animals, therefore the physiological luteal lifespan is analogous in both (KOWALEWSKI, 2014). However, the regression phase in non-pregnant is slower than in pregnant bitches. Also unlike to other species, the canine CL is independent of gonadotropic support during the first third of diestrus and luteal regression/luteolysis occurs in spite of an increased gonadotropic support.

The prostaglandin E2 (PGE2) has been proposed as one of the most important luteotrophic factors during CL formation, i.e., during the first third of diestrus and it acts in an autocrine and/or paracrine manner (KOWALEWSKI et al., 2008; KOWALEWSKI et al., 2011). During the second half of diestrus, prolactin (PRL) is the main luteotrophic factor and its role is to sustain CL function and/or slowing down luteal regression (KOWALEWSKI, 2014). But CL function suffers regulation by others factors like: components of the immune system through a set of cytokines produced by them may be involved in luteal formation and regression (HOFFMANN et al., 2004b), E2 can exert luteotrophic or luteolytic action through activation of its receptors, respectively, estrogen receptors-alfa (ER α) and estrogen receptors-beta (ER β) (BONFIM NETO, 2014) and many others, as vascular endothelial growth factor (VEGF) (MARIANI ET AL., 2006) , insulin-like growth factor (IGF) (KOWALEWSKI, 2012) and glucose transporter member 1 (SLC2A1) (PAPA et al., 2014) which are currently under discussion and / or research.

In pregnant dogs, P4 declines during prepartum luteolysis and prostaglandin $F2\alpha$ (PGF2 α) levels increases in maternal blood at the same time. These events are associated with strong apoptotic signals in those animals (KOWALEWSKI, 2014). The endogenous prostaglandin $F2\alpha$ (PGF2 α), as opposed to what occurs in pregnant bitches, does not present a crucial role in the luteal regression in non-pregnant bitches (KOWALEWSKI et al., 2006). So far, studies were not able to decipher the mechanism of action that leads to CL regression in

non-pregnant dogs. Thus, the characterization of molecular mechanism involved in the control of CL lifespan appears to be essential for a better understanding of female dog's reproductive physiology.

The use of techniques of high-performance sequencing can be an effective tool for large-scale study of transcriptome, (LAN et al., 2014). Global gene expression patterns may vary in space (within different cell types or tissues), and the time, for example, during development (MARTÍNEZ-LÓPEZ; OCHOA-ALEJO; MARTÍNEZ,2014).

The RNA sequencing (RNAseq) may identify: rare transcripts and not yet known, new splice variants, events of gene fusion and chimeras, single nucleotide polymorphisms (SNP)

and differentially expressed genes (LING et al., 2014). The primary goal of whole-transcriptome analysis is to identify, characterize, and catalog all the transcripts expressed within a specific cell or multiple tissues, either at a static given stage or across dynamic time-varying stages (OH et al., 2014).

In reproduction, data obtained using this technology already exist. The ovarian follicle transcriptome of sheep and women (BONNET et al., 2013; YERUSHALMI et al., 2014) and somerelated to ovarian tissue in primates, cattle and goats (BABBITT et al., 2012; CÁNOVAS et al., 2014; LAN et al., 2014; LING et al., 2014) have been published, but there is not data about CL development, maintenance and regression to the knowledge of the authors. Thus, we used the transcriptoma sequencing to characterize the CL function during diestrus in non-pregnant dogs since this species presents a long diestrus (about 60 days) and some particularities, which would be of interest to comparative reproduction. The aim of this study was therefore to identify genes and pathways in which they are involved, which are differentially expressed during diestrus to obtain a broader insight of CL function and control.

2.2 MATERIAL E METHODS

2.2.1 Animals and experimental design

Eighteen healthy mongrel bitches were included in this study. This study was approved by the Committee of Ethics in the Use of Animals of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil (protocol number 2719/2012). After the onset of pro-oestrous bleeding, blood samples were collected every two days to determine the progesterone (P4) concentrations. The day of ovulation was considered,

the day when P4 plasma concentrations reached 5ng/ml (CONCANNON et al., 1989). Six groups (n=3 animals per group) were established. The corpora lutea (CLs) were collected via ovariosalpingohysterectomy on days 10, 20, 30, 40, 50 and 60 post- ovulation (p.o.). After collection, the CLs were dissected from the surrounding ovarian tissue and immediately frozen in liquid nitrogen for total RNA extraction.

2.2.2 RNA extraction

Total RNA was extracted using TRIzol reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), in accordance with the manufacturer's instructions. The quantification and determination of A260/A280 ratio were determined using a Biophotometer (Eppendorf, Hamburg, Germany). Subsequently, the samples were diluted to a concentration of 150 ng/μL. Integrity of RNA was assessed by analysis in Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies).

2.2.3 cDNA library construction and RNA sequencing

All RNAseq libraries were constructed from 150 ng of RNA using Truseq RNA sample Prep (Ilumina, San Diego, CA, USA) in accordance with the manufacter's standard procedure. The quality of the produced libraries was assessed using the Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using a DNA chip 1000. Samples were considered valid when presented fragments next to 260 bp. The quantification of the individual libraries was performed using the PCR real time through the kit KAPA Library Quantification (KAPA Biosystems, Willmigton, MA, USA).

Sequencing was performed on an Ilumina HiqSeq 200 using the pair-end reads protocol and the Ilumina TruSeq PE cluster kit v3-cBotHS (Ilumina, San Diego, CA, USA), in accordance with the manufacter's instructions. In each lane, 6 samples were run sequenced and generated 10 million reads per library.

2.2.4 Data Analysis

The CASAVA 8.2 software (Ilumina, San Diego, CA, USA) was used to obtain the raw data. The reads were mapped against the reference genome (Canis familiaris. CanFam

3.1.75.dna.toplevel.fa) using TopHat v2.0.9 and the transcripts were assembled using Cufflinks. The relative abundance of transcripts of RNAseq fragments was measured by Cufflinks in FPKM (Fragments per kilobase of exon per million fragments mapped). For each gene, we compared the expression levels pairwise among groups. Cufflinks first computes the logarithm of the ratio of FPKM between the subjects within each group, so it uses delta method to estimative the variance of log ratio. The statistical method is log ratio of FPKM divided by the standard deviation of log ratio (TRAPNELL et al., 2012). A gene was considered differentially expressed if the FDR adjusted p value was < 0.05.

The differentially expressed (DE) genes detected by Cufflinks were converted in their human orthologs using the Inparanoid eukaryotic ortholog database (http://inparanoid.cgb.ki.se/) which is a collection of pairwise ortholog groups between 17 whole genomes (O'BRIEN;REMM; SONNHAMMER, 2005).

