

LUIZ ANTÔNIO BERTO GOMES

Caracterização dos genes CCL5, FST e SLIT2 no processo de desenvolvimento e regressão do corpo lúteo de cadelas não prenhes

São Paulo

2020

LUIZ ANTÔNIO BERTO GOMES

Caracterização dos genes CCL5, FST e SLIT2 no processo de desenvolvimento e regressão do corpo lúteo de cadelas não prenhes

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

Departamento:
Reprodução Animal

Área de concentração:
Reprodução Animal

Orientadora:
Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa Keohane

De acordo: _____
Orientadora

São Paulo, 2020

Obs: A versão original encontra-se 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 Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3952
FMVZ

Gomes, Luiz Antônio Berto
Caracterização dos genes CCL5, FST e SLIT2 no processo de desenvolvimento e regressão do corpo lúteo de cadelas não prenhes / Luiz Antônio Berto Gomes. – 2020.
36 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2020.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientadora: Profª. Dra. Paula de Carvalho Papa Keohane.

1. Corpo lúteo. 2. ESR.3. CCL5. 4. FST. 5. SLIT2. I. Título.

Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Caracterização dos genes Ccl5, Fst e Slit 2 no processo de desenvolvimento e regressão do corpo lúteo de cadelas não prenhes", protocolada sob o CEUA nº 8055170619 (ID 007004), sob a responsabilidade de **Paula de Carvalho Papa e equipe; Luiz Antonio Berto Gomes; Camila Infantsi Vannucchi; EVERTON RAMERO TEIXEIRA PERNETA** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 25/09/2019.

We certify that the proposal "Characterization of the Ccl5, Fst and Slit 2 genes in the process of development and regression of the corpus luteum of non-pregnant bitches", utilizing 30 Dogs (30 females), protocol number CEUA 8055170619 (ID 007004), under the responsibility of **Paula de Carvalho Papa and team; Luiz Antonio Berto Gomes; Camila Infantsi Vannucchi; EVERTON RAMERO TEIXEIRA PERNETA** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 09/25/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **11/2019** a **02/2021** Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Cães**

sexo: **Fêmeas**

idade: **1 a 6 anos**

N: **30**

Linhagem: **Sem raça definida**

Peso: **3 a 30 kg**

Local do experimento: Centro Veterinário Animal Life, Rua Clarindo, 27 - Vila Andrade. Responsável: M.V. Everton Ramero. CRMV SP 28494

São Paulo, 07 de abril de 2020

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenador

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BERTO GOMES, Luiz Antônio

Título: Caracterização dos genes CCL5, FST e SLIT2 no processo de desenvolvimento e regressão do corpo lúteo de cadelas não prenhes

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

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Cláudio e Lágila, pelo apoio, incentivo e por nunca medirem esforços,

Às minhas irmãs, Bruna e Camila, que mesmo longe, estão sempre presente,

Ao Paulo, pelo carinho e pela compreensão durante essa jornada,

Aos meus avós, Luiz e Lili (em memória),

Aos meus familiares.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa Keohane, por toda instrução, paciência, apreço e confiança em mim depositada e, principalmente, por ter me acolhido como seu aluno de mestrado.

Ao Prof. Dr. Alex Sander Dias Machado, pelos conselhos, direcionamento, incentivo e apoio que começaram durante a graduação. Sem você, eu não poderia chegar até aqui.

Ao Prof. Dr. Mariusz Kowalewski, pelo acolhimento, confiança e pela oportunidade para realizar minhas atividades na Universidade de Zurique.

À Profa. Dra. Camila Infantosi Vannucchi e toda sua equipe, pelas orientações sobre avaliação do ciclo estral da cadela.

Aos amigos do laboratório LEME-USP e da FMVZ, em especial à Fran, pelo acolhimento, pelas conversas, pelo convívio, pela experiência compartilhada e pela amizade.

A todos os meus amigos, em especial, ao Diogo, por ter me acolhido em São Paulo, pelo apoio, pelos conselhos e por todo incentivo durante o mestrado.

A todos do Centro Veterinário Animal Life, em especial, às Médicas Veterinárias Josi Souza e Juliana Cardoso e às enfermeiras Bianca, Isabelle e Camila, por me ajudarem na busca das cadelas, nas coletas e nas castrações, e ao Médico Veterinário Éverton Ramero, pelo incentivo com o mestrado, por me ceder a clínica para as coletas e por realizar os procedimentos cirúrgicos.

Aos proprietários e a todas as cadelas, pela paciência, carinho e compreensão durante as coletas para que meu experimento pudesse acontecer.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2014/00739-9.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*“Não basta ser gênio, é preciso ter coragem
para mudar o coração das pessoas”*

Green book

RESUMO

BERTO GOMES, L. A. **Caracterização dos genes CCL5, FST e SLIT2 no processo de desenvolvimento e regressão do corpo lúteo de cadelas não prenhes.** 2020. 36f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A cadela é um animal monoéstrico, não sazonal, que apresenta anestro entre as fases reprodutivas ativas. O ciclo estral é controlado pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal por atuação dos hormônios folículo estimulante (FSH), luteinizante (LH), 17 β -estradiol (E2) e progesterona (P4), e ainda por ativinas e inibinas. O corpo lúteo (CL), glândula endócrina presente no diestro de cadelas prenhes e de não prenhes, secreta tanto P4 quanto E2, que atua de maneira autócrina, parácrina e endócrina, controlando a função luteínica. O E2 se liga aos receptores (ERs) alfa (ERa) e beta (ERb), considerados em algumas espécies como luteotrófico e luteolítico, respectivamente. Quimiocinas, como RANTES (CCL5), folistatina (FST) e slit guidance ligand 2 (SLIT2) podem estar relacionados a esses processos e serem regulados pela ligação E2-ERs. Este estudo teve interesse em caracterizar a expressão dos genes CCL5, FST, SLIT2, ESR1 (ERa) e ESR2 (ERb) no CL de cadelas cíclicas não prenhes através da técnica RNAseq, validá-los pelo RT-qPCR. Foram utilizados 30 CLs provenientes de cadelas não prenhes nos dias 10, 20, 30, 40, 50 e 60 após a ovulação (RNAseq n=3/grupo; RT-qPCR n=5/grupo). ESR1 e ESR2 não foram considerados diferencialmente expressos ao RNAseq; CCL5, FST e SLIT2 apresentaram aumento progressivo nas comparações do início em relação ao final do diestro. Ao RT-qPCR, o mRNA de SLIT2 estava mais expresso no dia 60 após a ovulação (p.o.) em relação ao dia 10. O mRNA do ESR2 apresentou aumento na expressão nos dias 20 e 40 p.o. em relação ao dia 30 p.o. Não houve diferença significativa para CCL5, FST e ESR1 ao RT-qPCR. Os resultados sugerem que a expressão de SLIT2 varie ao longo do diestro e responda a interação entre E2 e ERb, contribuindo com os sinais apoptóticos que aparecem durante a regressão luteínica. Apesar do mRNA de FST e CCL5 estarem presentes no CL canino, estes não apresentam variações significativas durante a formação, manutenção e regressão do corpo lúteo. Assim, o papel desta expressão precisa ser melhor investigado.

Palavras-chave: Corpo lúteo. ESR. CCL5. FST. SLIT2.

ABSTRACT

BERTO GOMES, L. A. **Characterization of CCL5, FST and SLIT2 genes in the process of development and regression of corpus luteum of non-pregnant bitches.** 2020. 36f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

The female dog is a monoestric, non-seasonal breeder, which presents anestrus between the active reproductive phases. The estrus cycle is controlled by the hypothalamus-pituitary-ovarian axis by the action of the follicle stimulating (FSH), luteinizing (LH), 17 β -estradiol (E2) and progesterone (P4) hormones, and also by activins and inhibins. The canine corpus luteum (CL), an endocrine gland present along diestrus, secretes both P4 and E2, which acts in an autocrine, paracrine and endocrine manner controlling the luteal function. E2 binds to its receptors alpha (ERa) and beta (ERb), considered in some species as luteotropic and luteolytic, respectively. Chemokines like RANTES (CCL5), follistatin (FST) and slit guidance ligand 2 (SLIT2) can be related to these processes and regulated by E2-ERs. The aim of this study was to characterize expression of CCL5, FST, SLIT2, ESR1 (ERa) and ESR2 (ERb) genes in the cyclic CL through RNAseq technique, validate them by RT-qPCR. Thirty CLs from non-pregnant dogs on days 10, 20, 30, 40, 50 and 60 after ovulation (p.o.) were used (RNAseq n=3/group; RT-qPCR n=5/group). ESR1 and ESR2 were not significantly different in the RNAseq analysis; CCL5, FST and SLIT2 showed progressive increase from day 10 post-ovulation onwards. By RT-qPCR analysis, SLIT2 mRNA was upregulated on the day 60 in comparison to day 10 p.o. ESR2 mRNA was upregulated on days 20 and 40 in comparison to day 30 p.o. CCL5, FST and ESR1 mRNA showed no significant difference. Results suggest that the SLIT2 expression varies through the diestrus and responds to the interaction between E2 and ERb, contributing to the apoptotic signals during the luteal regression. Although FST and CCL5 mRNAs are expressed in the canine CL, they do not present significant variation during the formation, maintenance and regression of the CL. Thus, their role needs further investigation.

