

FRANCISLAINE ANELIZE GARCIA SANTOS

Fatores de transcrição envolvidos com a ativação dos receptores de progesterona durante o diestro não gestacional de cadelas

São Paulo

2019

FRANCISLAINE ANELIZE GARCIA SANTOS

Fatores de transcrição envolvidos com a ativação dos receptores de progesterona durante o diestro não gestacional de cadelas

Tese 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 Doutor em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientadora:

Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa Keohane

São Paulo

2019

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3883
FMVZ

Santos, Francislaine Anelize Garcia

Fatores de transcrição envolvidos com a ativação dos receptores de progesterona durante o diestro não gestacional de cadelas / Francislaine Anelize Garcia Santos. – 2019.

73 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

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

1. Progesterona. 2. Receptor nuclear de progesterona. 3. Regulador transcricional. 4. Célula luteínica. 5. Cadelas. I. Título.

Certificado da Comissão de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Fatores de transcrição envolvidos com a ativação dos receptores de progesterona durante o diestro não gestacional de cadelas", protocolada sob o CEUA nº 4441110716, sob a responsabilidade de **Paula de Carvalho Papa e equipe; Francislaine Garcia** - 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 23/11/2016.

We certify that the proposal "Transcription factors involved with the activation of progesterone receptors during non-gestational diestrus in bitches", utilizing 30 Dogs (30 females), protocol number CEUA 4441110716, under the responsibility of **Paula de Carvalho Papa and team; Francislaine Garcia** - 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 11/23/2016.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [08/2016](#) a [12/2019](#) Área: [Reprodução Animal](#)

Origem: [Animais provenientes de outros projetos](#)

Espécie: [Cães](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [1 a 6 anos](#)

N: [30](#)

Linhagem: [Sem padrão racial definido](#)

Peso: [2 a 45 kg](#)

Resumo: O objetivo desse projeto é identificar os fatores de transcrição ativados pela ligação da progesterona aos seus receptores durante o diestro não gestacional na espécie canina. Para tal, serão utilizados corpos lúteos provenientes de 30 cadelas que passaram por ovariectomia nos dias 10, 20, 30, 40, 50 e 60 após a ovulação. As coletas de sangue serão realizadas para dosagem hormonal da progesterona. Os CLs coletados serão utilizados para extração de RNA total a partir do protocolo de TRIZOL e posterior análise por RNA-seq seguindo o protocolo TruSeq RNA Sample Preparation Guide e validação dos fatores diferencialmente expressos por PCR em tempo real. Avaliaremos in vitro os efeitos da expressão das isoformas dos receptores e dos fatores de transcrição acionados pela ligação da P4 aos seus receptores nas células luteínicas caninas. Após as validações, os resultados obtidos serão testados, através do programa GraphPad Prism 5.0, de acordo com sua homogeneidade e normalidade, e apresentados como média \pm EPM. Diferenças de $p < 0,05$ serão consideradas significativas. Assim, a presente proposta pretende desvendar o papel da ligação da progesterona com seus receptores na função do CL, com a ativação dos fatores de transcrição envolvidos na proliferação e sobrevivência celular no corpo lúteo canino durante o diestro, uma vez que os experimentos de RNA-seq abrirão novas perspectivas de compreensão global deste fenômeno.

Local do experimento: Laboratórios da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo

São Paulo, 23 de novembro de 2016

Prof. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: GARCIA SANTOS, Francislaine Anelize

Título: **Fatores de transcrição envolvidos com a ativação dos receptores de progesterona durante o diestro não gestacional de cadelas**

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

Data: 17 / 12 / 2019

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A Deus, a Maria e aos meus santos de devoção, pois me conduziram, me deram esperança e me ajudaram a prosseguir.

Aos meus pais, José e Elza que sempre contribuíram com paciência, amor e dedicação no decorrer deste período.

A minha irmã Miriam e a minha sobrinha Maria Laura, que nasceu durante este período me trazendo alegria e força. Muito obrigada por todo bem!

A todos os meus amigos que souberam respeitar minha ausência, me trazendo carinho e alegria.

*Aos meus avôs Ildfonso e Aurora (in memoriam), que sempre ficavam alegres com as mais simples conquistas de minha vida. Queria poder expressar o quanto vocês fazem falta.
Saudades!*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Paula de Carvalho Papa Keohane** pela oportunidade de ingressar ao doutorado e por permitir estar em seu laboratório e convívio. Obrigada pelos momentos de aprendizado, diálogo, confraternização e auxílio, serei eternamente grata.

A todos os membros do laboratório LEME que convivi, **Arnaldo Shindi Maruyama, Loren D'Aprile, Luiz Berto, Vanessa Uemura e Victoria Pereira**, e que tive o privilégio de conhecer e aprender com cada um. Obrigada pela amizade de vocês!

As ex-orientadas da prof^a. Paula Papa, **Ana Paula Cardoso, Liza Sousa e Renata Silva**, obrigada pela relação breve, mas que permaneceu constante a cada dúvida surgida. Grata pela disponibilidade e paciência de vocês.

À minha orientadora de mestrado **Ines Cristina Giometti**, por me incentivar durante este período e contribuir para a realização deste trabalho. Obrigada por essa relação de confiança.

À secretária **Daura Vaz**, vinculada ao programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, por estar sempre disposta ao bom relacionamento e ser um alento no decorrer deste processo. Grata pela sua disponibilidade e convívio.

À secretária **Harumi Shiraishi**, vinculada ao programa de Pós-graduação em Reprodução Animal. Obrigada por estar sempre disponível e me acolher sempre tão respeitosamente. Seu trabalho é ímpar e foi essencial para conclusão deste trabalho.

À **Dra. Ivana** e a todos da clínica Office Dog, por permitirem a realização das coletas e por toda atenção dada ao estudo.

À médica veterinária **Karoliny Iorgov** e a todos da clínica Radial pela disponibilidade em nos receber e colaborar para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao bioinformata **Lucas Maciel** do Laboratório de Expressão Gênica em Eucariotos - Instituto Butantan – USP, por estar sempre solícito e trazer clareza e compreensão dos dados.

Ao **programa de Pós-graduação em Reprodução Animal** da FMVZ -USP, no qual fazem parte professores, discentes, técnicos e funcionários. Meu muito obrigado a vocês por permitirem e colaborarem na realização deste trabalho.

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, por fornecer espaço físico, crescimento e aprendizado durante estes anos.

À **FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (Processo nº 2014/00739-9) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de financiamento 001**.

*‘Se a meta principal de um capitão fosse preservar seu barco,
ele o conservaria no porto para sempre.’*

São Tomás de Aquino

RESUMO

GARCIA SANTOS, F. A. **Fatores de transcrição envolvidos com a ativação dos receptores de progesterona durante o diestro não gestacional de cadelas. Transcription factors involved in the activation of progesterone receptors during canine cyclic diestrus.** 2019. 73 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A função do corpo lúteo na cadela foi abordada em vários estudos, visando a identificação de mecanismos luteotróficos e luteolíticos, porém a regressão luteínica na cadela cíclica ainda não foi bem caracterizada, assim como todos os fatores luteotróficos. Sabe-se que a progesterona (P4) é um fator luteotrófico capaz de ativar receptores nucleares de progesterona (PGRs) e exerce diferentes atividades sobre regiões promotoras de genes responsivos à progesterona, aumentando ou diminuindo a transcrição dos genes a depender da disponibilidade de fatores de transcrição em células-alvo. O objetivo do trabalho foi caracterizar a expressão gênica do PGR, seus fatores de transcrição com sítios de ligação ao PGR, o AP-1, o FOXO3 e o HOXA5 e os genes StAR, CYP11A1, HSD3B2, responsivos ao PGR, no corpo lúteo (CL) canino. Foram utilizados CLs provenientes de cadelas que passaram por ovariosalpingohisterectomia nos dias 10, 20, 30, 40, 50 e 60 após a ovulação (p.o). Para determinação do D0 foram realizadas coletas de sangue para dosagem da P4. Os CLs coletados foram utilizados para extração de RNA total a partir do protocolo de TRIZOL e posterior análise por RNA-Seq seguindo o protocolo TruSeq RNA Sample Preparation e validação dos genes por PCR em tempo real. Avaliamos *in vitro* os efeitos do silenciamento de PGR pela técnica de RNA de interferência (RNAi) e em células estimuladas com P4 para os genes alvos. Após as validações, os resultados obtidos foram testados, através do programa SAS, de acordo com sua homogeneidade e normalidade, e apresentados como média \pm EPM, diferenças de $p \leq 0,05$ foram consideradas significativas. Houve o aumento de AP-1 e FOXO3 nas células com adição de P4 (500 ng/mL) e nas silenciadas com siRNA PGR. A análise de RNA-Seq mostrou o aumento de AP-1 no dia 30 p.o e a análise de qPCR mostrou o aumento de FOXO3 no dia 40 p.o. A análise de RNA-Seq indicou um aumento de HOXA5 no dia 40 p.o e no silenciamento de PGR uma diminuição de HOXA5. Os resultados sugerem que o aumento de AP-1 possa regular positivamente a formação do CL durante diestro e o aumento de HOXA5 possa regular negativamente. A ativação de FOXO3 parece estar envolvida tanto na proliferação quanto na regressão, de acordo com os estímulos hormonais nesta fase. Sugere-se que a ligação da P4 ao PGR ative a transcrição de genes envolvidos com os processos de proliferação e regressão do CL. Assim,

concluimos que o receptor de progesterona é responsivo a fatores de transcrição e influencia a expressão de enzimas esteroidogênicas, exercendo papel na regulação da proliferação e sobrevivência celular do corpo lúteo durante o diestro.

Palavras-chave: Progesterona. Receptor nuclear de progesterona. Regulador transcricional. Sequenciamento. Silenciamento gênico. Célula luteínica. Cadelas.

ABSTRACT

GARCIA SANTOS, F. A. **Transcription factors involved in the activation of progesterone receptors during canine cyclic diestrus. Fatores de transcrição envolvidos com a ativação dos receptores de progesterona durante o diestro não gestacional de cadelas.** 2019. 73 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

The function of the corpus luteum in the dog has been approached in several studies aiming the identification of luteotrophic and luteolytic mechanisms, but luteal regression in the cyclic bitch has not been well characterized, as well as all luteotrophic factors. Progesterone (P4) activates the progesterone receptor (PGR) and exerts different activities on promoters of progesterone-responsive gene, and the specificity of transcription depends on the availability of transcription factors in target cells. The objective of this work was to characterize the expression of P4 receptor, as well as transcription factors with PGR binding sites, AP-1, FOXO3 and HOXA5 and StAR, CYP11A1, HSD3B2, genes responsive to PGR, in the canine corpus luteum (CL). The CLs from bitches undergoing ovariosalpingohysterectomy at days 10, 20, 30, 40, 50 and 60 after ovulation (p.o) were used. Blood samples were collected for P4 measurement. The collected CLs were used for total RNA extraction from using the TRIZOL protocol and further RNA-seq analysis was carried out following the TruSeq RNA Sample Preparation protocol. Gene validation was by real time PCR. We evaluated in luteal cell culture the effects of PGR silencing by interference RNA technique (RNAi) and accessed the target genes. After validations, the results obtained were tested by the SAS program, according to their homogeneity and normality, and presented as mean \pm SEM, differences of $p \leq 0.05$ were considered significant. There was an increase of AP-1 and FOXO3 in cells with addition of P4 and silenced with PGR siRNA. RNA-Seq analysis showed an increase in AP-1 on day 30 p.o and qPCR analysis showed an increase in FOXO3 on day 40 p.o. RNA-Seq analysis indicated an increase in HOXA5 on day 40 p.o and PGR silencing a decrease in HOXA5. The results suggest that AP-1 increase can up-regulate CL formation during diestrus canine and HOXA5 increase can down-regulate. The FOXO3 participates of these processes according to hormonal stimuli that occur during diestrus canine. Thus, we conclude that the PGR is responsive to specific transcription factors and modulates the expression of steroidogenic enzymes, playing a role in regulating cell proliferation and survival of the corpus luteum during diestrus.

Keywords: Progesterone. Progesterone nuclear receptor. Transcriptional regulator. Sequencing. Gene silencing. Luteal cell. Dog.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Cultura de células luteínicas caninas, em cultivo por 07 (A) e 9 dias (B). Microscópio óptico Zeiss, aumento de 20X..... 32
- Figura 2 - Análise da expressão gênica pelo fold-change (RNA-Seq), nas diferentes comparações dos dias após a ovulação. Os pontos vermelhos indicam que houve uma expressão diferencial entre as comparações pelo valor de fold-change: > 1 (indica regulação positiva) ou < 1 (indica regulação negativa). Os pontos pretos mostram que não houve expressão diferencial entre as comparações pelo valor de fold-change.....36
- Figura 3 - Expressão dos genes PGR, StAR, CYP11A1, HSD3B2, AP-1, FOXO3 e HOXA5 em corpos lúteos durante os períodos do diestro canino (10 – 60 dias p.o). Os dados são apresentados com a média e o erro padrão da expressão gênica relativa (n = 4 animais). Barra com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos.....39
- Figura 4 - Análise de correlação linear entre os genes e os hormônios P4 (ng/mL) e E2 (pmol/L) durante o diestro canino. Os valores de correlação significativos ($p < 0,05$) estão apresentados por r de Pearson.....40
- Figura 5 - Figura 5. Análise de correlação linear entre a expressão dos genes durante o diestro canino. Os valores de correlação significativos ($p < 0,05$) estão apresentados por r de Pearson..41
- Figura 6 - Expressão do gene PGR (1-3), StAR (4-6), CY11A1 (7-9), HSD3B2 (10-12), AP-1 (13-15), FOXO (16-18), HOXA5 (19-21) em cultivo de células luteínicas nos grupos tratados com o controle negativo, com a progesterona e com o siRNA PGR. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da expressão gênica relativa (n= 4 animais). Legenda: CT= grupo controle, siRNA CT - = grupo com siRNA controle negativo, CT + P4= grupo com progesterona e siRNA PGR= grupo com siRNA PGR.....43
- Figura 7 - Expressão gênica relativa do grupo controle e do grupo controle positivo para siRNA em amostras de cultivo de células luteínicas caninas. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da expressão gênica relativa (n = ± 18 animais).....44