Clustering of gene expression profiles for different post ovulation days was performed with the self-organizing tree algorithm (SOTA; Pearson correlation, cell variability, P-value 0.0001) of Multi Experiment Viewer (MeV) v4.8.1 based on mean-centered normalized log2 transformed read counts (normalized value of a sample minus mean of all normalized values). Co-regulated orthologous genes pooled in co-expression clusters and DE genes found in the comparison 20x40 and 40x60 were used to extract Gene Ontology (GO) information from public databases using Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) (http://david.abcc.ncifcrf.gov/).

In order to identify the significantly enriched biological pathways, all DE genes were mapped to KEGG database using the Functional Annotation Charts tools of DAVID. Pathways with p-value (adjusted) ≤ 0.05 were considered significant.

Venn diagram was constructed using all differentially expressed genes using day 10 p.o. as reference.

2.3 RESULTS

RNA integrity number ranged from 6,3 to 9,70. A total of 771 208 718 reads were generated by Illumina HiScanSeq with an average size of 100 bp. Each sample produced an average of 42 million reads. Alignment analysis showed that 673.577.446 (87,3%) of total reads were mapped to the canine genome. The mapped reads were aggregated within 34.408 genes, and of this total 9.000 were not annotated in the canine genome. Our study showed that

29.011 genes had some level of gene expression in some point during diestrus. The temporal gene expression analysis revealed the presence of 5.116 genes differentially expressed (DE) at least one comparison and 1106 genes s had not yet been annotated in the canine genome. This analysis showed that 1141 genes were DE in one of 15 possible comparisons and three were DE in almost all diestrus (PAPPA, CAPN6 and NKD2). The gene PAPPA was more expressed at the beginning of diestrus (Figure 1) and the NKD2 and as well as CAPN6 genes were more expressed at the end of diestrus (60 p.o.), but their expression increased gradually (Figure 1). In relation to isoforms, the analysis dectected 1215 DE isoforms and of this a total of 499 did not show a corresponding described gene.

Α В **PAPPA** CAPN6 20 20 FPKM 10 30 40 30 Days after ovulation Days after ovulation C NKD2 600 400 200 10 20 50 40 Days after ovulation

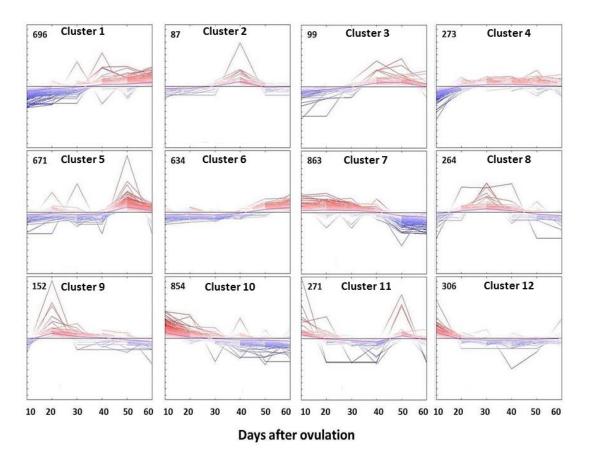
Figure 1 - Genes differentially expressed in almost all diestrus

Source: (CARDOSO, A. P. M. M., 2016).

Those transcripts found to be differentially expressed at least in one of days p.o. were subject to SOTA clustering. Cluster methods are frequently used for grouping genes by their expressions patterns. Expression profiles were visualized as 12 clusters of similar expression profiles during diestrus (Figure 2). The clusters 10, 11 and 12 contained genes up regulated in the beginning of diestrus during the CL formation (day 10 p.o.) The cluster 9 contained genes that had the highest expression on day 20 p.o. The clusters 1,3 and 4 included the genes that their expression began to increase on day 35, 40 and 20 p.o., respectively until the end of

diestrus. The cluster 6 showed genes which were upregulated at the end of diestrus (day 50 p.o.) when started the structural regression. The cluster 7 added the genes up regulated until the second third of luteal phase (day 40 p.o.). The genes upregulated during the midle of luteal phase were showed in the cluster 8. The clusters 2 and 5 contained the genes with highest expression on day 40 and 50 p.o., respectively.

Figure 2- Clustering of genes expression profiles during diestrus.SOTA of MeV software (version 4.7.1) was used to obtain group of genes with similar expression profiles. Clusters 1 to 12 from left to right and top to down. Numbers of genes for each cluster are shown at top left



Source: (CARDOSO, A. P. M. M., 2016).

A Functional Annotation Clustering analysis to GO terms was performed using DAVID for the individual SOTA clusters (Table 1). GO categories are organized into three groups: biological process (BP), cellular compartiment (CC) and molecular function (MF). The clusters 3 (up- regulated on days 40 and 50 p.o.) did not show enrichment for any above described categories. The cluster 1 (up-regulated on days 40, 50 and 60 p.o.) exhibited enrichment of functions related to extracellular region and negative regulation of biological process. Genes with highest expression on day 40 p.o (cluster 2) were enriched with functional terms as plasma membrane and process that modulates a qualitative or quantitative

trait of biological quality. Genes down-regulated on the beginning of diestrus (Cluster 4) presented functional terms related to membrane, such as endoplasmatic reticulum membrane and plasma membranes, as well as anatomical structure development. Cluster 5 corresponded to genes up-regulated on 50 p.o. and the enriched functional categories were structural constituent of ribosome, intracellular organelle and cellular metabolic process. Cluster 6 contained genes with highest expression at the end of diestrus (days 50 and 60 p.o.), the most enriched terms were similar to the cluster 5, except the immune response. The genes downregulated at the end of diestrus (days 50 and 60 p.o.) were represented in cluster 7 and their overrepresented functional terms were cell motility, development process and regulation of biological process. Cluster 8 exhibited genes up-regulated on day 30, but with average lower levels on days 20 and 40. Enriched terms were, for example, anatomical structure morphogenesis, plasma membrane part and cell motility. Only one annotation cluster was found to cluster 9 (up-regulated on day 20 and less on day 40) and this was related to extracellular membrane vesicle. The genes up-regulated at the first half of diestrus (days 10, 20 and 30) were represented at cluster 10 and overrepresented functional terms were related to cell motility, development process, plasma membrane and positive regulation of cellular process. Strong enrichment of functions related to immune system was found for genes upregulated on day 10 and 50 p.o. (Cluster 11). Only one enriched functional category, reproductive process, was found to cluster 12 (genes up-regulated on day 10 p.o.).