Keywords: Corpus luteum. ESR. CCL5. FST. SLIT2.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Análise da expressão gênica (RNAseq) pelo fold change dos genes CCL5, FST, SLIT2, ESR1 e ESR2 nas comparações entre os dias após a ovulação.....26
- Figura 2 – Expressão gênica do CCL5, FST, SLIT2, ESR1 e ESR2 em CLs nos períodos do diestro canino (10 – 60 dias após a ovulação). Os dados são apresentados com a média e o desvio padrão da expressão gênica relativa (n=30, 5 animais por grupo). Diferentes letras indicam diferença significativa ($P<0,05$)27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Primers utilizados na técnica de RT-qPCR	24
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

CL	Corpo lúteo
CYP11A1	Citocromo P450 família 11 subfamília A membro 1/P450 _{scc}
E2	17 β -estradiol
ER	Receptor de estrógeno
ER α	Receptor de estrógeno alfa
ER β	Receptor de estrógeno beta
FDR	Taxa de falsas descobertas
FST	Folistatina
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio regulador de gonadotrofinas
LH	Hormônio luteinizante
mRNA	RNA mensageiro
MPA	Medicação pré-anestésica
P4	Progesterona
PGF2 α	Prostaglandina 2 α
PR	Receptor de progesterona
p.o.	Após a ovulação
RANTES	Quimiocina regulated upon activation, normal T cell expressed
RNA	Ácido ribonucleico
RNAseq	Sequenciamento de RNA
ROBO	Receptor roundabout
RT-qPCR	Reação em cadeia de polimerase quantitativa precedida de transcrição reversa
SLIT	Slit guidance ligant

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	O ciclo estral da cadela.....	16
2.2	O corpo lúteo canino	16
2.3	17b-estradiol e seus receptores.....	17
2.4	Regressão do Corpo Lúteo Canino.....	18
2.5	CCL5 (RANTES).....	18
2.6	Folistatina (FST)	19
2.7	Slit guidance ligand 2 (SLIT2).....	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1	Cadelas	20
3.2	Extração de RNA	21
3.3	Preparação das bibliotecas e sequenciamento do RNA.....	22
3.4	Análise de dados do sequenciamento do RNA	22
3.5	RT-PCR quantitativo (RT-qPCR)	23
3.6	Análise dos resultados do RT-qPCR.....	24
4	RESULTADOS	24
4.1	RNAseq	24
4.2	RT-qPCR.....	26
5	DISCUSSÃO	27
6	CONCLUSÕES	30
	REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

O ciclo reprodutivo das cadelas é objeto de pesquisa, considerando que o diestro tem a duração de uma gestação de 60 dias e envolve uma rede complexa de fatores regulatórios que não apenas as células luteínicas. Durante o diestro, tanto cadelas prenhes quanto as cadelas não prenhes apresentam formação do corpo lúteo (CL) (CONCANNON; MCCANN; TEMPLE, 1989).

O CL é uma glândula responsável pela produção de progesterona (P4) e 17 β -estradiol (E2) no diestro. O E2 atua de forma parácrina e autócrina se ligando aos seus receptores provocando efeitos proliferativos e antiproliferativos (VIVAR et al., 2010; PAPA; HOFFMANN, 2011; BONFIM NETO, 2014; CARDOSO, 2016). O tempo de vida do CL é menor em cadelas gestantes, devido a produção e liberação de prostaglandina F2a (PGF2a) uterina que participa ativamente da luteólise, enquanto nas cadelas não prenhes a regressão luteínica acontece sem participação de PGF2a (HOFFMANN et al., 1999, 2004), indicando que mecanismos parácrinos e autócrinos próprios do CL estão relacionados ao controle endócrino da função luteínica e regressão CL (HOFFMANN et al., 2004; PAPA; HOFFMANN, 2011).

Os processos biológicos que rodeiam a formação, manutenção e regressão do CL cíclico ainda não estão completamente elucidados. A expressão gênica e proteica durante esse período é variável e envolve não apenas as células luteínicas, como também células do sistema imune, endoteliais, fibroblastos, hormônios e quimiocinas (TOWNSON; LIPTAK, 2003; HOFFMANN; BÜSGES; BAUMGÄRTNER, 2004; STOCCO; TELLERIA; GIBORI, 2007; KOWALEWSKI, 2014). As quimiocinas são pequenas proteínas que tem papel importante no controle migratório celular e ativação do sistema imune, as quais estão classificadas em dois grupos, as quimiocinas inflamatórias e as quimiocinas homeostáticas (LUSTER, 1998; RAZ; MAHABALESHWAR, 2009).

Sugere-se que em cadelas, esses processos possam ser mediados também por quimiocinas, como RANTES (CCL5), já que em bovinos e humanos, a atração leucocitária para formação do corpo lúteo é mediada pela expressão de RANTES (CCL5), dentre outras quimiocinas (AUST et al., 1999, 2000), e que possa ser regulado pela interação entre E2 e seus receptores, como observado em queratinócitos humanos (KANDA; WATANABE, 2003); também pela folistatina (FST), proteína reguladora de FSH (ROBERTSON et al., 1987), que pode ser modulada positivamente pelo E2 (GLISTER; GROOME; KNIGHT, 2006); e por SLIT2, proteína relacionada a expressão de caspase-3 que participa ativamente da apoptose

(DICKINSON; MYERS; DUNCAN, 2008), cuja expressão pode ser regulada por E2, como observado em células endometriais humanas (TAMM-ROSENSTEIN et al., 2013).

A partir dos resultados do sequenciamento de RNA (RNAseq) e da identificação dos genes diferencialmente expressos, este estudo avaliou a expressão gênica de CCL5, FST e SLIT2 no corpo lúteo canino ao longo do diestro de cadelas cíclicas, os quais foram validados utilizando o método RT-qPCR, como também dos genes ESR1 e ESR2, uma vez que E2 atue como fator luteotrófico, luteolítico e regulador da regressão do CL, mediante a regulação de genes envolvidos nesse processo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O ciclo estral da cadela

A cadela é um animal monoéstrico, não sazonal, que apresenta uma fase luteínica longa chamada de diestro e, entre os ciclos reprodutivos, um longo anestro, período de inatividade ovariana. Em geral, o ciclo estral da cadela tem duração de 5 a 12 meses, sendo dividido entre pró-estro (13 a 16 dias), estro (4 a 12 dias), diestro (60 a 90 dias) e anestro (15 a 165 dias), e é controlado pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal por atuação dos hormônios folículo estimulante (FSH), luteinizante (LH), 17 β -estradiol (E2) e progesterona (P4) (CONCANNON; MCCANN; TEMPLE, 1989).

Durante a fase de diestro, após a ovulação do oócito, as células da teca e da granulosa proliferam por meio de mitose e sofrem hipertrofia, dando origem, inicialmente, ao corpo hemorrágico e, logo após, ao corpo lúteo (CL) (CONCANNON, 2009). O processo ovulatório envolve inflamação, aumento de permeabilidade vascular, migração celular e edema tecidual (MACHELON; NOMÉ; EMILIE, 2000). Além das células da teca e da granulosa, observa-se participação de células do sistema do imune no processo de luteinização (KOWALEWSKI, 2014).

2.2 O corpo lúteo canino

O CL é uma glândula endócrina temporária presente no diestro de cadelas prenhes e não prenhes, e tem como função principal secretar P4, além de secretar E2 (HOFFMANN et al., 1992; CONCANNON, 1993; PAPA; HOFFMANN, 2011). No sistema reprodutivo, a P4 tem

como função a manutenção da gestação (CONCANNON, 1993), enquanto que o E2 atua como regulador dos processos biológicos, como de crescimento, diferenciação tecidual (HALL; COUSE; KORACH, 2001). Em ratas, sabe-se que E2 induz resposta inflamatória uterina, enquanto que P4 tem ação antagonista ao E2 (TIBBETTS; CONNEELY; O'MALLEY, 1999).