Figura 8- Esquema representativo do processo de ativação do PGR pela ligação da P4 e recrutamento dos fatores de transcrição AP-1, FOXO3 e HOXA5 para a expressão de genes envolvidos nos processos de proliferação e regressão do corpo lúteo canino. A síntese hormonal controla os mecanismos de expressão gênica durante o diestro: o aumento da P4 e do PGR indicam o processo de luteinização e a redução a luteólise.....50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados referenciais dos silenciadores gênicos utilizados na técnica de RNAi	33
Tabela 2 - Primers TaqMan (FAM-MGB) utilizados nas análises de amplificação gênica pela técnica de PCR em tempo real.....	34
Tabela 3 - Os fatores de transcrição e o nº de sítios de ligação mais representados para o receptor de progesterona pela análise do oPOSSUM 3.0.....	37
Tabela 4 - Identificação dos termos de ontologia para os genes PGR, StAR, CYP11A1, HSD3B2, AP-1, FOXO3, HOXA5 (DAVID 6.8)	38

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	A espécie e suas particularidades reprodutivas	17
2.2	O corpo lúteo canino	18
2.3	Progesterona	20
2.4	Receptor de progesterona	20
2.5	Fatores de transcrição	22
2.5.1	Fator de transcrição AP-1	24
2.5.2	Fator de transcrição FOXO3	26
2.5.3	Fator de transcrição HOXA5.....	27
2.6	O receptor de progesterona e os fatores de transcrição AP-1, FOXO3 e HOXA5...28	
3	MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1	Animais.....	29
3.1.1	Experimento RNA-SEQ e qPCR.....	29
3.1.2	Experimento Cultivo Celular, RNAi e qPCR.....	29
3.2	Extração de RNA.....	30
3.3	Bibliotecas e sequenciamento do RNA.....	30
3.4	Análise dos dados do RNA-Seq.....	31
3.5	Cultivo de células luteínicas.....	31
3.6	RNA de interferência.....	32
3.7	Transcrição reversa e PCR em.....	33
3.8	Análise estatística.....	34
4	RESULTADOS	35
4.1	RNA-Seq	35
4.2	Sítios de ligação a fatores de transcrição no receptor de progesterona.....	37
4.3	Identificação funcional pelo Gene Ontology (GO).....	37
4.4	Expressão dos genes PGR, StAR, CYP11A1, HSD3B2, AP-1, FOXO3 e HOXA5 em corpos lúteos durante o diestro.....	38
4.5	Correlação entre a expressão dos genes PGR, StAR, CYP11A1, HSD3B2, AP-1, FOXO3 e HOXA e as concentrações plasmáticas de P4 e E2, e correlação entre as expressões dos genes durante o diestro canino.....	40

4.6	Expressão dos genes PGR, StAR, CYP11A1, HSD3B2, AP-1, FOXO3 e HOXA5 em cultivo de células luteínicas caninas e tratadas com o siRNA controle negativo, com a progesterona e com o siRNA do PGR.....	42
4.7	Validação da transfecção por siRNA controle positivo	44
5	DISCUSSÃO	44
6	CONCLUSÕES	51
	REFERÊNCIAS	52
	APÊNDICE A	67
	ANEXO A	72

1 INTRODUÇÃO

A regulação da função reprodutiva no cão doméstico (*Canis familiaris*) é regida por muitos mecanismos específicos da espécie (KOWALEWSKI et al., 2011). A formação do corpo lúteo (CL) é caracterizada pelo aumento contínuo de níveis periféricos de progesterona (P4), que em geral atingem valores máximos durante os primeiros 20 dias do diestro; este período é seguido por um declínio contínuo da P4, que alcança níveis de <1 ng/mL, quando tem início o anestro (CONCANNON, 1993). Essas observações e outras observações indicam que a progesterona é um dos principais hormônios que regem o ciclo reprodutivo da cadela (PAPA; HOFFMANN, 2011).

A transferência do colesterol para a membrana interna da mitocôndria devido à atividade da proteína StAR (Steroidogenic Acute Regulatory Protein), parece ser um passo limitante na taxa da síntese de P4 pelo CL canino e a diminuição da expressão da 3 β HSD (3 β -hidroxisteróide desidrogenase) é considerada secundária (KOWALEWSKI et al., 2006a). Os mecanismos de controle da expressão da StAR no CL da cadela indicam que eles são independentes do suporte gonadotrófico (KOWALEWSKI; MUTEMBEI; HOFFMANN, 2008) e isso pode ser explicado pela atividade da P4 dentro de um sistema de feedback positivo incluindo a StAR e a 3 β HSD.

Além disso, os mecanismos de regulação da biossíntese de P4 podem estar envolvidos com expressão dos receptores de progesterona (PGRs) e de estrógenos (ERs), classificando-os como alvos para uma atividade autócrina/parácrina de esteróides derivados do CL (PAPA; HOFFMANN, 2011).

Os PGRs, após se ligarem à P4, se acoplam à região promotora do DNA e recrutam proteínas co-reguladoras que ativam ou reprimem a transcrição através de interações com o aparelho de transcrição geral (KLEIN-HITPASS et al., 1990; TSAI; O'MALLEY, 1994; MCKENNA; LANZ; MALLEY, 1999; LEONHARDT; EDWARDS, 2002). A especificidade da transcrição dependente da disponibilidade de PGR e dos fatores co-regulatórios em células-alvo (RICHER et al., 2002). Os efeitos específicos dos PGRs são determinados de acordo com diferentes atividades de transformação sobre promotores de genes responsivos à progesterona (RICHER et al., 2002), uma vez que é o ativador de transcrição mais importante, especialmente em promotores que contêm múltiplos elementos de resposta à progesterona (SARTORIUS et al., 1994).

Os PGRs podem interagir com outros fatores de transcrição para modular a atividade transcricional (TAKANO et al., 2007). Os ligantes sintéticos dos PGRs podem afetar a

transcrição de genes alvo por meio do recrutamento seletivo ou bloqueando os cofatores regulatórios, o que resulta na regulação diferencial da expressão gênica em vários tecidos alvos da progesterona (KIM; KURITA; BULUN, 2013).

A função do CL na cadela foi abordada em vários estudos, visando a identificação de mecanismos luteotróficos e luteolíticos. Porém a regressão luteínica na cadela cíclica ainda não foi bem caracterizada e parece ser o resultado da regulação de fatores luteotróficos. A caracterização da expressão dos receptores de P4 ao longo do diestro e de fatores de transcrição envolvidos com a proliferação e sobrevivência celular no corpo lúteo são essenciais para desvendar os mecanismos de regulação no diestro canino.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A espécie canina e suas particularidades reprodutivas

A espécie *Canis lupus familiaris* (cão doméstico) é caracterizada por reprodução monoéstrica e predominantemente não sazonal. A ovulação ocorre uma ou duas vezes ao ano, com intervalo de 5 a 12 meses (CONCANNON; MCCANN; TEMPLE, 1989) e as variações individuais e específicas das fases reprodutivas estão relacionadas com a raça (STABENFELDT; SHILLE, 1977, SIEGEL, 1982).

O aumento pré-ovulatório de LH e a ovulação ocorrem em média 2 dias após um período de 1-3 semanas (média de 9 dias) do proestro e a síntese de progesterona (P4) de origem folicular tem início no final do proestro, atingindo concentrações plasmáticas de 5 ng/mL na ovulação (CONCANNON; MCCANN; TEMPLE, 1989). As fases do ciclo estral canino são caracterizadas pela fase de proestro (média de 9 dias), estro (média de 7 dias), diestro (média de 63 dias) e anestro (média de 90 dias) (CONCANNON et al., 2009).

O proestro é caracterizado por progressiva cornificação do epitélio vaginal, descarga serossanguinolenta de líquidos e eritrócitos originada por diapedese através dos capilares uterinos, secreção feromonal, com aumento da atração de machos, edema vulvar progressivo e anatomicamente visível. O estro é definido pela aceitação de monta da cadela pelo macho e ocorre a ovulação cerca de 48 a 60 horas após o pico de LH, com o declínio das concentrações de estradiol, o esfregaço vaginal não é mais predominantemente cornificado e as células da granulosa são transformadas em células luteínicas. No diestro inicial, os ovários bilaterais contêm grandes corpos lúteos, que atingem maturidade por volta do dia 20 p.o. e começam a

regredir na fase tardia do diestro, gradualmente diminuindo de tamanho e tornando-se vacuolares (PHEMISTER et al., 1973; CONCANNON et al., 2009; SATO; NASU; TSUCHITANI, 2016). No anestro o corpo lúteo é denominado de corpus albicans, caracterizado por infiltrados de células inflamatórias, poucos vasos e células luteínicas picnóticas.

O aumento das concentrações periféricas de P4 é um indicativo da formação do corpo CL, que é uma glândula endócrina essencial para a manutenção da prenhez (CONCANNON, 1993), e da ciclicidade (CONCANNON; MCCANN; TEMPLE, 1989). Em cadelas não-gestantes a regressão do CL não depende da produção periódica da luteolisina endometrial (PGF2 α) e ocorre à semelhança de um processo passivo de degeneração

2.2 O corpo lúteo canino

O corpo lúteo é uma glândula endócrina, composta principalmente por células luteínicas, as esteroiogênicas e as não esteroiogênicas, como as células endoteliais, macrófagos e células do tecido conjuntivo, os fibroblastos e fibrócitos (O'SHEA, 1987; FIELDS; FIELDS, 1996).

A atividade luteínica é caracterizada pelo aumento das concentrações de P4 (30-35 ng/mL) os primeiros 15 a 25 dias pós-ovulação (p.o) e a regressão luteínica em cadelas não prenhes ocorre por um decréscimo progressivo de P4 durante um período de um a três meses, até que as concentrações abaixo de 1 ng/mL indiquem o aparecimento de anestro (CONCANNON, 1993).

Em cadelas prenhes, após aproximadamente 60 dias, ocorre uma queda acentuada de P4 como um requisito para o parto (CONCANNON; MCCANN; TEMPLE, 1989; HOFFMANN; RIESENBECK; KLEIN, 1996) e isto mostra que a duração do diestro, baseada na função luteínica, é similar em cadelas prenhes e não prenhes (STABENFELDT; SHILLE, 1977; OLSON, 1986).

A síntese hormonal das células esteroiogênicas do CL pode ser modulada por hormônios gonadotróficos (HERR et al., 2013), citocinas e fatores de crescimento (SHIRASUNA et al., 2013). O suporte gonadotrófico é um fator importante para manutenção do CL, uma vez que a remoção da glândula pituitária na segunda metade do diestro induz a luteólise em cães (OKKENS et al., 1990). A prolactina (PRL) e o hormônio luteinizante (LH) são fatores luteotróficos, e a retirada da prolactina a partir do dia 25 após o pico pré-ovulatório de LH resulta na regressão irreversível do CL. O bloqueio funcional de LH durante o mesmo

período levou a apenas uma diminuição transitória de P4, tanto em cadelas prenhes como não prenhes (CONCANNON et al., 1987; ONCLIN et al., 1993; ONCLIN; VERSTEGEN; CONCANNON, 2000). A regressão luteínica ocorre apesar das concentrações elevadas desses hormônios, assumindo que os mecanismos parácrinos e/ou autócrinos são os principais fatores envolvidos no controle da função luteínica (FERNANDES et al., 1987; HOFFMANN; RIESENBECK; KLEIN, 1996).

Entre os componentes do sistema imunológico do CL, estão os linfócitos CD4 e CD8, juntamente com as citocinas produzidas por eles, tais como: IL8, IL10, IL12, TNF α ou TGF β e os fatores tróficos como, IGF e VEGF (HOFFMANN et al., 2004; MARIANI et al., 2006). A progesterona atua na regulação dos linfócitos por mecanismos inibitórios diretos ou indiretos, interferindo na proliferação deste tipo celular (LIANG et al., 2006) e a supressão do VEGF inibe a produção de P4 e o desenvolvimento do CL (FERRARA et al., 1998; FRASER; LUNN, 2000).

Além disso, a célula luteínica canina expressa GLUT1 (transportador de glicose 1), que aumenta no dia 20 p.o e sua expressão está correlacionada à concentração plasmática de P4 (PAPA et al., 2014). O transportador de glicose 4 (SLC2A4/GLUT4) também foi identificado no CL canino e apresenta aumento de expressão na presença de insulina. Células tratadas com insulina provenientes de CLs do dia 20 p.o, apresentam aumento da expressão do INSR (receptor de insulina) e do SLC2A4, enquanto nas células do dia 40 p.o ocorre uma diminuição. A regulação da expressão dos transportadores em períodos distintos do diestro, confirmam a participação da insulina na funcionalidade do CL canino (SOUSA et al., 2016).

As prostaglandinas participam da regulação da função luteínica canina por meio da PGE2, que atua de forma parácrina e/ou autócrina nos diferentes estágios do diestro cíclico e gestacional. A PGE2 estimula a expressão da proteína StAR e o transporte do substrato esteróide, mas não a atividade enzimática da 3 β HSD e P450_{scc} (KOWALEWSKI et al., 2013), em ovinos, estimula a síntese de P4 através da via de AMPc / PKA no CL em formação (WEEMS et al., 1997). Os dados contribuem para o conhecimento dos mecanismos que conduzem a função reprodutiva no CL canino, uma vez que as diferenças no ovário canino requerem a suplementação da P4 como uma medida de prevenção a perda gestacional, no caso de cadelas prenhes.

2.3 Progesterona

Durante o desenvolvimento do CL as concentrações séricas de P4 estão associadas às concentrações de mRNA das proteínas que participam das diversas etapas de síntese da P4, incluindo a StAR, que é o principal elemento responsável pela modulação da esteroidogênese e encontra-se diferencialmente expressa ao longo do diestro canino (KOWALEWSKI; HOFFMANN, 2008).

A StAR é responsável pelo transporte ativo do colesterol da membrana mitocondrial externa para a interna e, portanto, para o fornecimento de substratos esteroidogênicos, enquanto a CYP11A1 (cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1/P450_{scc}) converte o colesterol em pregnenolona (RENNERT et al., 1990) e a 3 β HSD/HSD3B2 (3 β -hydroxysteroid dehydrogenase) controla a conversão de pregnenolona em progesterona (BAO et al., 1997).