Table 1 - Overrepresented DAVID annotation clusters for the obtained SOTA expression clusters

	verificesented DAVID annotation clusters for the obtained SOTA expression clusters	(to be co	(to be continued)	
Expression	Representative enriched functional terms	Enrichment	No. of	
cluster		score	genes	
Cluster 1	Extracellular region part (110,1.45); extracellular organelle (82,1.47), vesicle (99,1.34)	3.78	347	
Up-regulated on days 40, 50 and 60	Negative regulation of biological process (123,1.34); negative regulation of cellular process (136,1.20); Negative regulation of metabolic process (68,1.27);	3.16	320	
	Anatomical structure development (132,1.27); single-organism developmental process (136,1.19); single-multicellular organism process (150,1.12)	2.25	320	
Cluster 2 Up-regulated on	Plasma membrane (15, 1.88); cell periphery (15,1.84), plasma membrane part (10, 2.46); membrane part (16,1.50); intrinsic component of membrane (14, 1.58)	1.71	28	
day 40 po	Regulation of biological quality (12, 2.03), regulation of localization (9, 2.27); response chemical (12.1.67)	1.52	27	
Cluster 3		0	0	
Up-regulated on days 40 and 50 po				
Cluster 4	Endoplasmic reticulum membrane (19,2.11); nuclear outer membrane-endoplasmic reticulum membrane network	1.89	165	
Down-regulated	(19,2.07); organelle membrane (36,1.24)			
on day 10 po	Extracellular vesicle (39,1.47); extracellular organelle (39,1.47); extracellular region part (49,1.35); vesicle	1.85	165	
	(47,1.34)	1.74	165	
	Plasma membrane part (36,1.50); plasma membrane (60,1.27); cell periphery (61,1.26)	1.46	155	
	Single-organism developmental process (69,1.25); anatomical structure development (61,1.21); single-multicellular organism process (76,1.17)			

		(continuation)	
Expression cluster	Representative enriched functional terms		No. of genes
Cluster 5	Structural constituent of ribosome (29,7.96); multi-organism metabolic process (23,6.14); ribonucleoprotein	9.31	319
Up-regulated on	complex (41,3.14); interspecies interaction between organisms (35,2.34); multi-organism cellular process (33,2.28)		
day 50 po	Intracellular organelle part (186,1.29); intracellular organelle part (189,1.28); intracellular organelle (250,1.16)	5.58	317
	Membrane-bounded organelle (255,1.18); intracellular organelle (250,1.17); intracellular part (275,1.11);	4.09	289
	intracellular (279,1.10); cell part (296,1.02)		
	Nitrogen compound metabolic process (162,1.35); cellular metabolic process (211,1.15); biosynthetic process	3.42	289
	(139,1.23); primary metabolic process (206.1,12); organic substance metabolic process (208,1.10)		
	Cellular localization (75,1.41); establishment of localization (104,1.26); single-organism localization (93,1.28);	2.44	289
	macromolecule localization (65,1.36)		
	Extracellular organelle (72,1.41); extracellular vesicle (72,1.41); vesicle (89,1.32); extracelular region part	2.25	317
	(79,1.14)		
Cluster 6 Up-regulated on	Structural constituent of ribosome (20,4.94); multi-organism metabolic process (20,4,72); ribonucleoprotein	5.84	340
	complex (35,2.51); multi-organism cellular process (35,2.14); interspecies interaction between organisms (35,2,07)		
days 50 and 60	Extracellular region part (116,1.56); extracellular organelle (88,1.61); extracellular vesicle (88,1.61); vesicle	5.27	340
ро	(99,1.37)		
	Macromolecule localization (82,1,51); establishment of localization (118,1.27); cellular localization (81,1.35);	2.88	327
	single-organism localization (103,1.25)		
	Activation of immune response (22,2.02); positive regulation of immune system process (31,1.63); immune	1.87	327
	response (47,1,39); regulation of immune system process (41,1.31)		

		(continuation)	
Expression	Representative enriched functional terms	Enrichment	No. of
cluster		score	genes
Cluster 7	Localization of cell (99,2.07); cell motility (99,2.07); regulation of locomotion (67,2.40)	11.05	596
Down-regulated on days 50 and 60 po	Anatomical structure morphogenesis (175,1.70); single-organism developmental process (293,1.38); Anatomical		
	structure development (267,1.39); single-organism multicellular process (319,1.27)	10.61	596
	Extracellular matrix component (20,4.38); basement membrane (17,4.94); proteinaceous extracellular matrix	6.12	608
	(31,2.46)		
	Single organism signaling (305,1.34); cellular response to stimulus (316,1.21); regulation of cellular process (404;	4.85	596
	1.07); regulation of biological process (421;1.06)		
	Positive regulation of biological process (273,1.34); positive regulation of cellular process (229,1.30); positive	4.85	596
	regulation of metabolic process (179,1.31); regulation of metabolic process (255,1.03)		
	Cell projection (100,1.57); neuron part (68,1.57); cell projection part (55,1.65)	4.15	608
	Postsynaptic density (22,3.21); synapse part (39,1.84); postsynapse (28,2.05)	3.98	608
	Vesicle (169,1.31); extracellular vesicle (127,1.30); extracellular organelle (127,1.30); extracellular region part	3.24	608
	(165,1.24)		
	Negative regulation of cellular process (200,1.28); negative regulation of biological process (210,1.24); negative	3.02	596
	regulation of metabolic process (111,1.12)		
	Establishment of localization (209,1.23); single-organism localization (185,1.24); cellular localization (128,1.17)	2.74	596

		(continuat	tion)
Expression	Representative enriched functional terms	Enrichment	No. of
cluster		score	genes
Cluster 8	Anatomical structure morphogenesis (59,2.18); single-multicellular organism process (102,1.56); anatomical	7.99	156
Up-regulated on	structure development (86,1.71); single-organism developmental process (87,1.57)		
day 30 po and	Cell periphery (81,1.66); plasma membrane part (50,2.06); plasma membrane (78,1.64)	6.41	167
less pronounced on days 20 and	Localization of cell (36,2.88); cell motility (36,2.88); regulation of locomotion (23,3.15); regulation of localization	6.38	156
40 po	(43,1.87)		
1	Single-organism cellular process (143,1.20); single organism signaling (90,1.51); cellular response to stimulus	5.18	156
	(98,1.43); regulation of cellular process (122,1.23); regulation of biological process (124,1.19)		
	Regulation of multicellular organism process (51,2.06); regulation of developmental process (43,2.0); positive of	5.15	156
	multicellular organism (3		
	2,2.33); positive regulation of developmental process (26,2.34)		
	Postsynapse (10,2.66); synapse part (13,2.24); synapitc membrane (7,2.80)	1.72	167
	Basement membrane (5,5.28); proteinaceous extracellular matrix (9,2.58); extracellular matrix component (5,3.99)	1.63	167
Cluster 9	Extracellular organelle (25,1.75); extracellular vesicle (25,1.75); vesicle (30,1.59); extracellular region part	2.18	89
Up-regulated on	(30,1.54)		
day 20 po and			
less pronounced			
on day 40 po			