O tempo de vida do CL cíclico é geralmente maior do que em cadelas prenhes, pois nestas, há influência de Prostaglandina F2a (PGF2a) para que o parto ocorra, enquanto em não gestantes, a regressão do CL acontece apesar do aumento da secreção de gonadotrofinas (HOFFMANN et al., 1999, 2004). Desta maneira, mecanismos parácrinos e autócrinos próprios do CL estão relacionados ao controle da função luteínica e regressão CL (HOFFMANN et al., 2004; PAPA; HOFFMANN, 2011).

Em um ciclo de 60 dias, o desenvolvimento do CL é dividido em ovulação (dia 0), desenvolvimento das células luteínicas (do dia 0 ao dia 15), fase de manutenção e atividade secretora (do dia 15 ao dia 45) e regressão do CL (do dia 45 ao dia 60) (SONNACK, 2009). O perfil esteroidogênico varia ao longo do diestro, apresentando aumento progressivo de P4 durante o desenvolvimento da glândula, com pico no dia 20 após a ovulação (p.o.), um declínio e um pequeno aumento do E2 no final da fase de manutenção e no início da fase de regressão, com concentração máxima no dia 40 p.o. (PAPA et al., 2014).

2.3 17 β -estradiol e seus receptores

O controle dos processos reprodutivos pelo E2 acontece de maneira autócrina e parácrina sobre o CL, se ligando aos receptores de estrógeno (ERs): receptor alfa (ERa) e receptor beta (ERb) (PAPA; HOFFMANN, 2011; CARDOSO, 2016). Ambos os receptores pertencem à família dos receptores nucleares e apresentam estruturas similares, embora apresentem diferentes funções em nível proteico. De maneira geral, a expressão do ERa provoca proliferação celular, enquanto que a expressão do ERb, produz efeitos apoptóticos e anti-proliferativos (VIVAR et al., 2010; BONFIM NETO, 2014) e, nas células que apresentam ambos receptores, o ERb tem efeito inibitório sobre ERa (MATTHEWS; GUSTAFSSON, 2003). A expressão dos ERs varia ao longo do diestro, apresentando no início maior expressão de ERa com declínio a partir do dia 40, enquanto que a expressão de ERb é constante, sendo mais expresso próximo da regressão do CL (dia 60) (BONFIM NETO, 2014).

2.4 Regressão do Corpo Lúteo Canino

Ao final do diestro, a regressão do CL é inicialmente observada pelo aumento do espaço intercelular, diminuição da rede capilar, aumento do número de fibras colágenas e outros componentes do tecido conjuntivo, visualização de grandes vesículas lipídicas no citoplasma, evidenciando início da degeneração gordurosa. Progressivamente, observa-se perda de morfologia e tamanho das células luteínicas, início da condensação de cromatina, núcleos picnóticos, vacúolos lipídicos grandes, diminuição no número de mitocôndrias, maior concentração de tecido conjuntivo (KOWALEWSKI, 2014). Paralelamente, há diminuição da produção de P4 (CONCANNON, 2009). Sinais evidentes de apoptose não marcam a regressão luteínica, mas se observa aumento na expressão de proteínas pro-apoptóticas como caspases, 3, 8, 9 e BAX, relacionadas ao aumento da expressão de ERb durante esse período. Além disso, sugere-se que caspase-3 esteja envolvida no processo de regressão funcional e estrutural para formação do corpo albicans em cadelas não prenhes (LUZ et al., 2006; BONFIM NETO, 2014; KOWALEWSKI, 2014).

2.5 CCL5 (RANTES)

RANTES (regulated upon activation, normal T cell expressed), quimiocina codificada pelo gene CCL5, foi observada nas células da granulosa de folículos pré-ovulatórios de mulheres, contribuindo para o recrutamento local de células de defesa, processo ovulatório e formação do CL (AUST et al., 2000; MACHELON; NOMÉ; EMILIE, 2000), além de atrair células T helper-1 e macrófagos (KANANDA; WATANABE, 2003).

As quimiocinas são uma família das citocinas que participam no controle migratório e local de ação das células do sistema imune recrutando leucócitos específicos. A subfamília CC de quimiocinas, também conhecida como beta-quimiocinas, é considerada homeostática pois está envolvida no desenvolvimento e manutenção tecidual: sua ação é baseada na posição dos resíduos de cisteína e, em geral, atrai monócitos e subtipos de neutrófilos por quimiotaxia (OPPENHEIM et al., 1991; PALOMINO; MARTI, 2015). As quimiocinas estão expressas nos folículos ovulatórios e no CL durante a regressão e sua expressão é controlada por hormônios gonadotróficos e pela resposta do sistema imunológico (TOWNSON; LIPTAK, 2003).

Durante o processo de ovulação, leucócitos, como macrófagos e neutrófilos, foram observados na parede do folículo e nas camadas de células da teca de folículos pré-ovulatórios de ovelhas, contribuindo com o processo de ovulação, de luteinização, e de regressão do CL

(CAVENDER; MURDOCH, 1988; MURDOCH; STEADMAN, 1991; BRÄNNSTRÖM; ENSKOG, 2002).

A liberação de RANTES em células cancerígenas mamárias de mulheres foi relacionada à ligação entre E2 e ERs, contribuindo com a angiogênese e com o aumento do infiltrado de macrófagos (SVENSON et al., 2015), também observado em cadelas com piometra, que apresentam aumento da expressão de RANTES, dentre outras citocinas e quimiocinas, contribuindo para o infiltrado leucocitário (BARTOSKOVA et al., 2012). Em queratinócitos humanos provenientes de lesões de psoríase, RANTES contribui com o infiltrado inflamatório e o E2 inibe sua produção mediada por ERb (KANDA; WATANABE, 2003).

2.6 Folistatina (FST)

A folistatina (FST), identificada no fluido folicular ovariano bovino: é uma proteína que regula a função gonadal por inibir a liberação de FSH pela hipófise, ela se liga irreversivelmente à ativina como um receptor e impede que aconteça a ligação da ativina com os receptores de ativina (ROBERTSON et al., 1987; PHILLIPS; DE KRETZER, 1998; SCHNEYER et al., 2000). A FST está expressa pelas células da granulosa de folículos secundários, folículos antrais, folículos pré-ovulatórios e CL (FINDLAY, 1993; FINDLAY et al., 2002; FÁTIMA et al., 2013) e possui papel importante na embriogênese, diferenciação e reparação tecidual, função gonadal, processos inflamatórios, imunológicos, metástase e angiogênese (LIN et al., 2008; SHI et al., 2016; ZABKIEWICZ et al., 2017).

Ativinas e inibinas são expressas e participam do desenvolvimento folicular e do CL, importantes na regulação do ciclo estral da cadela. As ativinas estimulam a produção de E2, participam do desenvolvimento folicular, da ovulação e formação do corpo lúteo, e as inibinas estimulam a produção de P4 e exercem feedback negativo sobre a liberação de FSH por regular as ativinas (MARINO; ZANGHÌ, 2012; NAGASHIMA et al., 2019).

Observa-se em células da granulosa de bovinos que, a interação entre FST e ativina/inibina está relacionada à proliferação e crescimento celular, regulação da apoptose e esteroidogênese (CHONG et al., 2015); E2 regula a expressão de mRNA FST durante proestro e estro de ratas (ALOI et al., 1997); e o silenciamento de FST promove o aumento de expressão de ativina, aumento na expressão de caspase-3 e redução de E2 sem afetar concentração de P4 em células da granulosa de bovinos (CHONG et al., 2015). Além disso, FST está mais expresso em folículos bovinos estimulados e superovulados, ambos com eCG (FÁTIMA et al., 2013).

2.7 Slit guidance ligand 2 (SLIT2)

A regressão luteínica ainda não está completamente elucidada. A participação de caspases-3 durante a regressão funcional e estrutural sugere que outros mecanismos possam estar envolvidos para que ela seja expressa (BONFIM NETO, 2014). SLITs, slit guidance ligands, são proteínas com potencial de ação parácrina e autócrina, se ligam aos receptores transmembrânicos roundabout (ROBO), promovendo tumorigênese, apoptose e inibindo a migração celular (DICKINSON; MYERS; DUNCAN, 2008; ZHANG et al., 2013).