Mecanismos dependentes de StAR parecem desempenhar um papel limitante dentro do CL canino controlando a taxa de conversão enzimática e, conseqüentemente, a capacidade esteroidogênica (KOWALEWSKI et al., 2013): no dia 65 p.o, quando a produção de P4 alcança níveis de anestro, tanto StAR, quanto CYP11A1 e 3 β HSD apresentam expressão diminuída de mRNA e proteína (KOWALEWSKI et al., 2006a).

Além disso, o papel da P4 como um fator autócrino, induz a sua própria síntese através da ativação de seu receptor, o que pode ser considerado um sistema de feedback positivo (KOWALEWSKI; HOFFMANN, 2008), assim como demonstrado em vacas (BAH et al., 2006), éguas (FERREIRA-DIAS et al., 2006) e mulheres (OTTANDER et al., 2000).

2.4 Receptor de progesterona

O CL canino expressa os receptores de progesterona e os receptores de estrógenos (ER), que são ativados por meio da atividade autócrina, parácrina e endócrina de esteroides derivados do próprio CL. A regulação positiva da produção de P4 acontece por meio do aumento da expressão de StAR e 3 β HSD (KOWALEWSKI et al., 2006b), mas as cascatas de transdução de sinal envolvidas na sinalização da P4, começam com a ligação em receptores específicos (GRACANIN et al., 2012).

A expressão de PGRs nas células luteínicas de cadelas é influenciada apenas na fase de diestro, indicando uma provável regulação autócrina e/ou parácrina da função luteínica (PAPA; HOFFMANN, 2011). O aumento da expressão dos PGRs na formação do CL, coincide com uma proliferação significativamente maior de células luteínicas e não luteínicas no início do

diestro e com um aumento nas concentrações de P4, sugerindo um efeito estimulador da P4 na formação e na atividade secretora inicial do CL (HOFFMANN et al., 2004).

O receptor de progesterona pertence à superfamília de receptores nucleares (NR), que compartilham semelhanças estruturais e são compostos de domínios específicos (EVANS, 1988; CARSON-JURICA; SCHRADER; O'MALLEY, 1990; KUMAR; THOMPSON, 1999). O modo clássico de sinalização dos esteróides é através da ligação a receptores nucleares, que são fatores de transcrição ativados por ligantes e regulam a transcrição de um conjunto de genes expresso por uma célula (GERMAIN et al., 2006).

Os receptores nucleares do tipo I incluem os receptores de hormônios esteróides: andrógenos - AR; estrógenos - ERs; glicocorticóides - GR; mineralocorticóide - RM; e receptores de progesterona - PGRs. Os receptores nucleares do tipo I estão localizados no citoplasma associado às chaperonas moleculares (proteínas de choque térmico) que mantêm os receptores em uma conformação que permite a ligação ao ligante, mas não a ligação ao DNA. Após a ligação hormonal, os NRs do tipo I sofrem uma alteração conformacional que resulta na liberação de componentes do complexo chaperona, exposição de uma sequência de localização nuclear e translocação para o núcleo, onde se associam à cromatina e regulam a transcrição de genes. Foram descritas ações dependentes de ligação a DNA (em elementos de resposta hormonal - HREs) e independentes de ligação a DNA de NRs tipo I (MANGELSDORF et al., 1995; REICHARDT et al., 1998). Nas ações dependentes, após a ligação de P4, os PGRs ativados são translocados para o núcleo e se ligam em elementos reguladores, na maioria das vezes contendo um elemento de resposta à progesterona (PRE) (CEBALLOS-CHÁVEZ et al., 2015). Nas ações independentes, o PGR se liga seletivamente a um conjunto específico de fatores de transcrição no genoma da célula alvo para regular a expressão gênica (DOYLE et al., 2004).

O gene do receptor de progesterona nuclear canino está localizado no cromossomo 21, na posição 447,197-552,511, com 9 exons, 3.344 pares de bases e 941 aminoácidos (NCBI/Ensembl). Os receptores de progesterona são transcritos de um único gene e através de diferentes promotores, duas isoformas de PGR são sintetizadas. A isoforma PRA é uma versão truncada do PRB, pela ausência dos primeiros 174 aminoácidos da região N-terminal (LANTINGA-VAN LEEUWEN et al., 2000), a isoforma PRB é caracterizada como um forte ativador de genes alvos (KEIGHTLEY, 1998). Em relação a isoforma PRC, foram encontradas evidências da presença em humanos (SANER et al., 2003), ratos (FANG; WONG; MITCHELL, 2002), camundongos (CONDON et al., 2006) e vacas (SCHAMS et al., 2003).

Sabe-se que em humanos é capaz de se ligar à progesterona, mas não tem a capacidade de se ligar ao DNA, pois não possui DBD (domínio de ligação ao DNA). Então o PRC pode inibir a função de PGR sequestrando a progesterona disponível da isoforma PRB e ainda se ligar à isoforma do PRB, reduzindo a capacidade do PRB de se ligar a P4 (WEI et al., 1996; WEI; NORRIS; BAKER, 1997).

O PGR é constituído pelo domínio amino-terminal (N-terminal), pelo domínio de ligação ao DNA (DBD) e pelo domínio carboxil-terminal (C-terminal) de ligação ao ligante (LBD). Existe, também, uma pequena região que conecta o DBD ao LBD, que é conhecida como dobradiça hinge (RIBEIRO et al., 1998). Além disso, o receptor contém elementos de função de ativação múltipla (AF) (WU, 2001; WÄRNMARK et al., 2003) e inibitória (IF), que aumentam e reprimem a ativação transcricional de PGR por associação de regiões co-reguladoras da transcrição (LEE, 2016). A transcrição mediada por PGR ocorre através da ligação em específicas do DNA, chamadas de elementos de resposta à progesterona (PREs) em promotores de genes regulados por PGR. E após, a transcrição é iniciada através do recrutamento do complexo de transcrição (JACOBSEN; HORWITZ, 2013).

Além das vias genômicas, existe hipótese da P4 desempenhar seus efeitos nos tecidos reprodutivos através da interação com proteínas de membrana, incluindo os componentes do receptor de membrana (PGRMC) 1 e 2 e os receptores de progesterona de membrana (MPRs) : mPR α (PAQR7), mPR β (PAQR8) e mPR γ (PAQR5) (KOWALIK; REKAWIECKI; KOTWICA, 2013). Os mPRs foram identificados no CL de ratas (CAI; STOCCO, 2005) e ovelhas (ASHLEY; ARREGUIN-AREVALO; NETT, 2009). Em ratas a expressão de mRNA do mPR α e do mPR β é maior durante a gestação e regulada negativamente ao final da mesma, já a expressão do mPR γ aumentou durante a gestação, indicando que a regulação de mPRs no CL de ratas durante a gestação ocorra por controle da prolactina (CAI; STOCCO, 2005). Em ovelhas, a expressão de mPR α aumentou durante o estro e declinou no final do diestro, correlacionando aos níveis séricos de progesterona (ASHLEY; ARREGUIN-AREVALO; NETT, 2009).

2.5 Fatores de transcrição

A especificidade da transcrição está intimamente relacionada com um grupo de proteínas conhecidas como fatores de transcrição (TFs). Essas proteínas reconhecem e se ligam a sequências específicas de DNA, denominadas sítios de ligação a fatores de transcrição (TFBS), do inglês Transcription Factor Binding Sites. A interpretação da sequência de DNA

pelos TFs é o primeiro mecanismo que guia a expressão do genoma, possuindo papel fundamental na repressão ou ativação de genes. Além disso, o mesmo TF pode regular diferentes genes, indicando que as redes reguladoras são dinâmicas mesmo dentro do mesmo organismo (GERTZ et al., 2012; LEE; YOUNG, 2013; LAMBERT et al., 2018).

Ao menos sete fatores de transcrição basais (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, TFIIH e TFIIJ) são necessários para a transcrição em promotores pela RNA polimerase II em eucariotos. Esses fatores de transcrição se agrupam em complexos de iniciação funcional de uma forma ordenada, começando com a ligação do TFIID à caixa TATA (ZAWEL; REINBERG, 1992; TJIAN; MANIATIST, 1994).

Os receptores nucleares são fatores de transcrição ativados por ligantes que atuam na transcrição em células-alvo de hormônios, regulando especificamente a expressão de genes envolvidos no metabolismo, desenvolvimento e reprodução (MCKENNA; LANZ; MALLEY, 1999). Para produzir efeitos, os fatores de transcrição se ligam ao DNA e influenciam a transcrição de forma positiva ou negativa (MCDONNELL; CLEMM; IMHOF, 1994; MCDONNELL et al., 1995).

Os co-reguladores de NR são coativadores ou corepressores requeridos para uma regulação transcricional eficiente: os coativadores são definidos como moléculas que interagem com NRs e aumentam a sua transativação, os corepressores são fatores que diminuem a taxa de transcrição em seus genes alvo. A maioria dos co-reguladores limitam a taxa para a transativação e repressão dos NRs, mas não alteram significativamente a transcrição basal (MCKENNA; LANZ; MALLEY, 1999). Deste modo, sabe-se que os TFs podem ser gerais quando participam da formação do complexo de transcrição ou específicos quando reconhecem sequências específicas de DNA presentes nas regiões ativadoras e modulam suas atividades. Ainda podem ser classificados como fatores de transcrição os coativadores e corepressores que não requerem interação direta com DNA e são recrutados para ativar ou reprimir a expressão do gene (LIN; BARBOSA, 2002).

Os membros das famílias dos fatores de transcrição AP-1, FOXO e HOX mostraram ser fatores específicos ou potenciais cofatores dos PGRs, exercendo função de regulação na expressão gênica através do PGR. O AP-1 preferencialmente coativa o PGR entre os receptores nucleares e é expresso nos tecidos reprodutivos femininos e nas células responsivas à progesterona, indicando que ele desempenha um papel nas funções específicas do PGR (WARDELL et al., 2002), como por exemplo, foi relatado aumento da expressão de AP-1 durante a maturação folicular e após a luteinização em suíno (RUSOVICI; LAVOIE, 2003). Além disso, foi demonstrado que o PGR associa-se ao DNA independentemente dos HREs,

vinculando-se ao AP-1 (CLARKE; GRAHAM, 2012). Os membros dos fatores de transcrição FOXO mostraram ser necessários pela ativação dos receptores nucleares de alvos transcricionais e isso pode ser explicado pelas interações dos fatores de transcrição FOXO com outros fatores de transcrição, assim como o receptor de progesterona (ZHAO et al., 2001; VAN DER HEIDE; HOEKMAN; SMIDT, 2004; CLARKE; GRAHAM, 2012). Essa relação transcricional entre os FOXOs e PGRs pode estar envolvida na regulação de múltiplos processos fisiológicos, uma vez que o FOXO3, participa da parada do ciclo celular, apoptose, resposta ao estresse oxidativo e metabolismo energético (LÜTZNER et al., 2012).

Em relação aos fatores de transcrição HOX, são proteínas com uma característica comum: a presença de um homeodomínio responsável pela ligação ao DNA em locais específicos de ligação, resultando na regulação transcricional de seus genes-alvo (LEVINE; HOEY, 1988; MCGINNIS; KRUMLAUF, 1992), o que implica em uma maior afinidade e especificidade de ligação ao DNA (SVINGEN; TONISSEN, 2006). O HOXA5 apresenta uma sequência de ligação situada na extremidade 3' na região promotora do PGR (RAMAN et al., 2000) e podem atuar na homeostase do ovário: foi detectado aumento de expressão no corpo lúteo gestacional, sugerindo sua regulação por hormônios sexuais (JEANNOTTE; GOTTI; LANDRY-TRUCHON, 2016).

2.5.1 Fator de transcrição AP-1

Os membros da família da proteína ativadora-1 (AP-1) são genes que pertencem à família de fatores de transcrição zíper de leucina (c-Jun, JunB, JunD, c-Fos, Fra-1, Fra-2 e FosB) (KARIN; LIU; ZANDI, 1997) e parceiros de dimerização de Jun (JDP1 e JDP2) (SHAULIAN; KARIN, 2001). Sugerem-se que os complexos AP-1 contendo c-Jun e c-Fos estejam envolvidos na estimulação da proliferação celular e diferenciação celular (SHAULIAN; KARIN, 2001).

Em um estudo o JunD e Fra2, bem como c-Jun e c-Fos parecem ser expressos seletivamente em células luteínicas terminalmente diferenciadas, indicando que a composição dos fatores AP-1 se altera durante a proliferação e diferenciação de células da granulosa (SHARMA; RICHARDS, 2000). Adicionalmente, o c-Jun interage com o regulador do ciclo celular pRb (proteína do retinoblastoma) (NISHITANI et al., 1999) e recruta a proteína ativadora de CREB (CBP) para ativar a proteína de ligação responsiva ao AMPc (CREB) (PELUSO; PAPPALARDO, 1999), que atua como um fator de transcrição.

Os fatores de transcrição AP-1 são fosforilados, ativados e induzidos à transcrição (KARIN, 1995). Esses fatores regulam a expressão gênica por mecanismos diretos, bem como mecanismos indiretos: o mecanismo direto requer que os fatores de transcrição AP-1 se vinculem à um domínio regulatório presente nos promotores de genes alvo (TRE) e que sejam fosforilados em seu domínio de ativação; em mecanismos indiretos a transcrição pode ocorrer por meio do envolvimento à outros fatores de transcrição através de interações proteína-proteína e não exige sua ligação ao DNA (MORGAN, 1991; MORGAN; CURRAN, 1995).

A sequência promotora confere especificidade na transcrição, assim como a sequência e localização dos PREs. Muitos fatores de transcrição se vinculam aos PGRs ligados a PREs e atuam como co-reguladores da transcrição dependente do receptor, incluindo c-Jun (ALKHALAF; MURPHY, 1992). Em outros casos, as ligações a PREs são dispensáveis, o PGR se vincula indiretamente a fatores de transcrição ligados ao DNA, como o AP-1 (BAMBERGER et al., 1996; OWEN et al., 1998).

O c-Jun é conhecido por seu envolvimento na regulação da transcrição do gene StAR pela ligação na região promotora, desencadeando mecanismos regulatórios em diversas respostas fisiológicas. Em cadelas prenhes, sua expressão no CL foi suprimida em relação à luteólise pré-parto, interferindo na expressão decrescente de StAR e dos níveis circulantes de P4 naquele momento (MANNA; STOCCO, 2007; ZATTA et al., 2017).