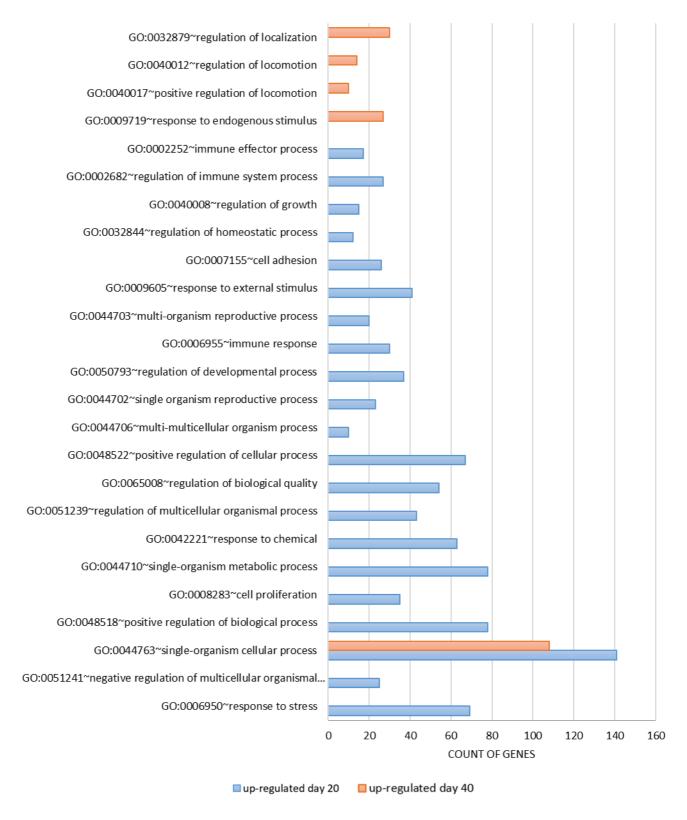
			(continuation)	
Expression	Representative enriched functional terms	Enrichment	No. of	
cluster		score	genes	
Cluster 10	Cell motility (90,1.88); localization of cell (90,1.88); regulation of locomotion (61,2.19)	8.06	597	
Up-regulated on	Single-organism developmental process (275,1.30); anatomical structure development (250,1.30); single-	6.42	597	
day 10 po and	multicellular organism process (307,1.22)			
less pronounced on days 20 and	Cell periphery (238,1.31), plasma membrane (230,1.30); plasma membrane part (131,1.45)	5.65	238	
30 po	Extracellular region part (189,1.39); vesicle (181,1.37); extracellular organelle (134,1.34); extracellular vesicle	4.86	622	
эо ро	(134,1.34)			
	Positive regulation of cellular process (237,1.35); positive regulation of biological process (265,1.30); positive	4.34	597	
	regulation of metabolic process (169,1.24); regulation of metabolic process (250,1.00)			
	Establishment of localization (209,1.23); macromolecule localization (131,1.33); single-organism localization	3.32	597	
	(186,1.24); cellular localization (141,1.28)			
	Negative regulation of cellular process (199,1.27); negative regulation of biological process (213,1.25); negative	3.19	597	
	regulation of metabolic process (115,1.16)			
	Single organism signaling (281,1.23); cellular response to stimulus (297,1.14); regulation of biological process	2.38	597	
	(409,1.03); regulation of cellular process (390,1.03)			
	Developmental process involved in reproduction (44,1.86); single organism reproductive process (60,1.46);	1.60	597	
	multicellular organism reproduction (38,1,29); multicellular organismal reproductive process (37,1.28); multi-			
	organism reproductive process (43,1.24); sexual reproduction (28,0.99)			
	Intracellular organelle part (310,1.10); organelle part (315,1.09); intracellular organelle (427,1.02	1.33	622	

(conclusion) **Expression** Representative enriched functional terms **Enrichment** No. of cluster score genes Immune response (66,3.89); regulation of immune system process (54,3.43); immune effector process (37,4.58); **Cluster 11** 12.89 164 Up-regulated on positive regulation of immune system process (40,4.18); activation of immune response (25,4.58); regulation of days 10 and 50 response to stimulus (73,1.94); positive regulation of response to stimulus (48,2.21) po Leukocyte activation (37,4.92); cell adhesion (40,2.77); single organism cell adhesion (26,3.35) 9.88 164 Response to other organism (28,2.98); response to biotic stimulus (28,2.86); response to external stimulus (46,1.72) 5.29 164 Leukocyte migration (20,5.56); cell motility (31,2.36); localization of the cell (31,2.36); taxis (22,2.54); regulation 4.82 164 of locomotion (16,2.09) Cellular response to stimulus (100,1.40); single organism signaling (90,1.43); regulation of biological process 3.90 164 (128,1.17); regulation of cellular process (122,1.17) Vesicle (53,1.48); extracellular region part (54,1.46); extracellular organelle (40,1.47); extracellular vesicle 2.35 169 (169, 1.47)Single- organism developmental process (73,1.25); anatomical structure development (67,1.27); single-multicellular 1.68 164 organism process (81,1.17) Establishment of localization (61,1.31); single-organism localization (52,1.26); cellular localization (36,1.19) 1.33 164 Regulation of molecular function (42,1.47); positive regulation of metabolic process (50,1.33); regulation of 1.32 164 metabolic process (65,0.95) Cluster 12 Single-organism reproductive process (29,2.06); multi-organism reproductive process (25,2.11); multicellular 1.96 204 Up-regulated on organismal reproductive process (17,1.73); multicellular organism reproduction (17,1.68); sexual reproduction day 10 (13,1.35)

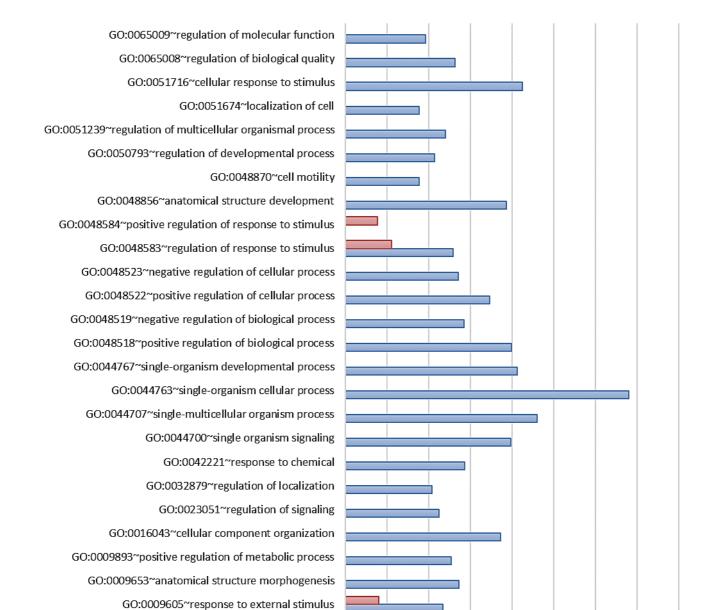
Source: (CARDOSO, A. P. M. M., 2016).