SLIT2 (slit guidance ligand 2), membro da família SLIT, encontra-se mais expresso no citoplasma de células luteínicas e em fibroblastos durante a fase de regressão do CL, quando se observa aumento na morte celular e luteólise estrutural, e a ligação SLIT/ROBO está relacionada à ativação de caspase-3 e, conseqüentemente, apoptose (DICKINSON; MYERS; DUNCAN, 2008). Os primeiros sinais de apoptose e expressão de caspase-3 foram observadas em CL de cadelas cíclicas entre os dias 60 e 80 p.o. (SONNACK, 2009). Em ratas, observou-se alta aumento da expressão de caspase-3 relacionada a interação SLIT/ROBO durante a apoptose no estágio final do CL, o que nessa espécie, é regulada por PGF2a (ZHANG et al., 2013). De modo contrário, na presença de P4, observa-se inibição da apoptose em células luteínicas, por inibir a expressão de SLIT2/ROBO1 e caspase 3 (ZHANG et al., 2017). Além disso, SLIT2 atua como supressor tumoral, mesmo em presença de E2, promovendo declínio na proliferação e capacidade migratória celular, degradação da β -catenina, inibição da atividade de PI3K e diminuição do tamanho celular (PRASAD et al., 2008).

Redução na expressão de SLIT2 foi observada tanto em células endometriais humanas tratadas com E2 (TAMM-ROSENSTEIN et al., 2013), como também em linfonodos metastáticos, adenomas e carcinomas mamários caninos, nos quais se observou também variada expressão de ERa e redução na expressão de PR (KLOPFLEISCH; KLOSE; GRUBER, 2010), o que sugere que a expressão de SLIT2 seja modificada por ação de E2.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cadelas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil (protocolos

nº: 8055170619 e nº: 2719/2012). O estudo foi conduzido utilizando CLs provenientes de 18 cadelas não gestantes (n=3 por grupo) para análise de Sequenciamento de RNA (RNAseq) para escolha dos genes alvo e, posteriormente, somado à outros CLs provenientes de 12 cadelas não gestantes, totalizando 30 cadelas, foi realizada a análise de RT-qPCR s (n=5 por grupo). As cadelas não tinham raça definida, tinham idade entre um e seis anos, não eram obesas e encontravam-se clinicamente híginas. Os grupos experimentais foram definidos através do monitoramento da função ovariana pela determinação dos níveis séricos de P4, em dias alternados, a partir do surgimento dos primeiros sinais de proestro (edema e secreção vulvar sanguinolenta) e o dia da ovulação (dia 0) foi definido como o dia em que a concentração sérica de P4 atingiu valores iguais a 5ng/ml (CONCANNON, 2009).

Os animais foram submetidos à ovariosalpingohisterectomia (OSH) nos dias 10, 20 30, 40, 50 e 60 após a ovulação (p.o; n=5 por grupo). O protocolo de anestesia utilizado para a realização da OSH foi: medicação pré-anestésica (MPA) com acepromazina 0,2% na dose de 0,02mg/kg associado à petidina 3mg/kg por via intramuscular; indução anestésica utilizando propofol 3mg/kg, diazepam 0,5mg/kg, cloridrato de quetamina 0,1mg/kg por via intravenosa, e isoflurano (10ml) para manutenção do plano anestésico por via inalatória. Durante o transoperatório, os parâmetros dos animais foram monitorados. Para o pós-operatório foram utilizados dipirona 25mg/kg, meloxicam 0,1mg/kg e cefalexina 30mg/kg.

Após a cirurgia, os CLs foram coletados e armazenados em nitrogênio líquido para a extração do RNA, análise de RNAseq e RT-qPCR.

3.2 Extração de RNA

A partir do material coletado, foi realizado o protocolo para extração de RNA total do tecido luteínico por meio do reagente TRIzol®, de acordo com as instruções do fabricante (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

Utilizando tubos eppendorf de 1,5ml livres de RNase foi adicionado 1ml da solução Trizol® com o lisado tecidual. As amostras foram homogeneizadas em Polytron em velocidade máxima de três ciclos e, então, agitadas em vórtex por 10 segundos, centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Tendo concluída essa etapa, o sobrenadante foi coletado e armazenado em outro tubo livre de RNase e ao tubo foram adicionados 200 µL de clorofórmio para cada um ml de Trizol®. A amostra foi agitada novamente em vórtex por 30 segundos, e incubada por 3 minutos em temperatura ambiente.

Feito isso, as amostras foram centrifugadas novamente a 12.000rpm por 10 minutos a 4°C. Foi coletada a camada superior com RNA total nos tubos e transferidos para outro eppendorf livre de RNA, ao qual foi adicionado 1ml de etanol 75% diluído em água ultrapura. Em seguida, foi feita nova centrifugação a 9.000rpm por 5 minutos a 4°C e todo conteúdo do eppendorf foi descartado, com exceção do precipitado aderido ao tubo. As amostras foram mantidas por 10 minutos em temperatura ambiente para secagem e depois adicionados 20 µL de água ultrapura para solubilização.

Uma alíquota foi removida para quantificação e avaliação de pureza através do RNA no aparelho NanoDrop™ 2000c (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA). As amostras foram diluídas a uma concentração de 200 ng/µl. O número de integridade do RNA (NIR) foi avaliado pelo software Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). O restante do material foi armazenado em freezer à -80°C para realização do procedimento de transcrição reversa.

3.3 Preparação das bibliotecas e sequenciamento do RNA

Segundo Cardoso (2016), os dados do RNAseq foram construídos utilizando 150ng do total de RNA com o kit TruSeq RNA sample Prep (Illumina, San Diego, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade dos dados foi avaliada utilizando o Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) com DNA chip 1000. Dados contendo fragmentos de tamanho médio de 260bp foram considerados válidos. As concentrações dos dados individuais foram determinadas por RT-PCR quantitativo utilizando o kit KAPA Library Quantification (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, EUA).

O sequenciamento foi realizado por meio do Illumina HiSeq 200 utilizando o protocolo de leitura de pares e o kit cluster Illumina TruSeq PE v3-cBotHS (Illumina), de acordo com as instruções do fabricante. Dezoito amostras medindo em média 100bp foram incluídas e sequenciadas.

3.4 Análise de dados do sequenciamento do RNA

Os dados do RNAseq foram analisados através dos dados que foram obtidos e processados por meio do software Casava 8.2 (Illumina, San Diego, CA, EUA). As leituras foram mapeadas em relação ao genoma de referência (canis_familiares.CanFam 3.1.75.dna.toplevel.fa) usando o TopHat v2.0.9 e as transcrições foram montadas usando o

Cufflinks. A abundância relativa de transcritos de fragmentos de RNAseq foi medida em FPKM (Fragments per kilobase of exon per million fragments mapped). Para cada gene, foi comparado em pares o nível de expressão entre os grupos. Através do Cufflinks, inicialmente foi calculado em logaritmo a razão entre FPKM e os representantes de cada grupo, então foi realizado o método delta para estimativa da razão de log. O método estatístico é a razão de log de FPKM dividido pelo desvio padrão da razão de log (TRAPNELL et al., 2012).

A expressão gênica foi considerada diferente se o valor de P ajustado ao FDR fosse < 0,05. Os genes com valores de fold change maiores que 1,5 e menores que 1,5, indicaram maior e menor expressão gênica, respectivamente (RAOUF et al., 2008).

3.5 RT-PCR quantitativo (RT-qPCR)

Após análise dos dados do RNAseq, os genes alvos escolhidos foram validados através da técnica de RT-PCR quantitativo (RT-qPCR). As análises de RT-qPCR foram realizadas através de um fluorômetro automatizado ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Amostras de RNA total foram submetidas à transcrição reversa utilizando o kit Superscript III®, seguindo as instruções do fabricante (Life Technologies, EUA). Os primers dos genes alvos CCL5, FST e SLIT2, e os primers dos genes de referência KDM4A, EIF4H e PTK2 (Tabela 1), foram adquiridos através do serviço TaqMan® Assays – Gene expression (Life Technologies, EUA). Os primers ESR1 e ESR2 (Tabela 1) foram projetados com sondas marcadas com 6-carboxifluoresceína (6-FAM) e 6-carboxitetrametil-rodamina (TAMRA) e encomendados à Microsynth AG (Balgach, Suíça). Em placa de 96 poços ópticos contendo 31,25ng de cDNA diluídos em 5µl de água ultrapura foram adicionados a uma mistura contendo 12,5µl de TaqMan® Universal PCR Master Mix buffer (Life Technologies, EUA); 1 µl de primer (Life Technologies, EUA) e 6,5 µl de água, totalizando um volume final de 25µl. Todos os poços foram selados com adesivo ótico MicroAmp Optical Adhesive Covers (Life Technologies, EUA), seguido de homogeneização dos reagentes. Em seguida, foram empregados os seguintes ciclos: 2min a 50°C, 10min a 95°C e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C (desnaturação) e 1 min a 60°C (anelamento e extensão).