Em um estudo com células do estroma do endométrio humano, os membros da família AP-1 foram identificados como alvos diretos do PGR e como seus dependentes na decidualização (MAZUR et al., 2015), demonstrando que a interação funcional da ligação ao DNA por AP-1 pode influenciar várias sinalizações moleculares importantes para a transcrição de genes relacionados à esteroidogênese (MANNA; STOCCO, 2007) e ocorre interações com as isoformas PRA e PRB (HU et al., 1998; LIEBERT et al., 2003; GOLDHAR et al., 2011)

A atividade transcricional do cofator AP-1 ocorre pela ativação do PGR por ligante, que desencadeia a ativação da p42/p44 MAPK, induzindo a fosforilação da proteína c-Jun e c-Fos e a montagem do complexo transcricional do PGR para a expressão de genes alvos, como a ciclina D1 (DÍAZ FLAQUÉ et al., 2013).

Ainda foi identificado que a adesão do AP-1 ao sítio de ligação presente no PGR humano desempenhe um papel na expressão gênica regulada por estrógenos e ER. O PGR não contém elementos de resposta ao estrógeno (ERE), então o AP-1 adere ao sítio de ligação no PGR e o ER se liga a um meio sítio de ERE adjacente, melhorando a ligação de c-Fos e c-Jun (PETZ et al., 2002).

2.5.2 Fator de transcrição FOXO3

As proteínas "FoxO" (forkhead box O) são uma superfamília de fatores de transcrição (JÜNGER et al., 2003) que inclui o FOXO1 (FKHR), FOXO3 (FKHRL1), FOXO4 (AFX) e FOXO6. A fosforilação dos membros FOXO ocorre através da via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) pela ativação da cascata de sinalização intracelular da AKT (PKB, proteína quinase B), que fosforila os sítios regulatórios: a treonina (Thr) 32, a serina (Ser) 253 e a Ser315 (STAHL et al., 2002). As proteínas da família FOXO estão envolvidas em uma variedade de processos, como longevidade, resistência ao estresse, apoptose, proliferação celular, diferenciação e metabolismo (ACCILI; ARDEN, 2004).

Além da regulação da transcrição via interações diretas entre FOXO e DNA, os fatores de transcrição FOXO têm uma ligação independente ao DNA para a transcrição via interações com receptores nucleares, pois os receptores nucleares funcionam principalmente como fatores de transcrição dependentes de ligante e os fatores de transcrição FOXOs influenciam a transativação do receptor nuclear reprimindo ou ativando a transcrição, dependendo do receptor nuclear envolvido (PAPANICOLAOU; YASUHIRO; WALSH, 2008; VAN DER VOS; COFFER, 2008).

Os FOXOs participam como coativadores da transcrição dependentes do PRA (RUDD et al., 2007) e em células específicas para PRB na presença de ligante (WARD et al., 2008). Após a ligação ao ligante, os PGRs dimerizam e são retidos no núcleo onde reprimem ou ativam a transcrição dos genes alvo do PGR por interações com outros fatores de transcrição, por exemplo: FOXOs, AP-1, SP1 e STATs. Ainda foi contextualizado que a indução de FOXOs ao se ligar ao PGR, desencadeie a diferenciação de células estromais do endométrio humano (LABIED et al., 2006).

Os receptores nucleares que interagem com os fatores de transcrição FOXO incluem ERs (receptores de estrógenos), PGRs (receptores de progesterona), o AR (receptor de androgênio), o receptor de hormônio da tireoide, o receptor de glicocorticoide e o RAR (ácido retinóico receptor) (SCHUUR et al., 2001; ZHAO et al., 2001; RAMASWAMY et al., 2002; LI et al., 2003; VAN DER HEIDE; HOEKMAN; SMIDT, 2004).

A associação de FOXOs com receptores esteroides tem demonstrado inibir ou melhorar a atividade transcricional de cânceres dependentes de esteroides, como câncer de próstata, câncer de mama e câncer de ovário (VAN DER VOS; COFFER, 2008). Além disso, um estudo recente revelou que a ação da proteína FOXO3 em ovários de mamíferos tem papel na regulação do crescimento e atresia folicular, promovendo a apoptose das células da granulosa

ovariana (CUI et al., 2019), por induzir a expressão de genes que participam ativamente desses processos (BRUNET et al., 2004) e a translocação para o citoplasma resulta na inibição da transcrição de genes alvos (BURGERING, 2002).

2.5.3 Fator de transcrição HOXA5

Os genes homeobox compreendem uma família de genes reguladores que codificam proteínas nucleares específicas que atuam como fatores de transcrição (GEHRING; HIROMI, 1986). O HOXA5 (Homeobox A5) pertence à família dos genes Homeobox e atua na regulação negativa de vários genes envolvidos na proliferação, diferenciação e metabolismo celular (CROOKS et al., 1999; YANG et al., 2015). A expressão de HOXA5 foi associada à regulação negativa de genes pró-angiogênicos, como Ephrin A1 (Efna1), VEGFR2, fator 1 α induzível por hipóxia (HIF1 α) e ciclooxigenase-2 (COX-2) (CUEVAS et al., 2015).

O HOXA5 se liga diretamente ao sítio promotor do PGR e se comporta como um regulador transcricional de múltiplos genes alvo, sendo descrito um efeito de HOXA5 sobre os níveis proteicos do PGR. Em uma análise de deleção e mutação do promotor do receptor de progesterona, se identificou um único local de ligação do fator de transcrição HOXA5 necessário para a transativação, devido a interação do domínio de ligação ao DNA (DBD) da proteína HOXA5 com o promotor do PGR (RAMAN et al., 2000).

Em um estudo com camundongos adultos, foi relatado que o gene HOXA5 mostra um perfil de expressão no ovário dependente do ciclo estral, do estado gestacional e da idade da fêmea, sugerindo que este gene possa ter funções fisiológicas distintas no ovário. Consistente com o papel do HOXA5 na função ovariana, fêmeas nulíparas knockout para HOXA5 apresentaram puberdade precoce e início da aciclicidade com um ciclo estral prolongado pelo aumento do período do metaestro-diestro (GENDRONNEAU et al., 2012).

Foi descrito o que o HOXA5 inibe a atividade da via Wnt (Wingless) através da regulação de proteínas inibidoras da β -catenina, interferindo assim nas ações celulares relacionadas à proliferação, diferenciação e morfogênese (WILLERT; JONES, 2006; KOMIYA; HABAS, 2008; ANGERS; MOON, 2009).

Em um estudo sobre o câncer gástrico, o HOXA5 suprimiu a proliferação de células cancerígenas *in vivo* de camundongos, por expressão proteica de p21 e inibição da expressão proteica de c-Myc e Ki67 (PENG et al., 2018). Em células cancerígenas do ovário de mulheres, a expressão de HOXA5 foi associada à diminuição da proliferação e aumento da apoptose no ovário (ZHAO et al., 2018).

Ainda foi demonstrado em células tumorais de pele, que a presença de HOXA5 está associada à regulação positiva da trombospondina-2 (TSP-2), um inibidor natural da angiogênese. O mRNA de TSP-2 aumentou em função da expressão de HOXA5 e foi acompanhada por uma redução na expressão do mRNA de VEGF-A (CUEVAS et al., 2015). Adicionalmente, a progesterona modula a expressão de TSP-2 no útero, sugerindo a regulação de TSP-2 por esse hormônio no sistema reprodutivo (IRUELA-ARISPE et al., 1996) e evidencialmente influenciada por HOXA5, uma vez que regula a transcrição do receptor de progesterona (RAMAN et al., 2000).

Em células do endométrio humano, as proteínas HOX atuam como inibidores das funções tanto de PRA quanto de PRB (GAO; MAZELLA; TSENG, 2002). Entretanto a expressão no promotor do PGR foi altamente estimulada por HOXA5, mas não por outros membros da família do gene HOX, ressaltando o comportamento de regulador transcricional sobre os níveis da proteína da isoforma PRB (RAMAN et al., 2000), visto que o perfil de expressão de HOXA5 propõe funções de acordo com o tipo de célula e status hormonal (JEANNOTTE; GOTTI; LANDRY-TRUCHON, 2016).

2.6 O receptor de progesterona e os fatores de transcrição AP-1, FOXO3 e HOXA5

Sabe-se que os PGRs são fatores de transcrição nucleares dependentes de ligante (TSAI; O'MALLEY, 1994) que após a ligação hormonal sofrem uma mudança conformacional e ocorre a ligação nos elementos responsivos a progesterona dentro das regiões promotoras dos genes alvo (DUARTE et al., 2002). Entretanto essa ligação não se restringe apenas a genes com PREs e sim a outros TFs por motivos não consensuais (CLARKE; GRAHAM, 2012; MOHAMMED et al., 2015). Os fatores AP-1, FOXO3 e HOXA5 mostram estar envolvidos na luteinização e luteólise do corpo lúteo canino pela ativação de processos proliferativos e apoptóticos em resposta à expressão gênica (GENDRONNEAU et al., 2012; ZATTA et al., 2017; CUI et al., 2019). Além disso o HOXA5 mostrou que pode atuar como um regulador transcricional do PGR (RAMAN et al., 2000).

Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar a expressão do receptor de progesterona e dos fatores de transcrição AP-1, FOXO3 e HOXA5 no corpo lúteo canino ao longo do diestro. E relacionar as interações entre os fatores de transcrição e o PGR à proliferação e a sobrevivência celular do corpo lúteo canino.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

3.1.1 Experimento: RNA-Seq e qPCR

Foram utilizados corpos lúteos provenientes de 30 cadelas clinicamente saudáveis, de diferentes idades e sem padrão racial definido, após aprovação pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil (número do protocolo 2719/2012). O acompanhamento das cadelas para determinar o dia do procedimento cirúrgico ocorreu através de coletas de amostras de sangue, em dias alternados, para dosagem sérica de progesterona e foram coletadas amostras de sangue antes da anestesia para determinar o perfil hormonal de P4 e E2 durante o diestro.

O dia da ovulação (dia 0) foi definido como o dia em que a concentração da progesterona periférica atingiu ≥ 5 ng/mL (CONCANNON; MCCANN; TEMPLE, 1989). Estes animais passaram por ovariectomia (OSH) nos dias 10, 20, 30, 40, 50 e 60 após a ovulação (n= 5/grupo). Após a coleta, os CLs foram dissecados do ovário circundante e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C para extração do RNA para sequenciamento (RNA-Seq) e para análise da expressão gênica por qPCR.

3.1.2 Experimento: Cultivo Celular, RNAi e qPCR

Foram utilizados corpos lúteos provenientes de 20 cadelas (n= 5/grupo) clinicamente saudáveis, de diferentes idades e sem padrão racial definido, provenientes de campanha de castração oferecida pelo Programa Permanente de Controle Reprodutivo de Cães e Gatos da Prefeitura Municipal de São Paulo (Lei Municipal nº 13.131/2001), após aprovação pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil (número do protocolo 4441110716/2016). Estes animais passaram por OSH e após a coleta, os ovários foram selecionados com a presença de CLs, independente da fase de diestro e colocados em solução PBS 1X (Phosphate Buffered Saline) - pH 7.2, para processamento da técnica de cultivo celular e de RNA de interferência (RNAi).

Os grupos foram divididos e comparados entre si. Foram eles: grupo controle (CT), sem tratamento; grupo progesterona (CT+P4) com adição exógena de progesterona; grupo siRNA

controle positivo (siRNA CT +) com adição do siRNA controle positivo (GAPDH); grupo siRNA controle negativo (siRNA CT -) com adição do siRNA controle negativo; e o grupo siRNA do receptor da progesterona (siRNA PGR) com adição do siRNA do receptor de progesterona.

3.2 Extração de RNA

Para o RNA-Seq a extração do RNA total dos corpos lúteos foi realizada a partir do protocolo de TRIZOL (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação do RNA e determinação da razão A260/A280 foram feitas pelo aparelho Biophotometer (Eppendorf, Hamburg, Germany), posteriormente as amostras foram diluídas em uma concentração de 150 ng/μL de RNA. A integridade do RNA foi avaliada no aparelho Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies).

A extração de RNA total do cultivo celular foi realizada pelo protocolo de TRIZOL e a quantificação do RNA e a razão A260/ A280 foram determinadas usando o NanoDrop™ 2000c (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

3.3 Bibliotecas e sequenciamento do RNA

As bibliotecas do RNA-Seq foram construídas usando o TruSeq RNA Sample Preparation (Illumina, San Diego, CA, USA) de acordo com o procedimento padrão do fabricante. A qualidade das bibliotecas produzidas foi avaliada usando o Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) com um chip de DNA 1000. Foram consideradas amostras apropriadas as que apresentaram fragmento próximos a 260 pb. A quantificação individual utilizou o PCR em tempo real através do Kit KAPA Library Quantification (KAPA Biosystems). O sequenciamento do mRNA foi realizado pelo aparelho o *HiScanSQ* (Illumina – San Diego, USA), de acordo com as instruções do fabricante, utilizando o protocolo de *reads paired-end* e o kit TruSeq PE Cluster Kit v3-cBot-HS (Illumina, San Diego, CA, USA). Em cada *lane* seis amostras foram sequenciadas e foi gerada cerca de 42 milhões de reads por amostra.

3.4 Análise dos dados do RNA-Seq

Foi utilizado o *software* CASAVA. 8.2 (Illumina, San Diego, CA, USA) para obtenção dos dados em fastq. Os reads foram mapeados contra o genoma de referência (*Canis_familiaris*.CanFam3.1.75.dna.toplevel.fa) usando o programa Hisat (“Our Galaxy”-ETH-Zurique). Para a filtragem dos pares de bases (pb) foi utilizado a ferramenta “Trimmomatic” do “Our Galaxy”. O programa R-Studio permitiu utilizarmos a lista de genes diferencialmente expressos (Des) gerada pelo QuasR QCount para fazermos as comparações e análises estatísticas entre os diferentes grupos.

Os resultados foram mostrados em forma ordenada, com a respectiva “fold change” entre os grupos comparados e o valor de P corrigido após definirmos uma razão de falsas descobertas (FDR) para 0,01. Os valores de fold-change maiores que 1 e menores que 1 ($>1/<1$), indicaram maior e menor expressão gênica, respectivamente (SILVA et al., 2011; ZUGAIB, 2017). O gene ID do receptor de P4 humano foi identificado no programa bioDBnet (biological DataBase network) a partir do gene ID canino, para a identificação dos TFBS mais representados no receptor de progesterona, no software oPOSSUM 3.0. Os IDs caninos correspondentes aos três fatores de transcrição (AP-1, FOXO3, HOXA5), das enzimas responsáveis pela conversão de progesterona (StAR, CYP11A1 e HSD3B2) e do receptor de progesterona foram selecionados e submetidos no programa DAVID 6.8 (Database for Annotation Visualization and Integrated Discovery) para identificação dos termos do gene ontology (GO): processo biológico (BP), componente celular (CC) e função molecular (MF).