In addition to understand better the CL dynamic during proliferative phases, luteal physiological regression and structural, we performed GO analysis between groups 20x40 and 40x60. In both comparisons, the majority of enriched genes was up-regulated at the first group of comparison (on days 20 and 40 p.o, respectively). At the comparison 20x40, the majority of genes enriched to this category were up-regulated on day 20 p.o. (Figure 3) and various terms were related to immune process. The term, single-organism cellular process (process that is carried out at the cellular level), was the most enriched term and could be observed in both moments. The other enriched terms were: positive regulation of biological process, metabolic process and change in state or activity of a cell. In relation to 40x60 comparison (Figure 4), the term single-organism cellular process was again the most enriched, followed by single-organism developmental process (likewise a progression of an anatomical structure) and positive regulation of biological process and some terms enriched on day 60 p.o. were related to immune process and response to stress.

Figure 3 – GO analysis of differentially expressed genes in comparisons 20x40. The differentially expressed genes are classified in biological process



Source: (CARDOSO, A. P. M. M., 2016).



0

up-regulated day 40

50

100

up-regulated day 60

150

200

COUNT OF GENES

250

300

350

400

Figure 4 – GO analysis of differentially expressed genes in comparisons 40x60. The differentially expressed genes are classified in biological process

Source: (CARDOSO, A. P. M. M., 2016).

GO:0009056~catabolic process GO:0006955~immune response GO:0006950~response to stress

GO:0002682~regulation of immune system process

The pathways analysis was performed with all DE genes to predict the significantly enriched metabolic pathways and signal transduction based on Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEEG) pathway. The significantly enriched pathways are showed in Figure 5. In total, 1229 DE genes had KEGG pathways annotations. The results showed that the significant signaling pathways included 18 pathways, for example, pathways in cancer (as Wnt signaling, VEGF signaling, PI3K-AKT signaling, MAPK signaling), focal adhesion (that regulates cell motility, cell proliferation and cell survival), Rap1 signaling pathways (regulate cell proliferation and survival), proteoglycans in cancer (regulate angiogenesis, proliferation and survival), cytokine-cytokine receptor interactions (as IGF-1/IGFR, TGFα/EGFR, IL/ILR).

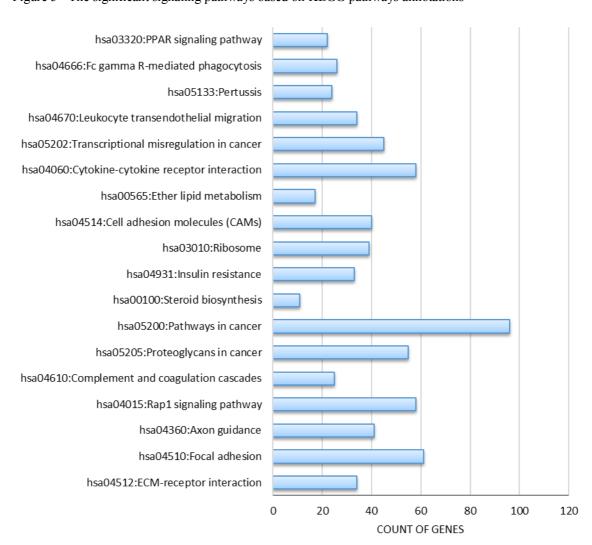


Figure 5 - The significant signaling pathways based on KEGG pathways annotations

Source: (CARDOSO, A. P. M. M., 2016).

Using day 10 as reference, the Venn diagram showed the possible intersection among DE genes (Figure 6). The results show that 395 genes occur in all comparisons which have day 10 p.o. as reference. Through comparisons between different days studied: 10vs20, 10vs30, 10vs40, 10vs50 and 10vs60 showed 72, 108, 162, 464 and 870 different genes in each type of comparison, respectively and the number of the DE genes was increased when comparison time points were more distant from each other.

10vs40 (1676) 10vs20 (843)

Figure 6 - Venn diagram comparing significant differentially expressed genes between days 20, 30, 40, 50 and 60 p.o. compared to 10 p.o

Source: (CARDOSO, A. P. M. M., 2016).

2.4 DISCUSSION

To the knowledge of the authors, there are no studies related to the transcriptome of the corpus luteum in other domestic species using the new generation sequencing technology. Differential gene expression analysis during the luteal phase showed the presence of 5116

differentially expressed genes, which is a higher number than that found by Bogan and cols (BOGAN et al., 2008) when assessing the gene expression of the primate corpus luteum through microarray. The largest amount of differentially expressed genes obtained in our experiments must be due to the capacity of RNAseq to detect low abundance transcripts (GUO et al., 2013; ZHAO et al., 2014). However, likewise the data obtained by Bogan and cols (BOGAN et al., 2008), the larger amount of differentially expressed transcripts were observed when CL from the early luteal phase was compared with CL from the end of luteal phase.

Our data indicated that plenty of genes related to cell proliferation, cell survival and angiogenesis were differentially regulated during diestrus, mainly during the first third of diestrus (days 10 and 20 p.o.). The PAPPA gene, one of three DE genes in almost all comparisons in diestrus, was an example. This gene encodes the protein denominated as pregnancy-associated plasm protein-A (PAPP-A) in human and domestic animals (NYEGAARD et al., 2010), which is a secreted metalloproteinase responsible for cleavage of the insulin-like growth factor binding protein 4 (IGFBP4), the most abundant IGFBP in the ovary (HOURVITZ et al., 2000; BROGAN et al., 2010; NYEGAARD et al., 2010). The PAPP-A is a marker of corpus luteum formation (HOURVITZ et al., 2000; CONOVER et al., 2001; CONOVER, 2012), which could be corroborated by our experiments. The highest expression of this gene was found on day 10 p.o., which points towards its role in luteal steroidogenesis, survival and proliferation (BROGAN et al., 2010; LODDO et al., 2014). Furthermore, insulin-like growth factor 1 (IGF1) and some IGFBPs (as 3, 4 and 7) were DE genes in the early diestrus too, relating the modulator role of IGF system in cellular differentiation and steroidogenesis (NYEGAARD et al., 2010; BØTKJÆR et al., 2015). Another different signaling proliferative and angiogenic pathway molecules were also DE, such as Wnt-5 and β-catenin (SAITO-DIAZ et al., 2013; ROSENBLUH et al., 2014) regulating Wnt pathway, MAP2K1 in MAPK pathway (NADEAU et al., 2009), EGFR in EGF signaling (SESHACHARYULU et al., 2012), VEGFA and VEGFC in VEGF signaling (MARIANI ET AL., 2006; KOCH; CLAESSON-WELSH, 2012; LAURENZANA ET AL., 2015). In addition, proteins required for transport, such as iron uptake TFRC1, amino acid transporter SLC36A1 and monocarboxylate transporter SLC16A7, are also DE at beginning of diestrus. Most of these genes was up-regulated on day 10 p.o, emphasizing data of high proliferative activity found in early luteal phase (HOFFMANN et al., 2004a; PAPA;

HOFFMANN, 2011). Indeed we observed that the majority of regulatory mechanisms controling CL lifespan is expressed during the period of increased cell growth and tissue modeling.