Tabela 1 Primers utilizados na técnica de RT-qPCR.

Primers	Sequência	Sequência de referência
CCL5	Cf02741640_m1	NM_001003010.2
FST	Cf02705957_s1	XM_005619457.2
SLIT2	Cf01061415_m1	XM_014112671.1
ESR1	XM533454	Forward: 5' -CCC ATG GAG ACA AAC CA-3' Reverse: 5' -CCC TGC CTC GGT GAT ATA-3' TaqMan probe: 5' -CAC GGG CCC AAC TTC ATC ACA TTC C-3'
ESR2	XM861041	Forward: 5' -CCC AGC ACG CCC TTC A-3' Reverse: 5' -AAT CAT ATG CAC GAG TTC CTT GTC-3' TaqMan probe: 5' -CCT CCA TGA TGA TGT CCC TGA CC-3'
KDM4A	Cf02708629_m1	XM_005629106.2
EIF4H	Cf02713640_m1	XM_014114129.1
PTK2	Cf02684608_m1	XM_005627993.2

Fonte: Berto Gomes (2020).

Os RT-qPCRs foram conduzidos em duplicatas para cada amostra, sendo utilizados para a amplificação os genes alvos CCL5, FST, SLIT2, ESR1 e ESR2 e os genes de referência KDM4A, EIF4H e PTK2. Para normalizar os resultados obtidos pelos genes alvos, utilizamos a média das expressões relativas do gene alvo e dos três genes de referência. O cálculo de quantificação relativa dos genes alvo foi feito pelo 2DDCt (PFAFFL, 2001).

3.6 Análise dos resultados do RT-qPCR

Os resultados do RT-qPCR foram analisados e utilizado o teste Kruskal-Wallis seguido do Teste de Comparações Múltiplas de Dunn. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Estas análises foram realizadas no programa estatístico GraphPad InStat (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 RNAseq

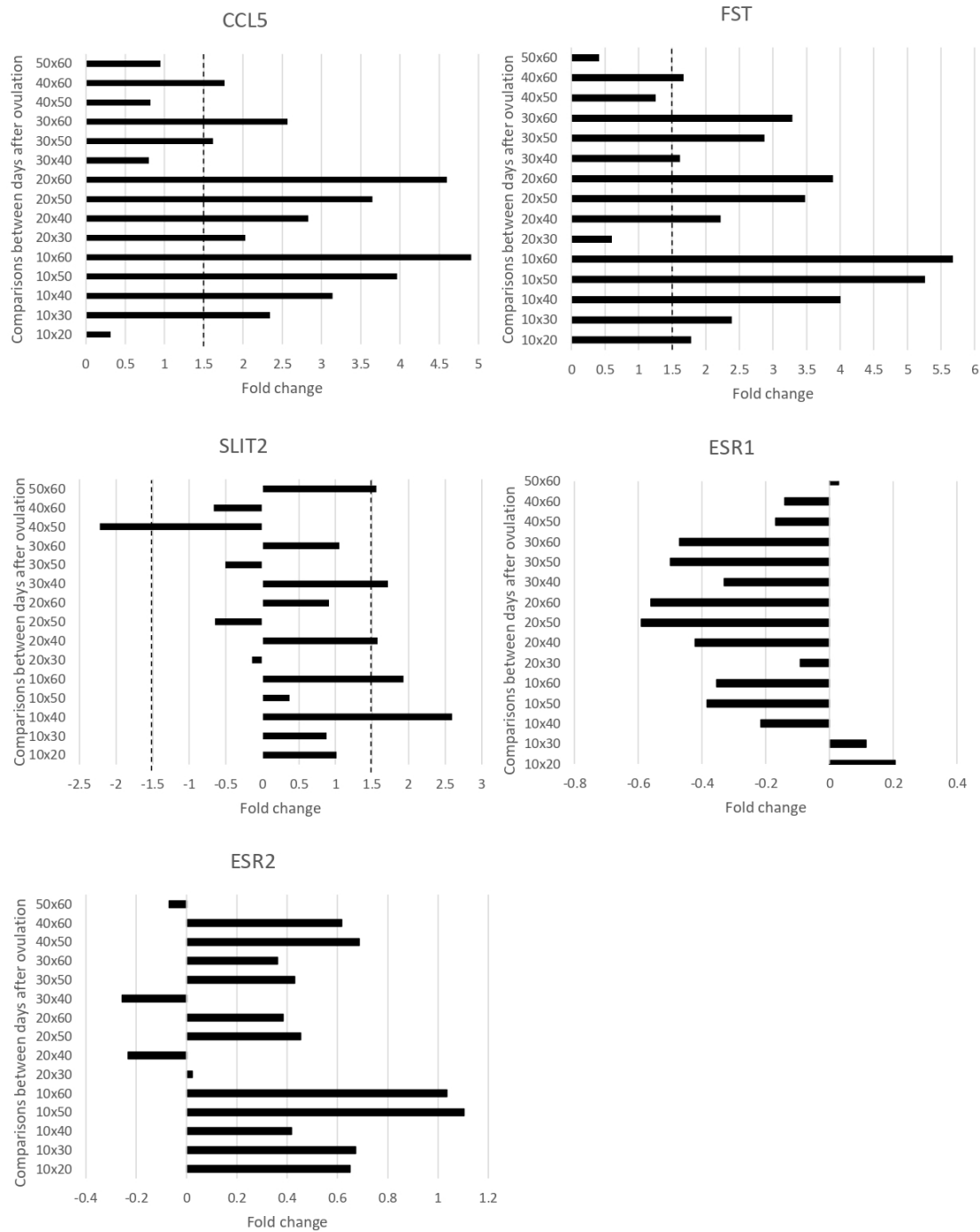
Um total de 771.208.718 reads foram gerados pelo Illumina HiScanSeq com um tamanho médio de 100 bp, cada amostra produziu 42 milhões de reads. 673.577.446 (87,3%)

reads do total foram mapeados no genoma canino. As análises de leituras detectaram 34.408 genes, dos quais 9.000 não estão anotados no genoma canino. Foram detectados 29.011 genes com alguma expressão ao longo do diestro. A análise de expressão gênica revelou a presença de 5.116 genes diferencialmente expressos em pelo menos uma comparação e 1.106 genes ainda não estão anotados no genoma canino.

Destes genes, caracterizamos a expressão de CCL5, FST, SLIT2, ESR1 e ESR2 e as análises foram feitas segundo os valores de fold change nas comparações entre os dias 10x20, 10x30, 10x40, 10x50, 10x60, 20x30, 20x40, 20x50, 20x60, 30x40, 30x50, 30x60, 40x50, 40x60 e 50x60.

A análise do gene CCL5 mostrou maior expressão nos dias 30, 40, 50 e 60 em relação ao dia 10 p.o., nos dias 30, 40, 50 e 60 em comparação com o dia 20 p.o., nos dias 50 e 60 em comparação com o dia 30 p.o., e maior expressão no dia 60 em comparação com o dia 40 p.o. O gene FST se mostrou mais expresso nas comparações dos dias 20, 30, 40, 50 e 60 em comparação com o dia 10 p.o., houve um aumento da expressão nas comparações dos dias 40, 50, 60 em relação ao dia 20 p.o., dos dias 40, 50 e 60 em comparação com o dia 30 p.o. e do dia 60 em comparação com o dia 40. Já o gene SLIT2 se mostrou mais expresso nos dias 40 e 60 em comparação com o dia 10 p.o., no dia 40 em relação aos dias 20, 30 e 50 p.o., e no dia 60 em relação ao dia 50 p.o. Para as análises dos genes ESR1 e ESR2, não foi observada diferença significativa (Figura 1).

Figura 1 Análise da expressão gênica (RNAseq) pelo fold change dos genes CCL5, FST, SLIT2, ESR1 e ESR2 nas comparações entre os dias após a ovulação.