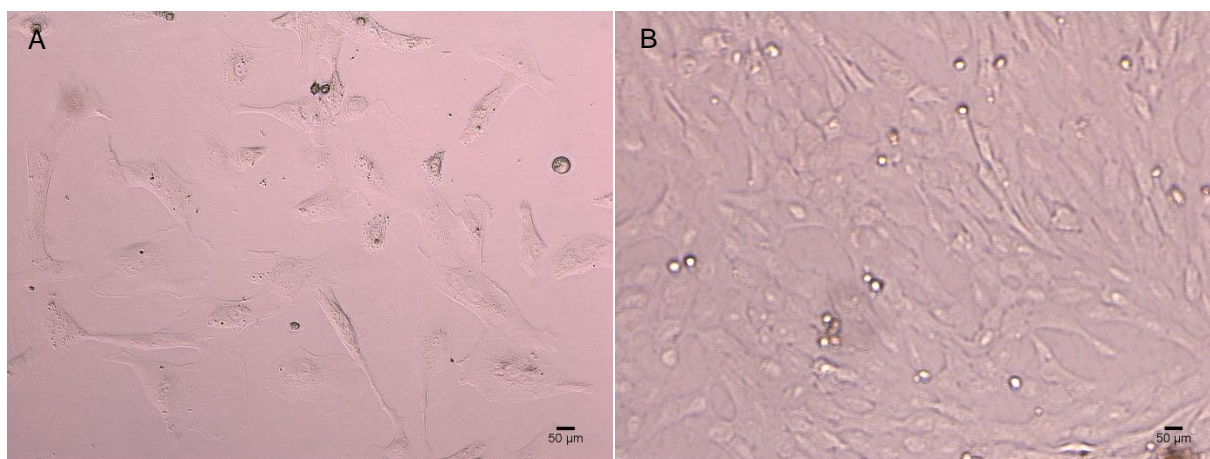
3.5 Cultivo de células luteínicas

Após a remoção cirúrgica, os ovários foram colocados em PBS 1X contendo 1% de solução de antibiótico e antifúngico (15240062; Gibco, Life Technologies). O tecido conjuntivo adjacente foi dissecado, os corpos lúteos remanescentes foram cortados em pedaços de 1 mm. As amostras foram incubadas com 1 mg/mL de colagenase tipo I (C0130; Sigma Aldrich, USA) diluído em DMEM pH 7,2 - 7,4 (41965-039; Gibco, Life Technologies) por 60 minutos sob agitação (60 movimentos/min) à temperatura de 37°C.

O meio cultivo celular DMEM foi suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado a 56°C por 30 minutos, 1% de L-Glutamina a 3%, HEPES 20 mM e solução de antibiótico e antifúngico a 1%. A suspensão celular foi centrifugada por 10 minutos a 200g (força g), a amostra foi ressuspensa em DMEM e filtrada em filtro de 150µm para remover os

tecidos não digeridos. O filtrado foi novamente centrifugado por 10 minutos a 200g, ressuspensão em DMEM por 10 minutos e centrifugado por 10 minutos a 200g, e ressuspensão em DMEM. As suspensões na concentração de 1×10^5 células/mL foram colocadas em placas de 96 poços e incubadas a 37°C sob atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. As células foram observadas em aumento de 20X e pelo microscópio Zeiss e no programa de câmera AxioVision 4.8, posteriormente a troca do meio de cultivo foi realizada em um período de 48 horas até atingir a confluência da camada de células (Figura 1). A curva dose-resposta foi realizada para determinar a concentração de P4 a ser utilizada no meio de cultivo tratado com P4 após a adesão e confluência das células luteínicas. O meio foi suplementado com 500 ng/mL de progesterona (P8783; Sigma Aldrich, USA) por 24 horas.

Figura 1. Cultura de células luteínicas caninas, em cultivo por 07 (A) e 9 dias (B). Microscópio óptico Zeiss, aumento de 20X.



Fonte: Garcia Santos (2019).

3.6 RNA de interferência

Após o estabelecimento da monocamada celular confluenta, as células luteínicas foram manipuladas em meio livre de progesterona para realização da técnica de RNAi. Foram selecionados para o silenciamento e validações o controle negativo, que são siRNAs sem nenhum gene alvo conhecido em humanos, camundongos e ratos; o controle positivo, que são siRNAs projetados para induzir alto knockdown em gene de referência (GAPDH) e dois siRNAs do PGR específicos da espécie canina para aumentar a eficiência da reação (Tabela 1). Os siRNAs foram ressuspensos em 1X siRNA Buffer (Dharmacon, USA) para o preparo da

solução estoque de 5 μ M de siRNA. Para o preparo de 25nM de siRNA por poço (placa de 96 poços), 0,5 μ L da solução estoque foi diluída em 9,5 μ L de meio livre de soro - Opti-Men I (Invitrogen, CA, USA). Para o preparo da solução de transfecção, 0,2 μ L de DharmaFECT 1 (T-2001-0X; Dharmacon, USA) foram diluídos em 9,8 μ L de meio livre de soro para cada poço. Após a incubação por 5 minutos, as soluções contendo siRNA e reagente de transfecção foram adicionados e incubados por 20 minutos em temperatura ambiente. O meio de cultura foi removido da placa de 96 poços e 100 μ L da solução de transfecção foi pipetada na placa e incubada a 37°C em 5% de CO₂ por 48 horas, para análise de mRNA.

Após 48 horas, as células luteínicas silenciadas foram coletadas das placas de cultivo utilizando TRIzol® e armazenadas a -80°C até a extração de RNA. Em seguida foi realizada a análise de qPCR para validação da técnica e a expressão do receptor de progesterona e do GAPDH foi avaliada nos diferentes grupos. Após validação da técnica de RNAi, foi verificada a expressão dos genes alvos deste estudo.

Tabela 1. Dados referenciais dos silenciadores gênicos utilizados na técnica de RNAi

siRNAs	Nº de ordem	Fornecedor
Controle negativo	AM4611	Invitrogen, USA
Controle positivo	AM4624	Invitrogen, USA
Silencer PGR 1	AB5IQG0	Invitrogen, USA
Silencer PGR 2	CTM-427957	Dharmacon, USA

Fonte: Garcia Santos (2019).

3.7 Transcrição reversa e PCR em tempo real

A partir das análises de concentração e de qualidade do RNA nas amostras do corpo lúteo (*in vivo*) e nas células luteínicas cultivadas, a integridade do RNA foi analisada por electroforese através de gel de agarose 2%. As amostras (100 ng/uL de RNA total) foram transcritas para cDNA (DNA complementar) utilizando a transcriptase reversa Superscript III® (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; as amostras foram analisadas ao menos em duplicatas.

Foi utilizada a amplificação dos genes constitutivamente expressos gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), proteína ribossomal 13 (RPL13) e a hipoxantina fosforibosil-transferase (HPRT-1), a fim de normalizar os resultados obtidos para os genes alvos caninos, PGR, StAR, CYP11A1, HSD3B2, AP-1 (c-Jun), FOXO3 e HOXA5 (Tabela 2), tanto em tecido quanto em células cultivadas. Baseado no programa Normfinder (ANDERSEN; JENSEN; ØRNTOFT, 2004), o gene GAPDH foi selecionado como o gene de referência para as análises.

O cálculo da eficiência para os genes alvos e de referência foram feitos através do programa LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003), pelo do método de Livak e Schmittgen (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). O cálculo da quantificação relativa dos genes-alvo foi feito através da fórmula de Pfaffl (PFAFFL, 2001).

Tabela 2. Primers TaqMan (FAM-MGB) utilizados nas análises de amplificação gênica pela técnica de PCR em tempo real.

Primers	Sequências	GenBank
PGR	Cf02741613_m1	NM_001003074.1
StAR	Cf02693876_m1	NM_001097542.1
CYP11A1	Cf02635588_g1	XM_535539.5
HSD3B2	Cf02626834_m1	NM_001010954.2
AP-1 (c-Jun)	Cf02696722_g1	XM_005620245.2
FOXO3	Cf02730305_m1	XM_003639400.3
HOXA5	Cf02712180_u1	XM_005628657.2
GAPDH	Cf04419463_gH	NM_001003142.2
HPRT-1	Cf02690456_g1	NM_001003357.2
RPL13	Cf02666375_g1	XM_536749.4

Fonte: Garcia Santos (2019).

3.8 Análise estatística

Os dados do qPCR foram analisados com relação a normalidade através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Para comparação dos tratamentos (Controle, Controle Negativo, Controle com P4 e siRNA PGR) e períodos (10, 20, 30, 40, 50 e 60), foi utilizado o teste de Kruskal Wallis e em caso de diferença significativa, as médias foram comparadas por meio do teste de Student Newman Keuls. Ainda, para a comparação dos períodos (10, 20, 30, 40, 50 e

60) foi realizada análise de regressão e a análise do coeficiente de correlação de Pearson (r) para verificar correlação linear significativa ($p < 0,05$) entre os genes e as concentrações plásmaticas de P4 (ng/mL) e E2 (pmol/L). Para comparação dos genes (PGR, StAR, CYP11A1, HSD3B2, AP-1, FOXO3 e HOXA5) foi utilizado o teste de Mann Whitney. As análises foram realizadas no programa SAS utilizando nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

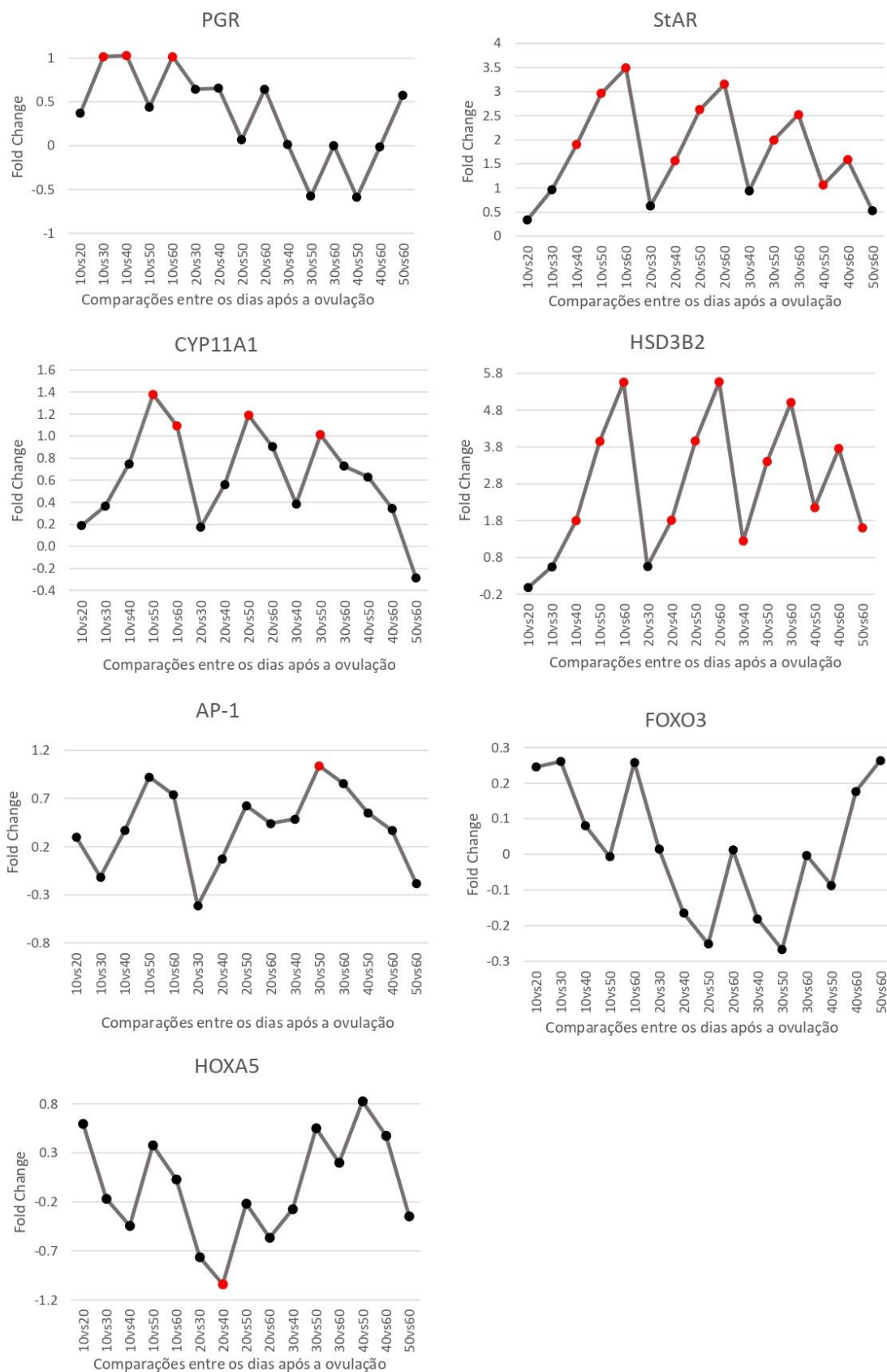
4 RESULTADOS

4.1 RNA-Seq

Um total de 771.208.718 reads foram gerados pelo Illumina HiScanSQ, com um tamanho médio de 100 bp, média de 11 milhões de counts (nº de reads) por amostra. Através do software Hisat, 203.923.337 reads foram mapeados pelo genoma canino de referência. A análise de bioinformática detectou a presença de 15.240 genes nas amostras analisadas, sendo que deste total 940 ainda não foram anotados no genoma canino. A análise de expressão gênica revelou a presença de 4.744 genes diferencialmente expressos (DE) em pelo menos uma comparação (10vs60).

A expressão gênica do receptor de progesterona, dos genes relacionados à sua síntese e dos fatores de transcrição foram analisados segundo aos valores de fold-change ($>1/<1$), na comparações entre os dias 10vs20, 10vs30, 10vs40, 10vs50, 10vs60, 20vs30, 20vs40, 20vs50, 20vs60, 30vs40, 30vs50, 30vs60, 40vs50, 40vs60 e 50vs60 (Figura 2).