Some enriched terms up-regulated on days 40, 50 and 60 p.o. were related to negative regulation of biological processes. These periods correspond to observed structural regression and degeneration (KOWALEWSKI, 2014). Two of three DE genes in almost all studied comparisons were clustered here. The Naked 2 gene (NKD2) encodes a protein, which is a member of Naked family protein and a negative regulator of canonical Wnt signaling (CAO et al., 2013), a proliferative pathway. The NKD2 expression gradually increased during diestrus, being highest on day 60 p.o. Axin 2 and SFRP4, other inhibitors of Wnt signaling (GÖTZE et al., 2010; SAITO-DIAZ et al., 2013), were found DE at this moment as well; thus these increases seem to be important to reduce cell proliferation. The calpain 6 (CAPN6) is a protein encoded by the CAPN6 gene. This protein is a member of the calpains family, which comprises intracellular cysteine proteins, whose activity is highly dependent upon Ca2+ ions (SORIMACHI et al., 2011; SMITH; SCHNELLMANN, 2012). It is known that the calpains regulate various biological processes like cell migration and apoptosis (TONAMI et al., 2007; SORIMACHI et al., 2011; SMITH; SCHNELLMANN, 2012; TONAMI et al., 2013), through the limited proteolytic activity, which transforms their substrates into new functional states (TOMANI et al., 2013; SORIMACHI et al., 2011). In cultured cells, CAPN6 regulates microtubule dynamics and actin reorganization (TONAMI et al., 2007), but its in vivo function is still unclear (TONAMI et al., 2013). CAPN6 is a suppressive modulator for differentiation and growth in skeletal muscle (TONAMI et al., 2013) and perhaps this gene can suppress the growth in CL, because its expression increased gradually during the luteal phase, being highest on day 60 p.o., but more studies are necessary to understand the involvement of these calpains in CL physiology. On day 60 p.o., moment for observation of the first apoptotic signals (HOFFMANN et al., 2004a), some apoptosis related genes were DE. Likewise NOXA1, which encodes the enzyme NADPH oxidase, responsible to generate superoxide anion, a reactive oxygen species (ROS), leading to ROS-mediated apoptotic cell death (PARK et al., 2012) was upregulated, as well as IGFBP6, a glycoprotein inhibitor of IGFII actions, although it may act independently of IGF action, promoting apoptosis and inhibition of angiogenesis (BACH, 2015b).

DE genes related to immune system were found during early and regression luteal phases: CD44, CD209, IL10 and TNFRSF18, and the enriched pathway related to cytokine cytokine interaction confirm that the immune system regulates luteal formation and regression (HOFFMANN, BÜSGES; BAUMGÄRTNER, 2004; HOFFMANN et al., 2004a).

Our transcriptome results also confirmed the role of prostaglandins as a luteotrophic factors (KOWALEWSKI et al., 2006; KOWALEWSKI et al., 2008), since COX-2 gene was up-regulated during early diestrus. The expression of CYP1B1 and KIAA1324 genes suggests the importance of E2 controlling CL lifespan. The CYP1B1 codes a cytochrome P450 enzyme responsible of producing a cathecol estrogen, which is a strong agonist of estrogen receptors (PICCINATO et al., 2016) and its expression was higher on day 10 p.o, decreased afterwards, but increased again during regression (days 50 and 60 p.o). Whereas KIAA1324, an estrogen regulated gene (ESTRELLA et al., 2014), was more expressed during regression. The encoded protein has been characterized as a transmembrane protein, which is related to autophagic vacuole formation (DENG et al., 2010) and in pancreatic tumor cells its expression may be regulated by ERβ (ESTRELLA et al., 2014). Thus, these results suggest a role of E2 during CL formation and regression.

The number of reads obtained in our sequencing, approximately 770 million, was larger than reported for other animal reproduction experiments, or even the transcriptome of ovarian follicles in women (BONNET et al., 2013; YERUSHALMI et al., 2014), and the ovarian tissue of primates, cattle, goat and sheep (BABBITT et al., 2012; CÁNOVAS et al., 2014; LAN et al., 2014; LING et al., 2014; CHEN et al., 2015). The only study able to obtain a larger number of reads was the one from Bonnet and cols. (BONNET et al., 2013), who reported a total of 2 billion reads, when sequencing the ovarian follicle during folliculogenesis in sheep. Ours results demonstrated also a great depth in this sequencing.

On the average, 80% of reads generated from each sample were mapped in the canine genome, similar to results obtained in the sequencing of ovarian tissue in goat, cattle and sheep (CÁNOVAS et al., 2014; LAN et al., 2014; LING et al., 2014; CHEN et al., 2015) and larger than that observed by Yerushalmi and cols (YERUSHALMI et al., 2014), when they analyzed humans oocytes, from which the average alignment of each sample relative to the reference genome was 70%.

In summary, the results provide an overview of the distribution of transcriptome along the canine diestrus, bringing valuable data that will be explored in the future for a better understanding of the physiological functions of this gland along canine diestrus.