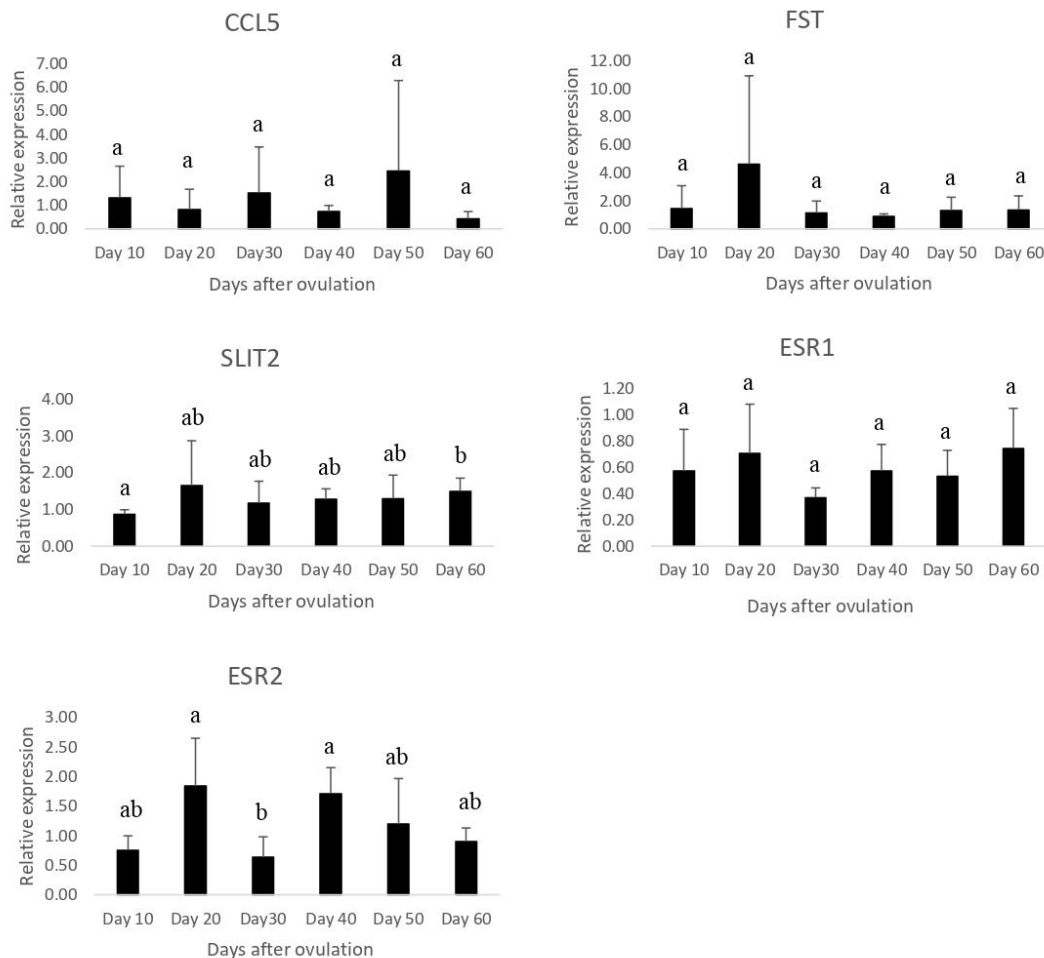
Fonte: Berto Gomes (2020).

4.2 RT-qPCR

Não houve diferença significativa na expressão relativa de mRNA de CCL5, FST e ESR1 durante os dias do diestro de cadelas cíclicas. A expressão de mRNA de SLIT2 está

aumentada no dia 60 em comparação com o dia 10 p.o. ($p<0,01$). O gene ESR2 apresentou menor expressão de mRNA no dia 30 em comparação com os dias 20 e 40 p.o. ($p<0,05$) (Figura 2).

Figura 2 Expressão gênica do CCL5, FST, SLIT2, ESR1 e ESR2 em CLs nos períodos do diestro canino (10 – 60 dias p.o). Os dados são apresentados com a média e o desvio padrão da expressão gênica relativa ($n=30$, 5 animais por grupo). Diferentes letras indicam diferença significativa ($P<0,05$).



Fonte: Berto Gomes (2020).

5 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo revelam a expressão gênica de CCL5, FST, SLIT2, ESR1 e ESR2 no corpo lúteo de cadelas cíclicas ao longo do diestro. Não houve diferença significativa na expressão de mRNA CCL5, FST e ESR1, enquanto que ao RNAseq, observa-se um aumento progressivo da expressão de CCL5 e FST ao longo da fase luteínica. Ao RT-qPCR, expressão

de mRNA SLIT2 estava aumentada no dia 60 p.o. em relação ao dia 10 p.o., também observado ao RNAseq.

Segundo Everaerte et al., (2017), há em geral concordância entre os resultados obtidos no RT-qPCR em comparação com o RNAseq, porém existem casos em que os resultados do RNAseq podem divergir para genes de menor tamanho e com poucos exons. Há ainda uma dificuldade em se identificar previamente quais são esses genes, embora ambos os métodos, RNAseq e RT-qPCR, sejam acurados (ROBERT; WATSON, 2015). Desse modo, nossos resultados foram analisados pelo RNAseq e validados pelo RT-qPCR, mas nem sempre houve concordância entre ambos. Ademais, as análises de RNAseq foram realizadas a partir de 3 amostras por grupo e as validações por RT-qPCR com 5 amostras por grupo. Incluímos, portanto, maior variabilidade genética, o que pode contribuir para as diferenças encontradas quando validamos o RNAseq por meio de RT-qPCR (COSTA et al., 2013; SCHURCH et al., 2016).

De acordo com nossos resultados, o aumento significativo na expressão de mRNA SLIT2 no RT-qPCR e RNAseq no final do diestro, paralelamente à redução na concentração de P4 (PAPA et al., 2014), sugere que ele participe ativamente da regressão do CL, contribuindo com os discretos sinais apoptóticos nessa fase. Mudanças estruturais e funcionais no CL com diminuição da produção de P4 marcam a regressão luteínica na cadela (HOFFMANN et al., 2004).

Zhang et al., (2017) observaram redução na expressão de SLIT2/ROBO1, diminuição na porcentagem de células apoptóticas e na expressão gênica de caspase-3 no CL de ratas ao aumento de P4, um hormônio inibidor da apoptose, indicando participação de SLIT2 na regulação da luteólise. O aumento da expressão de mRNA do SLIT2 também foi observado no CL humano durante a fase de regressão luteínica (DICKINSON; MYERS; DUNCAN, 2008). De mesmo modo, em cadelas cíclicas foram descritos os discretos sinais apoptóticos e presença de caspase-3 observados durante a regressão celular (LUZ et al., 2006; BONFIM NETO, 2014; KOWALEWSKI, 2014). A diminuição da atividade de caspase-3 foi observada ao bloqueio de SLIT2 em células da granulosa luteinizadas (DICKINSON; MYERS; DUNCAN, 2008) e em células luteínicas de ratas (ZHANG et al., 2013).

O aumento da expressão de SLIT2 ao final do diestro tanto no RT-qPCR quanto ao RNAseq pode estar relacionado a maior interação de E2 com ER β , contribuindo com a supressão da atividade luteínica, assim como observado por Bonfim Neto (2014) em CL de cadelas. A ligação entre E2 e ER β reduz a expressão de CYP11A1 (citocromo P450 família 11 subfamília A membro 1/P450 $_{scc}$) (BONFIM NETO, 2014), enzima conversora de colesterol

em pregnenolona, precursora da P4 (RENNERT et al., 1990), permitindo maior expressão de SLIT2.

Além disso, a redução da atividade de b-catenina pela via Wnt foi relatada em tumores mamários de ratas ao serem submetidas à altas concentrações de SLIT2 associada a presença de E2, configurando função de supressor tumoral (PRASAD et al., 2008). A via Wnt/b-catenina está relacionada a proliferação e diferenciação celular (CADIGAN; NUSSE, 1997; MILLER et al., 1999) que, no CL canino, é mediada pela ligação E2-ERα na primeira metade do diestro, embora a expressão de mRNA de b-catenina não tenha apresentado diferença significativa ao longo da mesma fase (CARDOSO, 2016).

Com base nos nossos resultados, não foi possível estabelecer como a P4 interfere na expressão de SLIT2. Contudo, sugerimos que a expressão de SLIT2 ao final do diestro de cadelas não prenhes seja importante para a regressão do corpo lúteo.