Figura 2 – Análise da expressão gênica pelo fold-change (RNA-Seq), nas diferentes comparações dos dias após a ovulação. Os pontos vermelhos indicam que houve uma expressão diferencial entre as comparações pelo valor de fold-change: > 1 (indica regulação positiva) ou < 1 (indica regulação negativa). Os pontos pretos mostram que não houve expressão diferencial entre as comparações pelo valor de fold-change.



Fonte: Garcia Santos (2019).

4.2 Sítios de ligação a fatores de transcrição no receptor de progesterona

Foram identificados os TFBS na sequência do receptor de progesterona pelo software oPOSSUM 3.0. Os sítios de ligação mais representados incluíam 17 fatores de transcrição (Tabela 3).

Tabela 3. Os fatores de transcrição e o n° de sítios de ligação mais representados para o receptor de progesterona pela análise do oPOSSUM 3.0.

Fator de transcrição	Família	n° de TFBS
AP-1 (c-Jun)	Leucine Zipper	2
FOXO3	Forkhead	1
HOXA5	Homeo	3
Gata1	GATA	3
USF1	Helix-Loop-Helix	1
NFATC2	Rel	2
FOXI1	Forkhead	1
YY1	BetaBetaAlpha-zinc finger	3
Nkx2-5	Homeo	3
Prrx2	Homeo	2
FOXD1	Forkhead	1
Gfi	BetaBetaAlpha-zinc finger	1
NKX3-1	Homeo	1
ARID3A	Arid	2
SRY	High Mobility Group	1
ELF5	Ets	1
Pdx1	Homeo	1

Fonte: Garcia Santos (2019).

4.3 Identificação funcional pelo Gene Ontology (GO)

Um cluster baseado no termo GO referente ao termo componente celular núcleo, foi estabelecido pelo ‘Enrichment Score’ de 1.74 para o PGR, FOXO3 e HOXA5 pela análise no DAVID 6.8.

Foram identificados 08 GO referentes aos termos do BP, CC e MF exclusivos para o grupo de genes PGR, StAR, CYP11A1, HSD3B2, AP-1, FOXO3, HOXA5 e para o grupo dos fatores de transcrição AP-1, FOXO3 e HOXA5 foram identificados 16 GO referentes aos domínios funcionais (Tabela 4).

Tabela 4 -Identificação dos termos de ontologia para os genes PGR, StAR, CYP11A1, HSD3B2, AP-1, FOXO3, HOXA5 (DAVID 6.8).

Genes	Gene ontology
PGR, StAR, CYP11A1, HSD3B2, AP-1, FOXO3, HOXA5	GO:1901576-organic substance biosynthetic process, GO:0009058-biosynthetic process, GO:0071704-organic substance metabolic process, GO:0008152-metabolic process, GO:0043231-intracellular membrane-bounded organelle, GO:0043229-intracellular organelle, GO:0043227-membrane-bounded organelle, GO:0043226-organelle
AP-1, FOXO3, HOXA5	GO:0030099-myeloid cell differentiation, GO:0045597-positive regulation of cell differentiation, GO:0030097-hemopoiesis, GO:0048534-hematopoietic or lymphoid organ development, GO:0002520-immune system development, GO:0009887-organ morphogenesis, GO:0042981-regulation of apoptotic process, GO:0043067-regulation of programmed cell death, GO:0010941-regulation of cell death, GO:0051240-positive regulation of multicellular organismal process, GO:0042127-regulation of cell proliferation, GO:0006915-apoptotic process, GO:0045595-regulation of cell differentiation, GO:0012501-programmed cell death, GO:0008283-cell proliferation, GO:0008219-cell death

Fonte: Garcia Santos (2019).

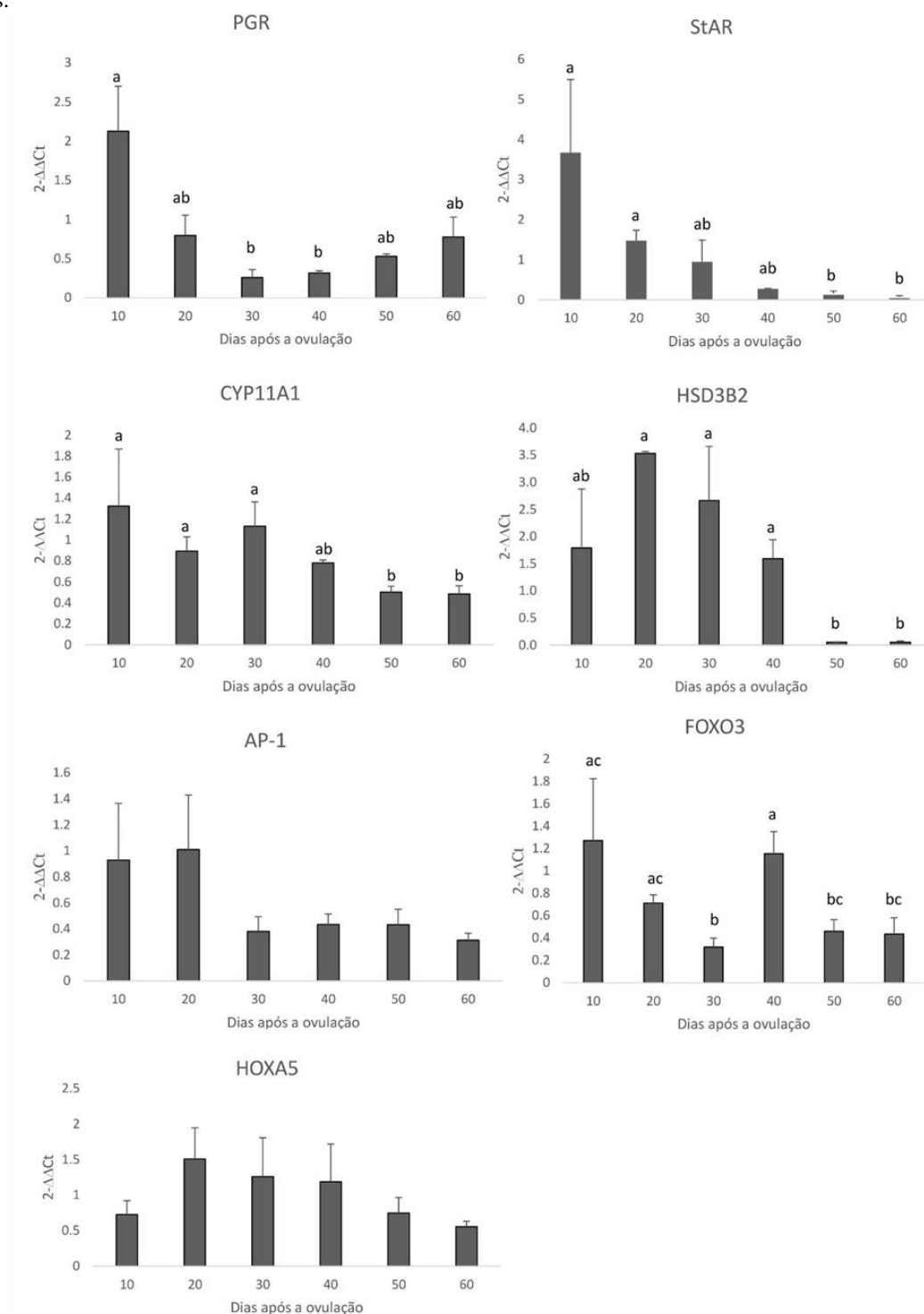
Foram selecionados os fatores de transcrição AP-1, FOXO3 e o HOXA5 por evidências científicas na literatura, expressão gênica (RNA-Seq) e identificação funcional pelo gene ontology.

4.4 Expressão dos genes PGR, StAR, CYP11A1, HSD3B2, AP-1, FOXO3 e HOXA5 em corpos lúteos durante o diestro.

Não houve diferença significativa na expressão de mRNA em AP-1 ($p=0,3148$) e HOXA5 ($p=0,5601$) durante os períodos do diestro. A expressão do mRNA do PGR se altera significativamente com expressão alta no dia 10 p.o ($p<0,05$) e diminuição no dia 30 e 40 p.o ($p<0,05$). O gene StAR mostra uma variação na expressão com aumento do dia 10 para 20 p.o ($p<0,05$) e diminui após o dia 50 p.o ($p<0,05$). A expressão gênica do CYP11A1 está aumentada no dia 10, 20 e 30 p.o ($p<0,05$) em relação aos dias 50 e 60 p.o. O gene HSD3B2 apresentou expressão maior nos dias 20, 30 e 40 p.o ($p<0,05$) e diminuída nos dias 50 e 60 p.o ($p<0,05$). A expressão do fator de transcrição FOXO3 está aumentada nos dias 10, 20 e 40 p.o ($p<0,05$) em relação ao dia 30 p.o ($p<0,05$) e ainda é possível verificar a diminuição da expressão após o dia 50 p.o em relação ao aumento no dia 40 p.o ($p<0,05$, figura 3). Os resultados de regressão linear

foram: PGR: $Y = 44,2447 - 11,5344X$ ($R^2 = 0,2473$, $p=0,0330$), StAR: $Y = 40,3074 - 5,3749X$ ($R^2 = 0,3146$, $p=0,0428$), CYP11A1: $Y = 52,2240 - 19,5969X$ ($R^2 = 0,3136$, $p=0,0446$), HSD3B2: $Y = 42,51262 - 4,19218X$ ($R^2 = 0,254063$, $p=0,0097$) e FOXO3: $Y = 41,7827 - 9,7874X$ ($R^2=0,1189$, $p=0,0206$), todos significativos apesar de R^2 variar entre 0,12 e 0,31.

Figura 3. Expressão dos genes PGR, StAR, CYP11A1, HSD3B2, AP-1, FOXO3 e HOXA5 em corpos lúteos durante os períodos do diestro canino (10 – 60 dias p.o). Os dados são apresentados com a média e o erro padrão da expressão gênica relativa ($n = 4$ animais). Barra com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos.

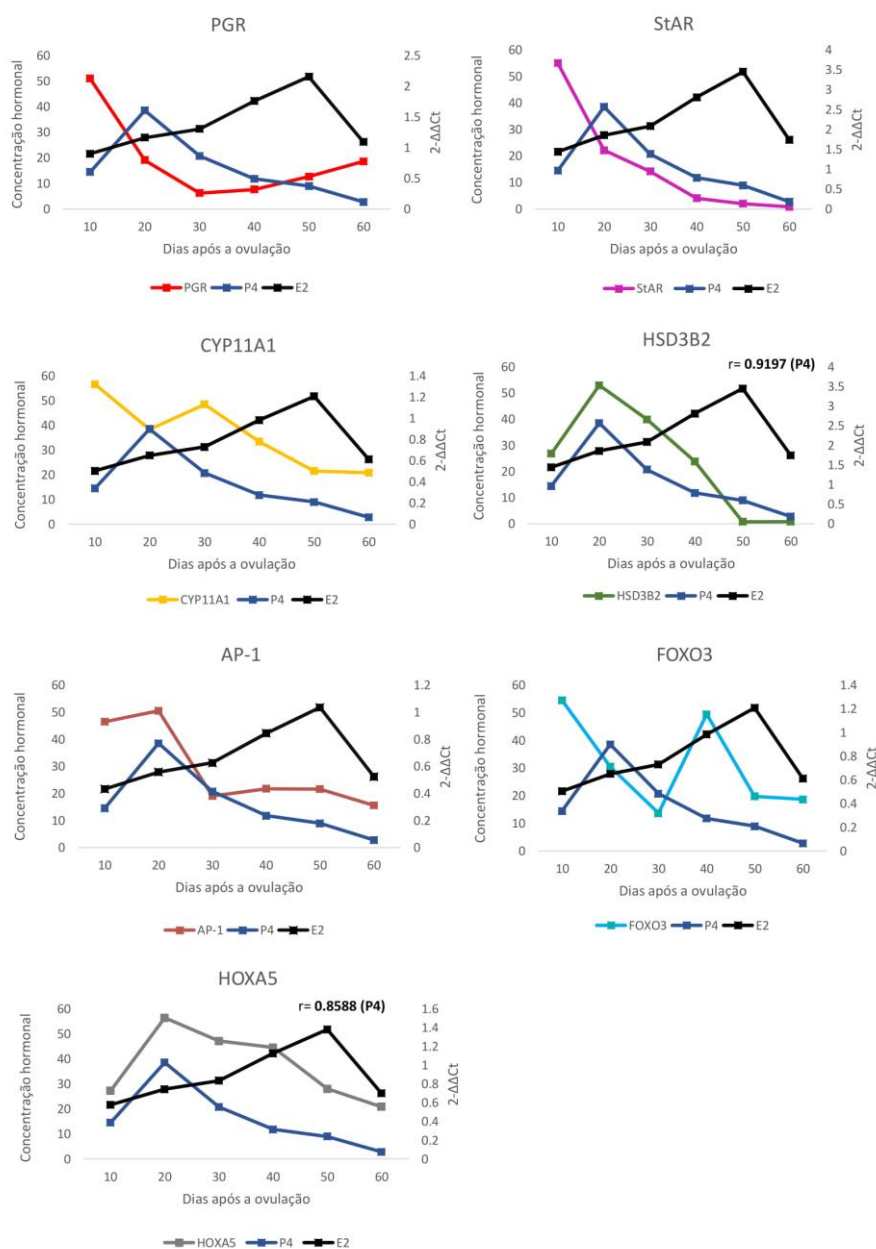


Fonte: Garcia Santos (2019).

4.5 Correlação entre a expressão dos genes PGR, StAR, CYP11A1, HSD3B2, AP-1, FOXO3 e HOXA5 e as concentrações plasmáticas de P4 e E2, e correlação entre as expressões dos genes durante o diestro canino.

As correlações com as concentrações plasmáticas de P4 e E2 durante o diestro canino foram realizadas a partir dos dados obtidos anteriormente pelo nosso grupo (CARDOSO, 2016). Houve correlação positiva entre o gene HSD3B2 e P4 ($r= 0,9197$, $p= 0,0094$), e entre o HOXA5 e P4 ($r= 0,8588$, $p=0,0284$) (Figura 4).