REFERENCES

- BABBITT, C. C.; TUNG, J.; WRAY, G. A.; ALBERTS, S. C. Changes in gene expression associated with reproductive maturation in wild female baboons. **Genome Biol Evol**, v. 4, n. 2, p. 102-109, 2012.
- BACH, L. A., Recent insights into the actions of IGFBP-6. **J Cell Commun Signal**, 9 (2), 189-200, 2015.
- BOGAN, R. L.; MURPHY, M. J.; STOUFFER, R. L.; HENNEBOLD, J. D. Systematic determination of differential gene expression in the primate corpus luteum during the luteal phase of the menstrual cycle. **Mol Endocrinol**, v. 22, n. 5, p. 1260-1273, 2008.
- BONFIM NETO, A. P. **O papel do 17β-estradiol no processo luteolítico de cadelas não prenhes**. 2014. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
- BONNET, A.; CABAU, C.; BOUCHEZ, O.; SARRY, J.; MARSAUD, N.; FOISSAC, S.; WOLOSZYN, F.; MULSANT, P.; MANDON-PEPIN, B. An overview of gene expression dynamics during early ovarian folliculogenesis: specificity of follicular compartments and bi-directional dialog. **BMC Genomics**, v. 14, p. 904, 2013.
- BØTKJÆR, J. A.; JEPPESEN, J. V.; WISSING, M. L.; KLØVERPRIS, S.; OXVIG, C.; MASON, J. I.; BORGBO, T.; ANDERSEN, C. Y. Pregnancy-associated plasma protein A in human ovarian follicles and its association with intrafollicular hormone levels. **Fertil Steril**, v. 104, n. 5, p. 1294-1301, 2015.
- BROGAN, R. S.; MIX, S.; PUTTABYATAPPA, M.; VANDEVOORT, C. A.; CHAFFIN, C. L. Expression of the insulin-like growth factor and insulin systems in the luteinizing macaque ovarian follicle. **Fertil Steril**, v. 93, n. 5, p. 1421-1429, 2010.
- CÁNOVAS, A.; REVERTER, A.; DEATLEY, K. L.; ASHLEY, R. L.; COLGRAVE, M. L.; FORTES, M. R.; ISLAS-TREJO, A.; LEHNERT, S.; PORTO-NETO, L.; RINCÓN, G.; SILVER, G. A.; SNELLING, W. M.; MEDRANO, J. F.; THOMAS, M. G. Multi-tissue omics analyses reveal molecular regulatory networks for puberty in composite beef cattle. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e102551, 2014.
- CAO, C.; WANG, S.; LV, S.; LI, Z.; WANG, X.; ZENG, F.; ZHANG, H.; DAI, Y.; DOU, X.; CHEN, X.; LI, X.; LUO, L.; HU, T.; YAN, J. A monoclonal antibody produced against Naked2. **Monoclon Antib Immunodiagn Immunother**, v. 32, n. 4, p. 290-294, 2013.

- CHEN, H. Y.; SHEN, H.; JIA, B.; ZHANG, Y. S.; WANG, X. H.; ZENG, X. C. Differential gene expression in ovaries of Qira black sheep and Hetian sheep using RNA-Seq technique. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0120170, 2015.
- CONOVER, C. A.; FAESSEN, G. F.; ILG, K. E.; CHANDRASEKHER, Y. A.; CHRISTIANSEN, M.; OVERGAARD, M. T.; OXVIG, C.; GIUDICE, L. C. Pregnancy-associated plasma protein-a is the insulin-like growth factor binding protein-4 protease secreted by human ovarian granulosa cells and is a marker of dominant follicle selection and the corpus luteum. **Endocrinology**, v. 142, n. 5, p. 2155, 2001.
- CONOVER, C. A. Key questions and answers about pregnancy-associated plasma protein-A. **Trends Endocrinol Metab**, v. 23, n. 5, p. 242-249, 2012.
- DENG, L.; FENG, J.; BROADDUS, R. R., The novel estrogen-induced gene EIG121 regulates autophagy and promotes cell survival under stress. **Cell Death Dis**, 1, e32, 2010.
- ESTRELLA, J. S.; MA, L. T.; MILTON, D. R.; YAO, J. C.; WANG, H.; RASHID, A.; BROADDUS, R. R., Expression of estrogen-induced genes and estrogen receptor β in pancreatic neuroendocrine tumors: implications for targeted therapy. **Pancreas**, 43 (7), 996-1002, 2014
- GÖTZE, S.; WOLTER, M.; REIFENBERGER, G.; MÜLLER, O.; SIEVERS, S. Frequent promoter hypermethylation of Wnt pathway inhibitor genes in malignant astrocytic gliomas. **Int J Cancer**, v. 126, n. 11, p. 2584-2593, 2010.
- GUO, Y.; SHENG, Q.; LI, J.; YE, F.; SAMUELS, D. C.; SHYR, Y. Large scale comparison of gene expression levels by microarrays and RNAseq using TCGA data. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71462, 2013.
- HOFFMANN, B.; BÜSGES, F.; ENGEL, E.; KOWALEWSKI, M. P.; PAPA, P. Regulation of corpus luteum-function in the bitch. **Reprod Domest Anim**, v. 39, n. 4, p. 232-240, 2004a.
- HOFFMANN, B.; BÜSGES, F.; BAUMGÄRTNER, W. Immunohistochemical detection of CD4-, CD8- and MHC II-expressing immune cells and endoglin in the canine corpus luteum at different stages of dioestrus. **Reprod Domest Anim**, v. 39, n. 6, p. 391-395, 2004b.
- HOURVITZ, A.; WIDGER, A. E.; FILHO, F. L.; CHANG, R. J.; ADASHI, E. Y.; ERICKSON, G. F. Pregnancy-associated plasma protein-A gene expression in human ovaries is restricted to healthy follicles and corpora lutea. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 85, n. 12, p. 4916-4920, 2000.
- KOCH, S.; CLAESSON-WELSH, L., Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 2 (7), a006502, 2012.
- KOWALEWSKI, M.; SCHULER, G.; TAUBERT, A.; ENGEL, E.; HOFFMANN, B. Expression of cyclooxygenase 1 and 2 in the canine corpus luteum during diestrus. **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7, p. 1423-1430, 2006.