As quimiocinas, como o CCL5, são expressas nos folículos ovulatórios, e no CL, predominantemente durante a regressão luteínica (TOWNSON; LIPTAK, 2003). Os dados do RNAseq detectaram um aumento progressivo de CCL5 ao longo do diestro, por outro lado, a validação dessa expressão ao RT-qPCR mostrou que não houve variação significativa de mRNA de CCL5 nas análises durante o mesmo período. A falta de variação corrobora com os resultados nos quais quimiocinas como CCL3 e CCL13, da mesma família que CCL5, não apresentam variações significativas durante a formação, manutenção e regressão luteínica de cadelas cíclicas (ZATTA et al., 2017). Por isso, embora a diminuição de CCL5 tenha sido relacionada a interação de E2 com ERβ em queratinóticos de humanos (KANDA; WATANABE, 2003), sugerimos que a interação de E2 com seus receptores não influencie a expressão de CCL5 durante a fase luteínica.

O aumento observado de FST pelo RNAseq ao final do diestro não foi validado através da análise de RT-qPCR, no qual a expressão de mRNA de FST não apresentou variação significativa.

Identificada inicialmente no fluido folicular bovino, a FST é uma proteína importante na regulação da liberação de FSH pela hipófise, pois age se ligando à ativina (ROBERTSON et al., 1987; PHILLIPS; DE KRETZER, 1998; SCHNEYER et al., 2000), e é expressa pelas células da granulosa de folículos secundários, folículos antrais, folículos pré-ovulatórios e na fase inicial do CL (FINDLAY, 1993; FINDLAY et al., 2002; FÁTIMA et al., 2013).

Em cadelas, ativinas têm participação importante na fase folicular do ciclo estral, principalmente nos folículos antrais, atuando sinergicamente com FSH em promoção do crescimento, expansão da cavidade e sobrevivência dos folículos (NAGASHIMA et al., 2019),

contribui na diferenciação e proliferação das células da granulosa e aumento da expressão de receptores de FSH, tornando os folículos mais dependentes de gonadotrofinas, enquanto as inibinas regulam a proliferação celular e a liberação de E2 (MARINO; ZANGHÌ, 2012).

Nossos resultados sugerem que a FST não tenha participação significativa durante o diestro nas variações de E2 encontrada nessa fase (KOWALEWSKI, 2017). Contudo, baseado no que foi exposto, sugerimos que a FST tenha participação na fase folicular do ciclo estral das cadelas, como observado em outras espécies como vacas e ratas, contribuindo com a regulação da liberação de FSH, desenvolvimento folicular e controle da liberação de E2 (ALOI et al., 1997; CHONG et al., 2015), regulando as ativinas, em conjunto com as inibinas (MARINO; ZANGHÌ, 2012; NAGASHIMA et al., 2019). Ainda, sugerimos que a expressão de FST durante o diestro pode ser importante para manutenção dos níveis de FSH, contribuindo para o início do anestro, período no qual se observa completa redução da atividade esteroidogênica (OLSON et al., 1982; CONCANNON, 2009).

As expressões de mRNA de ESR1 e ESR2 encontradas nas nossas análises diferem dos resultados obtido por Bonfim Neto (2014), que descreveu aumento significativo de mRNA de ESR1 durante o primeiro terço do diestro e de ESR2 nos dias 60 e 70 p.o. em comparação com os dias anteriores da fase luteínica. Já Papa e Hoffmann (2011) descreveram um aumento significativo de ESR1 no dia 25 p.o., enquanto que mRNA de ESR2 não apresentou diferença significativa. Nossos resultados mostram que não houve variação na expressão de mRNA de ESR1, enquanto que o mRNA ESR2 foi mais expresso nos dias 20 e 40 p.o. Tais resultados podem estar relacionados a variação individual de E2 nas cadelas durante o diestro (HOFFMANN et al., 1992; KOWALEWSKI, 2017) e afetam a expressão de ERa/ESR1 e ERb/ESR2, que por sua vez regulam diferentes genes produzindo efeitos proliferativos e anti-proliferativos, respectivamente (VIVAR et al., 2010; BONFIM NETO, 2014).

Desse modo, sugerimos que a variação encontrada entre E2 e seus receptores, observada ao longo do diestro não altere a expressão do mRNA de CCL5 e FST. Por outro lado, a ligação entre E2 e ERb ao final do diestro pode ser um fator que permita maior expressão de mRNA de SLIT2, sugerindo que este participe de forma complementar na regressão do corpo lúteo canino.

6 CONCLUSÕES

Com base em nossos resultados, podemos concluir que a expressão de SLIT2 varia ao longo do diestro canino e pode responder à interação entre E2 e ERb contribuindo para o

aparecimento dos sinais apoptóticos durante a regressão luteínica. Apesar do mRNA de FST e CCL5 estarem presentes no CL canino, estes não apresentam variações significativas durante a formação, manutenção e regressão do corpo lúteo. Assim, o papel desta expressão precisa ser melhor investigado.

REFERÊNCIAS

- ALOI, J. A. et al. Ovarian Activin Receptor Subtype and Follistatin Gene Expression in Rats: Reciprocal Regulation by Gonadotropins1. **Biology of Reproduction**, v. 56, n. 6, p. 1565–1569, 1997.
- AUST, G. et al. Cloning of bovine RANTES mRNA and its expression and regulation in ovaries in the periovulatory period. v. 463, p. 160–164, 1999.
- AUST, G. et al. Eosinophils in the human corpus luteum : the role of RANTES and eotaxin in eosinophil attraction into periovulatory structures. v. 6, n. 12, p. 1085–1091, 2000.
- BARTOSKOVA, A. et al. $\gamma\delta$ T lymphocytes are recruited into the inflamed uterus of bitches suffering from pyometra. **Veterinary Journal**, v. 194, n. 3, p. 303–308, 2012.
- BONFIM NETO, A. P. O papel do 17β -estradiol no processo luteolítico de cadelas não prenhes São Paulo. **Universidade de São Paulo**, 2014.
- BRÄNNSTRÖM, M.; ENSKOG, A. Leukocyte networks and ovulation. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 57, n. 1–2, p. 47–60, 2002.
- CADIGAN, K. M.; NUSSE, R. Wnt signaling: A common theme in animal development. **Genes and Development**, v. 11, n. 24, p. 3286–3305, 1997.
- CARDOSO, A. P. M. M. **Mecanismo de ação do 17β -estradiol no corpo lúteo de cadelas não prenhes**. 2016. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2016.
- CAVENDER, J. L.; MURDOCH, W. J. Studies of the Microcirculatory of Periovulatory. **Biology of reproduction**, v. 39, n. 1, p. 989–997, 1988.
- CHONG, Z. et al. Disruption of follistatin by RNAi increases apoptosis, arrests S-phase of cell cycle and decreases estradiol production in bovine granulosa cells. **Animal Reproduction Science**, v. 155, p. 80–88, 2015.
- CONCANNON, P. W. Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, 1993.
- CONCANNON, P. W. Endocrinologic Control of Normal Canine Ovarian Function. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 3–15, 2009.
- CONCANNON, P. W.; MCCANN, J. P.; TEMPLE, M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, 1989.
- COSTA, C. et al. Comprehensive molecular screening: From the RT-PCR to the RNA-seq. **Translational Lung Cancer Research**, v. 2, n. 2, p. 87–91, 2013.

DICKINSON, R. E.; MYERS, M.; DUNCAN, W. C. Novel Regulated Expression of the SLIT / ROBO Pathway in the Ovary : Possible Role during Luteolysis in Women. **Endocrinology**, v. 149, n. September, p. 5024–5034, 2008.

EVERAERT, C. et al. Benchmarking of RNA-sequencing analysis workflows using whole-transcriptome RT-qPCR expression data. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.

FÁTIMA, L. A. et al. Global gene expression in the bovine corpus luteum is altered after stimulatory and superovulatory treatments. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, n. 7, p. 998–1011, 2013.

FINDLAY, J. K. An Update on the Roles of Inhibin, Activin, and Follistatin as Local Regulators of Folliculogenesis1. **Biology of Reproduction**, v. 48, n. 1, p. 15–23, 1993.

FINDLAY, J. K. et al. Recruitment and development of the follicle ; the roles of the transforming growth factor- b superfamily. **Molecular and Cellular Biology**, v. 191, p. 35–43, 2002.

GLISTER, C.; GROOME, N. P.; KNIGHT, P. G. Bovine follicle development is associated with divergent changes in activin-A, inhibin-A and follistatin and the relative abundance of different follistatin isoforms in follicular fluid. **Journal of Endocrinology**, v. 188, n. 2, p. 215–225, 2006.