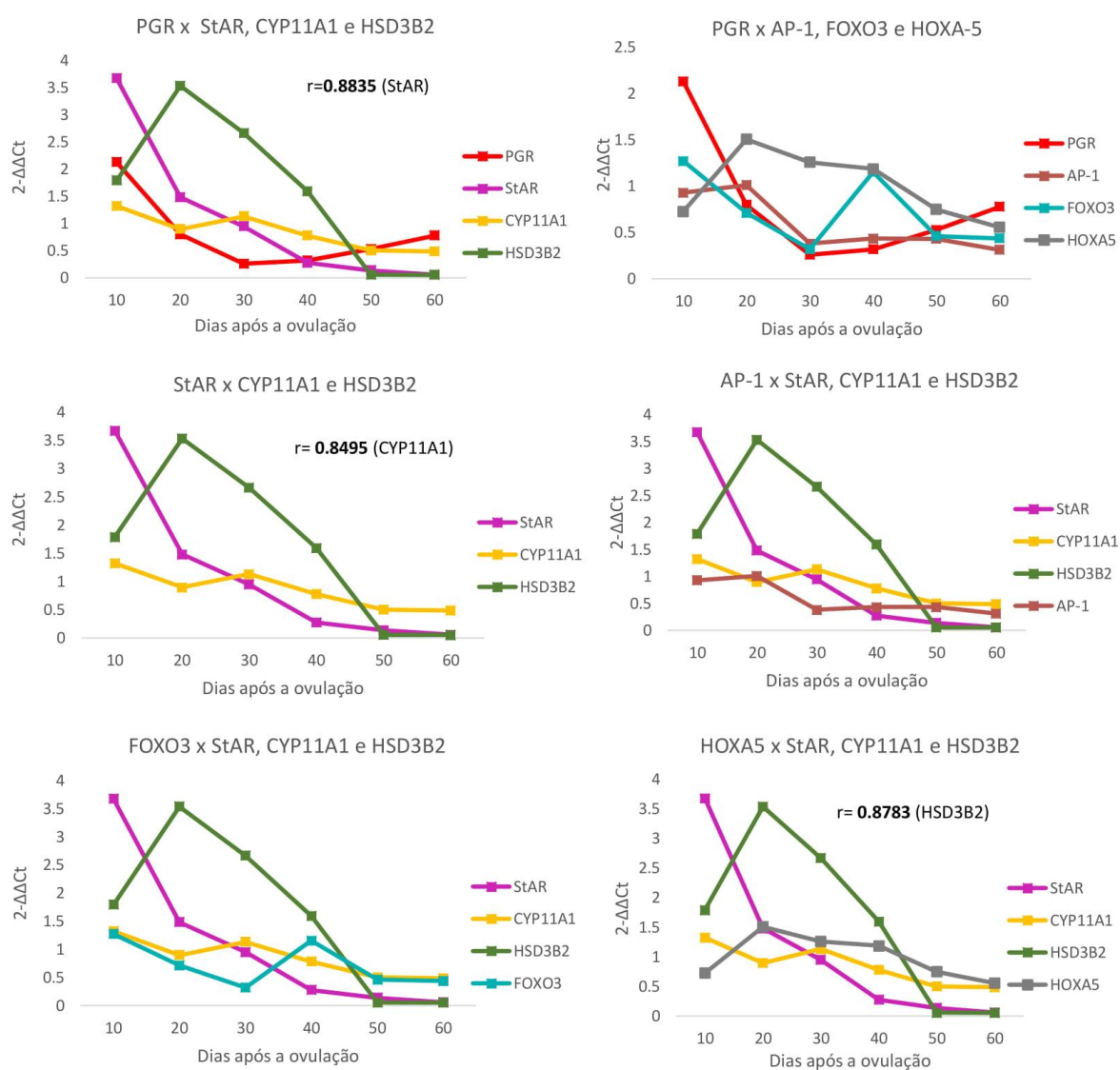
Figura 4. Análise de correlação linear entre os genes e os hormônios P4 (ng/mL) e E2 (pmol/L) durante o diestro canino. Os valores de correlação significativos ($p<0,05$) estão apresentados por r de Pearson.



Fonte: Garcia Santos (2019).

As análises de correlação entre as expressões dos genes durante os períodos do diestro, mostraram que expressão do gene PGR ($r= 0,8835$, $p=0,0195$) apresentou correlação positiva com a StAR, assim como a StAR e a CYP11A1 ($r= 0,8495$, $p= 0,0322$). O HOXA5 apresentou correlação positiva com a HSD3B2 ($r= 0,8783$, $p= 0,0213$; figura 5).

Figura 5. Análise de correlação linear entre a expressão dos genes durante o diestro canino. Os valores de correlação significativos ($p<0,05$) estão apresentados por r de Pearson.

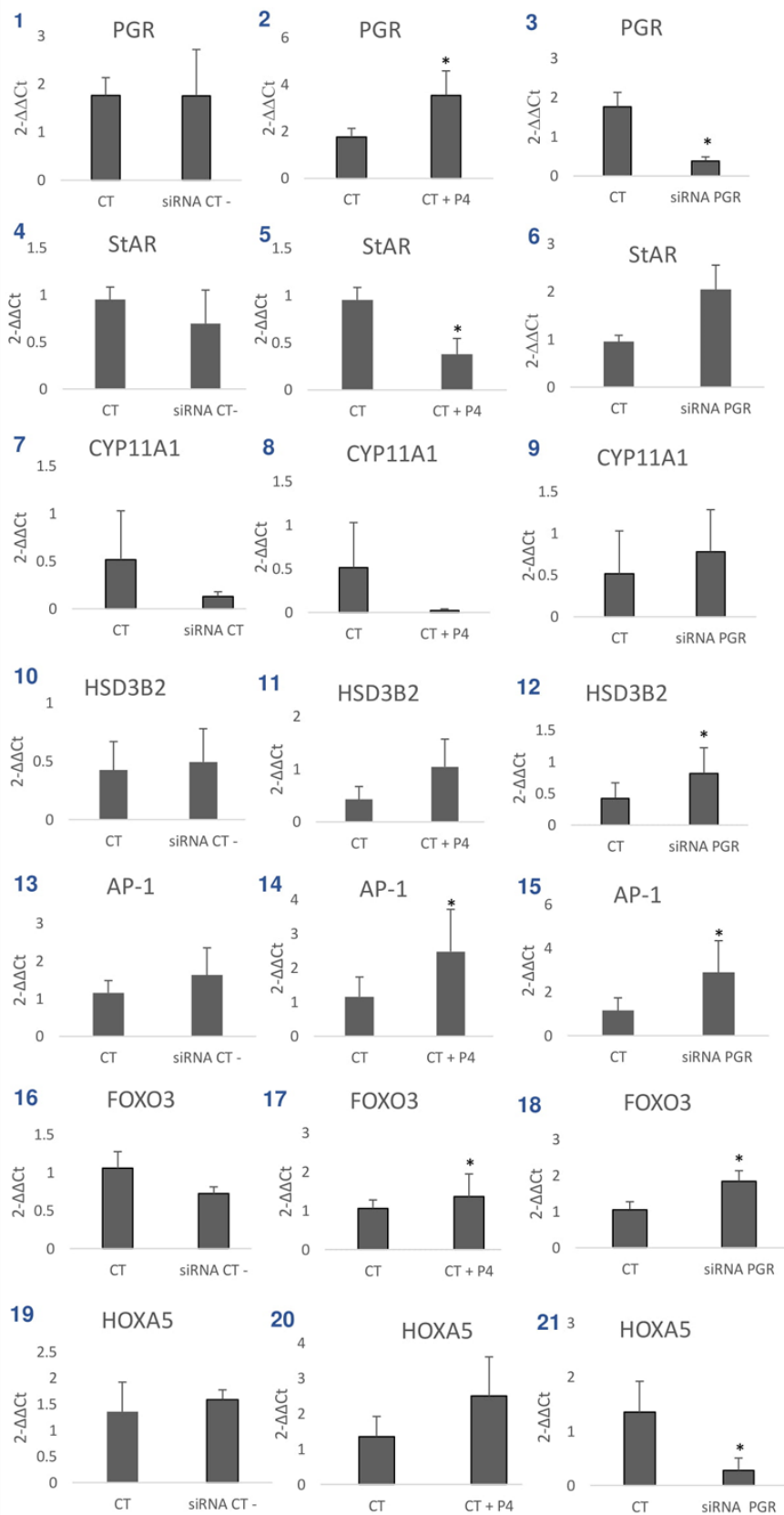


Fonte: Garcia Santos (2019).

4.6 Expressão dos genes PGR, StAR, CYP11A1, HSD3B2, AP-1, FOXO3 e HOXA5 em cultivo de células luteínicas caninas e tratadas com siRNA controle negativo, com progesterona e com siRNA do PGR.

A expressão dos genes alvos em cultivo de células luteínicas foi analisada e os dados encontram-se na figura 6. Quando as células foram estimuladas com P4 em cultivo celular, os valores de P4 obtidos no meio de cultivo tiveram a média de 40 ng/mL. Não houve diferença significativa dos genes avaliados entre o grupo controle e o grupo controle negativo ($p > 0,05$), indicando que o silenciamento gênico em si não interferiu na expressão gênica. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) nas análises do grupo controle e grupo controle tratado com P4 para os genes PGR ($p = 0,0385$), StAR ($p = 0,0248$) e AP-1 ($p = 0,0169$); entre o grupo controle e grupo siRNA PGR houve diferença significativa para os genes PGR ($p = 0,0169$), HSD3B2 ($0,0385$), AP-1 ($p = 0,0169$), FOXO3 ($p = 0,025$) e HOXA5 ($p = 0,0194$). Houve expressão diferencial entre o grupo controle tratado com P4 e o grupo siRNA PGR para os genes PGR ($p = 0,0248$), StAR ($p = 0,0248$), CYP11A1 ($p = 0,0169$) e HOXA5 ($p = 0,0194$).

Figura 6. Expressão do gene PGR (1-3), StAR (4-6), CYP11A1 (7-9), HSD3B2 (10-12), AP-1 (13-15), FOXO (16-18), HOXA5 (19-21) em cultivo de células luteínicas nos grupos tratados com o controle negativo, com a progesterona e com o siRNA PGR. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da expressão gênica relativa (n= 4 animais). Legenda: CT= grupo controle, siRNA CT - = grupo com siRNA controle negativo, CT + P4= grupo com progesterona e siRNA PGR= grupo com siRNA PGR.

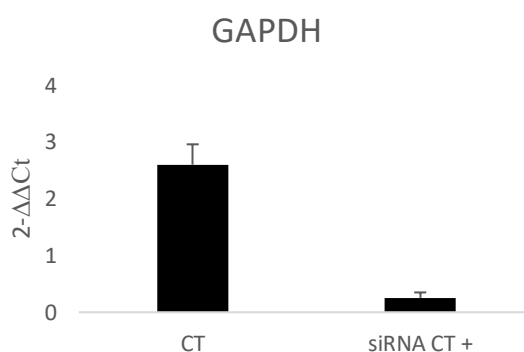


Fonte: Garcia Santos (2019).

4.7 Validação da transfecção por siRNA controle positivo

A transfecção do siRNA controle positivo apresentou diferença significativa ($p < 0,0001$) em relação ao grupo controle na expressão do gene GAPDH para validação da reação de RNAi (Figura 7), indicando que o silenciamento gênico pelo siRNA PGR foi efetivo.

Figura 7. Expressão gênica relativa do grupo controle e do grupo controle positivo para siRNA em amostras de cultivo de células luteínicas caninas. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da expressão gênica relativa ($n = \pm 18$ animais).



Fonte: Garcia Santos (2019).

5 DISCUSSÃO

Este estudo revelou que a expressão dos fatores de transcrição AP-1 e FOXO3 é aumentada pela P4 e pelo silenciamento do PGR (siPGR), enquanto a do HOXA5 é diminuída pelo siPGR e não sofre influência de P4 em células luteínicas cultivadas. Os nossos dados sugerem que o receptor de progesterona atue no CL canino cíclico através da ligação a TFs que ativam ou reprimem a transcrição de genes alvos. Além disso, a expressão do PGR pode modular negativamente a expressão da HSD3B2 e positivamente a sua própria expressão.

As análises de expressão gênica por RNA-Seq e qPCR, mostraram maior expressão do PGR no dia 10 em comparação aos dias 30 e 40 p.o, o que poderia ser indicativo de sua participação no período de formação do CL (CONCANNON; MCCANN; TEMPLE, 1989). A expressão PGR aumenta sob efeito da P4, como foi demonstrado em nossos resultados e também por CHENG et al. (2008), KOWALEWSKI et al. (2010), DIEP; AHRENDT; LANGE (2016), indicando um feedback positivo que garante o amadurecimento do CL e alcance da máxima produção de P4 por volta do dia 20-25 p.o. Quando a produção de P4 começa a diminuir a partir do dia 30 p.o, diminui também a expressão do PGR. Concomitantemente ocorre aumento da produção de E2 a partir do dia 30 p.o, que se mantém no dia 40 p.o se comparados

aos dias 10 e 60 p.o (fases de formação e final de regressão do CL) (PAPA et al., 2014). A expressão do PGR nos dias 50 e 60 p.o não difere da expressão do início do diestro (dias 10 e 20 p.o) o que sugere um efeito estimulatório de E2, que aumenta a transcrição do receptor de progesterona via expressão do ER (CABRERA-MUÑOZ; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ; CAMACHO-ARROYO, 2011; DUEÑAS JIMÉNEZ ET AL., 2014).

Em nosso estudo, a expressão de StAR, CYP11A1 e HSD3B2 apresentou-se aumentada no período de formação do CL, como já foi relatado em vários estudos por Kowalewski e colaboradores (KOWALEWSKI et al., 2006b, 2013; KOWALEWSKI; HOFFMANN, 2008). A síntese de P4 ocorre a partir da enzima StAR, que realiza o transporte de colesterol da membrana mitocondrial externa para a interna, enquanto CYP11A1 realiza sua conversão para pregnenolona, a qual por sua vez é convertida a P4 pela 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase. Em suínos, transcrição da StAR e a tradução de seu mRNA estão aumentadas durante a luteinização do corpo lúteo (MIRANDA-FURTADO et al., 2010), sugerindo que a P4 regule sua própria síntese (LAVOIE; SINGH; HUI, 2004) provavelmente através da expressão da HSD3B2, uma vez que nosso estudo mostrou uma correlação positiva da HSD3B2 com a síntese de P4 durante o diestro. O PGR também pode estar envolvido neste processo posto que observamos uma correlação positiva do PGR com a StAR. Adicionalmente, a correlação positiva entre a StAR e CYP11A1 indica que a manutenção do corpo lúteo durante o diestro canino necessita da expressão de ambas as enzimas de forma sincronizada.