- KOWALEWSKI, M. P.; MUTEMBEI, H. M.; HOFFMANN, B. Canine prostaglandin E2 synthase (PGES) and its receptors (EP2 and EP4): expression in the corpus luteum during dioestrus. **Anim Reprod Sci**, v. 109, n. 1-4, p. 319-329, 2008.
- KOWALEWSKI, M. P.; MICHEL, E.; GRAM, A.; BOOS, A.; GUSCETTI, F.; HOFFMANN, B.; ASLAN, S.; REICHLER, I. Luteal and placental function in the bitch: spatio-temporal changes in prolactin receptor (PRLr) expression at dioestrus, pregnancy and normal and induced parturition. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 9, n., p. 109, 2011.
- KOWALEWSKI, M. P. Endocrine and molecular control of luteal and placental function in dogs: a review. **Reprod Domest Anim**, v. 47, p. 19-24, 2012. Supplement, 6.
- KOWALEWSKI, M. P. Luteal regression vs. prepartum luteolysis: regulatory mechanisms governing canine corpus luteum function. **Reprod Biol**, v. 14, n. 2, p. 89-102, 2014.
- LAN, D.; XIONG, X.; WEI, Y.; XU, T.; ZHONG, J.; ZHI, X.; WANG, Y.; LI, J. RNA-Seq analysis of yak ovary: improving yak gene structure information and mining reproduction-related genes. **Sci China Life Sci**, v. 57, n. 9, p. 925-935, 2014.
- LAURENZANA, A.; FIBBI, G.; CHILLÀ, A.; MARGHERI, G.; DEL ROSSO, T.; ROVIDA, E.; DEL ROSSO, M.; MARGHERI, F., Lipid rafts: integrated platforms for vascular organization offering therapeutic opportunities. **Cell Mol Life Sci**, 72 (8), 1537-57, 2015.
- LING, Y. H.; XIANG, H.; LI, Y. S.; LIU, Y.; ZHANG, Y. H.; ZHANG, Z. J.; DING, J. P.; ZHANG, X. R. Exploring differentially expressed genes in the ovaries of uniparous and multiparous goats using the RNA-Seq (Quantification) method. **Gene**, v. 15, n. 1, p. 148-153, , 2014.
- LODDO, M.; ANDRYSZKIEWICZ, J.; RODRIGUEZ-ACEBES, S.; STOEBER, K.; JONES, A.; DAFOU, D.; APOSTOLIDOU, S.; WOLLENSCHLAEGER, A.; WIDSCHWENDTER, M.; SAINSBURY, R.; TUDZAROVA, S.; WILLIAMS, G. H. Pregnancy-associated plasma protein A regulates mitosis and is epigenetically silenced in breast cancer. **J Pathol**, v. 233, n. 4, p. 344-356, 2014.
- MARIANI, T. C.; DO PRADO, C.; SILVA, L. G.; PAARMANN, F. A.; LIMA, M. C.; CARVALHO, I.; CAMPOS, D. B.; ARTONI, L. P.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; PAPA, P. C. Immunohistochemical localization of VEGF and its receptors in the corpus luteum of the bitch during diestrus and anestrus. **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7, p. 1715-1720, 2006.
- MARTÍNEZ-LÓPEZ, L. A.; OCHOA-ALEJO, N.; MARTÍNEZ, O. Dynamics of the chili pepper transcriptome during fruit development. **BMC Genomics**, v. 15, n., p. 143, 2014.

- NADEAU, V.; GUILLEMETTE, S.; BÉLANGER, L. F.; JACOB, O.; ROY, S.; CHARRON, J., Map2k1 and Map2k2 genes contribute to the normal development of syncytiotrophoblasts during placentation. **Development**, 136 (8), 1363-74, 2009.
- NYEGAARD, M.; OVERGAARD, M. T.; SU, Y. Q.; HAMILTON, A. E.; KWINTKIEWICZ, J.; HSIEH, M.; NAYAK, N. R.; CONTI, M.; CONOVER, C. A.; GIUDICE, L. C. Lack of functional pregnancy-associated plasma protein-A (PAPPA) compromises mouse ovarian steroidogenesis and female fertility. **Biol Reprod**, v. 82, n. 6, p. 1129-1138, 2010.
- O'BRIEN, K. P.; REMM, M.; SONNHAMMER, E. L. Inparanoid: a comprehensive database of eukaryotic orthologs. **Nucleic Acids Res**, v. 33, p. D476-480, 2005.
- PAPA, P. C.; HOFFMANN, B. The corpus luteum of the dog: source and target of steroid hormones? **Reprod Domest Anim**, v. 46, n. 4, p. 750-756, 2011.
- PAPA, P. E. C.; SOUSA, L. M.; SILVA, R. O. S.; DE FÁTIMA, L. A.; DA FONSECA, V. U.; DO AMARAL, V. C.; HOFFMANN, B.; ALVES-WAGNER, A. B.; MACHADO, U. F.; KOWALEWSKI, M. P. Glucose transporter 1 expression accompanies hypoxia sensing in the cyclic canine corpus luteum. **Reproduction**, v. 147, n. 1, p. 81-89, 2014.
- PARK, K. J.; LEE, C. H.; KIM, A.; JEONG, K. J.; KIM, C. H.; KIM, Y. S., Death receptors 4 and 5 activate Nox1 NADPH oxidase through riboflavin kinase to induce reactive oxygen species-mediated apoptotic cell death. **J Biol Chem**, 287 (5), 3313-25, 2012.
- PICCINATO, C. A.; NEME, R. M.; TORRES, N.; SANCHES, L. R.; CRUZ DEROGIS, P. B.; BRUDNIEWSKI, H. F.; E SILVA, J. C.; FERRIANI, R. A.
- ROSENBLUH, J.; WANG, X.; HAHN, W. C. Genomic insights into WNT/β-catenin signaling. **Trends Pharmacol Sci**, 35 (2), 103-9, 2014.
- SAITO-DIAZ, K.; CHEN, T. W.; WANG, X.; THORNE, C. A.; WALLACE, H. A.; PAGE-MCCAW, A.; LEE, E. The way Wnt works: components and mechanism. **Growth Factors**, 31 (1), 1-31, 2013.
- SESHACHARYULU, P.; PONNUSAMY, M. P.; HARIDAS, D.; JAIN, M.; GANTI, A. K.; BATRA, S. K. Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. **Expert Opin Ther Targets**, 16 (1), 15-31, 2012.
- SMITH, M. A.; SCHNELLMANN, R. G. Calpains, mitochondria, and apoptosis. Cardiovasc Res, v. 96, n. 1, p. 32-37, 2012.
- SORIMACHI, H.; HATA, S.; ONO, Y. Impact of genetic insights into calpain biology. **J Biochem**, v. 150, n. 1, p. 23-37, 2011.
- TONAMI, K.; KURIHARA, Y.; ABURATANI, H.; UCHIJIMA, Y.; ASANO, T.; KURIHARA, H. Calpain 6 is involved in microtubule stabilization and cytoskeletal organization. **Mol Cell Biol**, v. 27, n. 7, p. 2548-2561, 2007.

TONAMI, K.; HATA, S.; OJIMA, K.; ONO, Y.; KURIHARA, Y.; AMANO, T.; SATO, T.; KAWAMURA, Y.; KURIHARA, H.; SORIMACHI, H. Calpain-6 deficiency promotes skeletal muscle development and regeneration. **PLoS Genet**, v. 9, n. 8, p. e1003668, 2013.

YERUSHALMI, G. M.; SALMON-DIVON, M.; YUNG, Y.; MAMAN, E.; KEDEM, A.; OPHIR, L.; ELEMENTO, O.; COTICCHIO, G.; DAL CANTO, M.; MIGNINI RENZINU, M.; FADINI, R.; HOURVITZ, A. Characterization of the human cumulus cell transcriptome during final follicular maturation and ovulation. **Mol Hum Reprod**, v. 20, n. 8, p. 719-735, 2014.

ZHAO, S.; FUNG-LEUNG, W. P.; BITTNER, A.; NGO, K.; LIU, X. Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e78644, 2014.