HALL, J. M.; COUSE, J. F.; KORACH, K. S. The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 40, p. 36869–36872, 2001.

HOFFMANN, B. et al. Ovarian and pituitary function in dogs after hysterectomy. **Journal of Reproduction and Fertility LTD**, v. 96, p. 837–845, 1992.

HOFFMANN, B. et al. Aspects on hormonal control of normal and induced parturition in the dog. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 34, n. 3–4, p. 219–226, 1999.

HOFFMANN, B. et al. Regulation of Corpus Luteum-function in the Bitch. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, p. 232–240, 2004.

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. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, n. 6, p. 391–395, 2004.

KANDA, N.; WATANABE, S. 17 β -estradiol inhibits the production of RANTES in human keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 120, n. 3, p. 420–427, 2003.

KLOPFLEISCH, R.; KLOSE, P.; GRUBER, A. D. The combined expression pattern of BMP2, LTBP4, and DERL1 discriminates malignant from benign canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v. 47, n. 3, p. 446–454, 2010.

KOWALEWSKI, M. P. Luteal regression vs . prepartum luteolysis : Regulatory mechanisms governing canine corpus luteum function. **Reproductive Biology**, p. 1–14, 2014.

KOWALEWSKI, M. P. **Regulation of Corpus Luteum Function in the Domestic Dog (*Canis familiaris*) and Comparative Aspects of Lutel Function in the Domestic Cat (*Felis Catus*)**. Meidan, R ed. [s.l.] Springer International Publishing, 2017.

LIN, S. et al. Female Infertility and Disrupted Angiogenesis Are Actions of Specific Follistatin Isoforms. **Molecular Endocrinology**, v. 22, n. October, p. 415–429, 2008.

LUSTER, A. D. Chemokines - Chemotactic cytokines that mediate inflammation. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, p. 436–45, 1998.

LUZ, M. R. et al. Canine corpus luteum regression: Apoptosis and caspase-3 activity. **Theriogenology**, v. 66, n. 6–7, p. 1448–1453, 2006.

MACHELON, V.; NOMÉ, F.; EMILIE, D. Regulated on activation normal T expressed and secreted chemokine is induced by tumor necrosis factor-alpha in granulosa cells from human preovulatory follicle. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabmolism**, v. 85, n. 1, p. 417–24, 2000.

MARINO, G.; ZANGHÌ, A. Activins and inhibins: Expression and role in normal and pathological canine reproductive organs: A review. **Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia**, v. 42, n. 1, p. 1–8, 2012.

MATTHEWS, J.; GUSTAFSSON, J.-åke. Estrogen signaling: a subtle balance between Er alpha and Er beta. **Molecular Interventions**, v. 3, n. 5, p. 281–292, 2003.

MILLER, J. R. et al. Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/B-catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways. **Oncogene**, v. 18, n. 55, p. 7860–7872, 1999.

MURDOCH, J.; STEADMAN, L. E. Investigations concerning the relationship of ovarian eosinophilia to ovulation and luteal function in the sheep. **AJRI Fertility Immunology**, v. 25, p. 81–87, 1991.

NAGASHIMA, J. B. et al. Activin promotes growth and antral cavity expansion in the dog ovarian follicle. **Theriogenology**, v. 129, p. 168–177, 2019.

OLSON, P. N. et al. Concentrations of Reproductive Hormones in Canine Serum Throughout Late Anestrus, Proestrus and Estrus1. **Biology of Reproduction**, v. 27, n. 5, p. 1196–1206, 1982.

OPPENHEIM, J. J. et al. Properties of the novel proinflammatory supergene “intercrine” cytokine family. **Annual Review of Immunology**, v. 9, p. 617–48, 1991.

PALOMINO, D. C. T.; MARTI, L. C. Chemokines and immunity. **Einstein**, v. 13, n. 3, p. 469–473, 2015.

PAPA, P. C.; HOFFMANN, B. The Corpus Luteum of the Dog: Source and Target of Steroid Hormones? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 4, p. 750–756, 2011.

PAPA, P. D. C. et al. Glucose transporter 1 expression accompanies hypoxia sensing in the

cyclic canine corpus luteum. v. 1, 2014.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, 2001.

PHILLIPS, D. J.; DE KRETZER, D. M. Follistatin: A multifunctional regulatory protein. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 19, n. 4, p. 287–322, 1998.

PRASAD, A. et al. Slit-2 Induces a Tumor-suppressive Effect by Regulating β -Catenin in Breast Cancer Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 39, p. 26624–26633, 2008.

RAOUF, A. et al. Transcriptome analysis of the normal human mammary cell commitment and differentiation process. **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 1, p. 109–118, 2008.

RAZ, E.; MAHABALESHWAR, H. Chemokine signaling in embryonic cell migration: A fish-eye view. **Development**, v. 136, n. 8, p. 1223–1229, 2009.

RENNERT, H. et al. Generation of regulatory oxysterols: 26-hydroxylation of cholesterol by ovarian mitochondria. **Endocrinology**, v. 127, n. 2, p. 738–746, 1990.

ROBERT, C.; WATSON, M. Errors in RNA-Seq quantification affect genes of relevance to human disease. **Genome Biology**, v. 16, n. 1, p. 1–16, 2015.

ROBERTSON, D. M. et al. The isolation of polypeptides with FSH suppressing activity from bovine follicular fluid which are structurally different to inhibin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 149, n. 2, p. 744–749, 1987.

SCHNEYER, A. L. et al. Dynamic Changes in the Intrafollicular Inhibin/Activin/Follistatin Axis during Human Follicular Development: Relationship to Circulating Hormone Concentrations 1. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 85, n. 9, p. 3319–3330, 2000.

SCHURCH, N. J. et al. How many biological replicates are needed in an RNA-seq experiment and which differential expression tool should you use? **Rna**, v. 22, n. 6, p. 839–851, 2016.

SHI, L. et al. Clinical and Therapeutic Implications of Follistatin in Solid Tumors. **Cancer Genomics and Proteomics**, v. 13, p. 425–436, 2016.

SONNACK, M. **Untersuchungen zur Bildung, Regression und Funktionalität des Corpus luteum der nicht graviden Hündin: morphologische und biochemische Aspekte**. 2009. VVB Laufersweile Verlag, Giessen, Germany, 2009.

STOCCO, C.; TELLERIA, C.; GIBORI, G. The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function, and Regression. **Endocrine Reviews**, v. 28, n. 1, p. 117–149, 2007.

SVENSON, S. et al. CCL2 and CCL5 are novel therapeutic targets for estrogen-dependent breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 16, p. 3794–3805, 2015.

TAMM-ROSENSTEIN, K. et al. Changes in the Transcriptome of the Human Endometrial Ishikawa Cancer Cell Line Induced by Estrogen, Progesterone, Tamoxifen, and Mifepristone (RU486) as Detected by RNA-Sequencing. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 2013.

TIBBETTS, T. A.; CONNEELY, O. M.; O'MALLEY, B. W. Progesterone via Its Receptor Antagonizes the Pro-Inflammatory Activity of Estrogen in the Mouse Uterus1. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 5, p. 1158–1165, 1999.

TOWNSON, D. H.; LIPTAK, A. R. Chemokines in the corpus luteum: Implications of leukocyte chemotaxis. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, n. X, p. 1–7, 2003.

TRAPNELL, C. et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. **Nature Protocols**, v. 7, n. 3, p. 562–578, 2012.

VIVAR, O. I. et al. Estrogen Receptor β Binds to and Regulates Three Distinct Classes of Target Genes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 29, p. 22059–22066, 2010.

ZABKIEWICZ, C. et al. Increased Expression of Follistatin in Breast Cancer Reduces Invasiveness and Clinically Correlates with Better Survival. **Cancer Genomics and Proteomics**, v. 14, p. 241–251, 2017.

ZATTA, S. et al. Transcriptome analysis reveals differences in mechanisms regulating cessation of luteal function in pregnant and non-pregnant dogs. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 1–18, 2017.

ZHANG, X. et al. Prostaglandin F₂ α upregulates Slit / Robo expression in mouse corpus luteum during luteolysis. **Journal of Endocrinology**, v. 218, n. 3, p. 299–310, 2013.

ZHANG, X. et al. Progesterone down-regulates SLIT/ROBO expression in mouse corpus luteum. **Acta Histochemica**, v. 119, n. 7, p. 740–746, 2017.