Em nosso trabalho, a expressão da StAR em células luteínicas cultivadas foi diminuída sob adição de 500 ng/mL P4 e quando o PGR foi silenciado, ou seja, a P4 não poderia se ligar a seu receptor, sua expressão não se modificou comparada a células não tratadas, o que indica uma necessidade intrínseca do CL de exprimir StAR para garantir sua sobrevivência. Por outro lado, a HSD3B2 se mostrou regulada principalmente por PGR, pois quando houve silenciamento do PGR, também houve maior expressão da HSD3B2, enfatizando os resultados obtidos para StAR. Hauet e colaboradores mostraram que a inibição da StAR e da proteína translocadora (TSPO) são induzidas hormonalmente e podem diminuir a síntese de progesterona (HAUET et al., 2005), o que corrobora com nossos resultados. Em um outro estudo em células Leydig de camundongo com a adição de aminoglutotimida, inibidor da CYP11A1 (P450_{scc}), os resultados demonstraram inibição da síntese de P4 e da expressão da StAR (SCHWARZENBACH et al., 2003).

A identificação de fatores de transcrição e os processos biológicos nos quais estão envolvidos são fundamentais para a compreensão de mecanismos regulatórios. No entanto, as mudanças de atividade dos fatores de transcrição geralmente são sutilmente observadas devido

a níveis de expressão relativamente baixos em comparação com outros genes e a modificações pós-transcricionais (CONLON et al., 2003). Os nossos dados demonstraram nível baixo de expressão, porém detectáveis e diferencialmente regulado a depender da fase do diestro. Foi relatada relação linear entre a expressão gênica e a força de ligação dos fatores de transcrição (CHENG et al., 2007). Os fatores de transcrição estão expressos diferencialmente ao longo do diestro e isso pode ser um reflexo das alterações hormonais que ocorrem durante esses períodos, influenciando a transcrição do receptor de progesterona e a funcionalidade do corpo lúteo canino.

A expressão do AP-1 foi determinada no corpo lúteo canino, assim como o membro c-Jun desta família foi identificado no núcleo e no citoplasma de células luteínicas suínas (RUSOVICI; LAVOIE, 2003). Os dados da expressão do AP-1 na análise de RNA-Seq mostrou um aumento de AP-1 no dia 30 p.o em comparação ao dia 50 p.o e sugere que o AP-1 possa estar envolvido no controle da proliferação do corpo lúteo canino, uma vez que o c-Jun é considerado um regulador negativo da expressão do p53 quando ligado ao sítio de AP-1 dentro do promotor do p53, reprimindo-o. Entre as proteínas Jun, o c-Jun é único com capacidade de regular positivamente a proliferação, através da repressão do p53 e indução da transcrição da ciclina D1 que é um regulador da transição G1/S e da proliferação celular (HYDBRING; MALUMBRES; SICINSKI, 2016), e seu promotor contém elementos de resposta para um amplo número de fatores de transcrição, entre eles um local de ligação para AP-1 (ALBANESE et al., 1995; DÍAZ FLAQUÉ et al., 2013).

Nas análises do cultivo celular, destacamos o aumento do AP-1 nas amostras com adição exógena de P4 (500 ng/mL) e nas silenciadas com o siRNA PGR, corroborando com os dados de proliferação, diferenciação e transformação celular (SHARMA; RICHARDS, 2000). A influência do aumento da P4 em relação ao fator de transcrição AP-1 também foi verificada em um estudo com úteros de ratas ovariectomizadas: a progesterona aumentou a expressão de mRNA de c-Jun e de c-Fos (RIDER; KIMLER; JUSTICE, 1998). Ainda, em outro com células da granulosa de camundongos, a ligação do PGR aos domínios alvos na cromatina através de fatores de transcrição e como o AP-1, são essenciais para a ovulação e fertilidade (DINH et al., 2019). Além disso, foi evidenciado a presença dos fatores de transcrição AP-1 no desenvolvimento folicular que antecede o pico de LH, evento caracterizado por proliferação e presença predominante de c-Jun e c-Fos nos estágios pré-ovulatórios, que atuam como ativadores positivos da proliferação (ANGEL; KARIN, 1991).

Adicionalmente, sugere-se que o PGR altere a transcrição gênica de AP-1 por meio da via de sinalização rápida, ativando transitoriamente proteínas quinases, como a via da

PI3K/AKT e MAPK em diversos tipos de células e uma variedade de fatores de transcrição via fosforilação (MIGLIACCIO et al., 1998; BOONYARATANAKORNKIT et al., 2001; FAIVRE et al., 2008; GIULIANELLI et al., 2012).

O FOXO3 é um fator de transcrição que demonstra estar relacionado aos processos proliferativos e de regressão no CL canino, pois estudos revelaram que à medida que as células da granulosa luteinizam ocorre um aumento nos níveis do FOXO3 (RICHARDS et al., 2002). Porém foi descrito que a superexpressão do FOXO3 inibe significativamente o crescimento de tumores da mama *in vitro*, em modelos animais e afeta negativamente a angiogênese (HU et al., 2004; POTENTE et al., 2005; YANG et al., 2008; ZOU et al., 2008).

O fator de transcrição FOXO3 é um alvo-chave da via PI3K/AKT e são centrais para uma diversidade de funções celulares, como estresse oxidativo, reparo ao DNA, regulador da proliferação celular, parada do ciclo celular, regulação transcricional do CCND1, autofagia, resistência à glicólise e apoptose. Quando FOXO3 está ativo, encontra-se presente predominantemente no núcleo, funcionando como um fator de transcrição que estimula a expressão de genes pró-apoptóticos. Com o aumento de FOXO3 observado em nosso estudo no dia 40 p.o, sugerimos que ele também exerça este papel no CL canino (BURGERING, 2008; CALNAN; BRUNET, 2008).

Na ativação da via PI3K, o FOXO3 é fosforilado por AKT e transloca-se do núcleo para o citoplasma, onde é degradado (BURGERING, 2008; CALNAN; BRUNET, 2008). A rápida translocação de FOXO3 do núcleo para o citoplasma ocorre após a estimulação com estrógeno (ZEKAS; PROSSNITZ, 2015), assim como as funções do FOXO3 podem ser alteradas por este hormônio (THOMPSON et al., 2017). Sugere-se que o FOXO3 possa interagir e suprimir a atividade de transativação de ERa e ERb, inibindo significativamente a expressão de determinados genes regulados por ER que estão envolvidos no crescimento celular ou sobrevivência, como a ciclina D1 e PGR. Adicionalmente, os efeitos de FOXO3 na regressão podem ser similares aos relatados pela superexpressão do FOXO1 em linhagens celulares específicas para PGR (linhagem Ishikawa), nas quais FOXO1 causa interrupção do ciclo celular e diminui significativamente a proliferação na presença e ausência de progesterona (WARD et al., 2008). Os resultados da adição exógena de P4 (500 ng/mL) às células luteínicas caninas e de silenciamento do PGR mostraram aumento da expressão do FOXO3, o que sugere efeito na negativo de manutenção do corpo lúteo canino. O aumento de mRNA do FOXO3 também foi verificado em cultura celular de músculos esqueléticos quando houve ativação da AMPK (NAKASHIMA; YAKABE, 2007). Por ser capaz de interagir com o PGR ativado, o FOXO3 regula a expressão de genes alvo se ligando a uma região promotora específica do

PGR com sítios de ligação para FOXOs (LAM; SHAH; BROSENS, 2012) mas também pode agir como um cofator do PGR, e são considerados reguladores importantes da homeostase tecidual (LAM; SHAH; BROSENS, 2012). Diante desses dados podemos propor que a modulação da expressão do FOXO3 nos períodos de formação e regressão do corpo lúteo podem ser influenciados pela síntese de P4 e E2 durante o diestro (CARDOSO, 2016), assim como a expressão de seus receptores e/ou outros mecanismos ainda a serem descobertos.

Os fatores de transcrição podem operar por associações a outros fatores de transcrição formando um aparato transcricional, como sugerido pelo aumento concomitante da expressão do AP-1 e FOXO3 em resposta à adição exógena de progesterona (500 ng/mL) e pelo silenciamento do PGR no cultivo celular. Foi descrito que a jun-N-terminal-quinase (JNK) que é um membro da família das proteínas quinase ativadas por estresse oxidativo (WANG; HU; LIU, 2017) pôde promover a translocação nuclear e a atividade do FOXO3, ativando o AP-1 em resposta ao stress causado por jejum intermitente em nematódeo e artrópode (LUO et al., 2007; UNO et al., 2013).

A análise de RNA-Seq realizada em CLs de 3 cadelas por grupo foi sensível para a identificação do aumento de expressão do fator de transcrição HOXA5 no dia 40 em relação ao 20 p.o, mas a validação por qPCR, que analisou 5 cadelas por grupo e inseriu maior variação individual, não confirmou este resultado. Dados recentes demonstraram que a perda da expressão de HOXA5 em tumor no câncer de mama, diminui a E-caderina, o CD24 e o p53, que são supressores tumorais (TEO et al., 2016; PAI; WANG; SUKUMAR, 2018). Em vista disso, o silenciamento do PGR gerou uma regulação negativa da expressão do HOXA5, permitindo que ocorra a proliferação. Redução ou falta de expressão de HOXA5 durante o desenvolvimento do câncer de mama, pode levar à queda da expressão de p53, o que impede a função desse importante supressor de tumor (RAMAN et al., 2000). O HOXA5 se correlacionou positivamente com a P4 e a HSD3B2 durante o diestro e como demonstrado em células do estroma ovariano no metaestro, o aumento da expressão de HOXA5 no CL durante a gestação indica uma ação positiva da progesterona (GENDRONNEAU et al., 2012).

Experimentos de deleção e mutação da região promotora do PGR identificaram apenas um local de ligação ao HOXA5 necessário para a transativação do PGR (RAMAN et al., 2000). Nossos resultados apontam para uma correlação negativa do HOXA5 e PGR, o que poderia implicar o HOXA5 no processo de regressão do CL canino, como regulador negativo do PGR. Um possível mecanismo foi proposto a partir de um estudo em células de câncer de cérvix. Foi evidenciado que a expressão da p27, uma proteína que medeia a interrupção do ciclo celular bloqueando a transição de G1 para S (FABRIS et al., 2015) possa ser regulada via ativação

AKT (MEYER et al., 1992; NARITA et al., 2002). O HOXA5 pode regular positivamente a p27 através do controle da fosforilação de AKT e inibir o desenvolvimento do câncer. O HOXA5 pode regular a proliferação celular, a atividade da caspase-3, a apoptose, a invasão e viabilidade celular via AKT/p27 (WANG; YU; WANG, 2019).

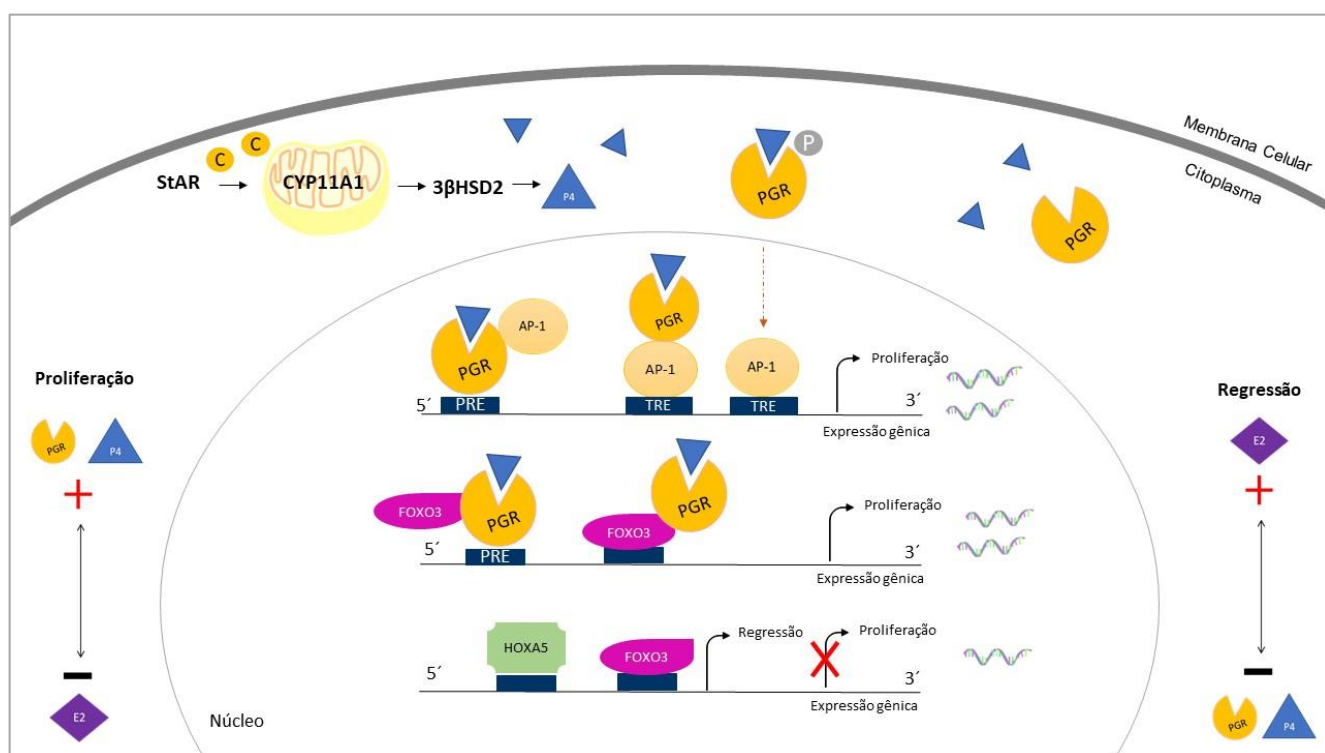
No endométrio humano foi constatado que a ligação entre o PGR e fatores de transcrição geralmente promovem a expressão gênica ao invés de reprimi-la, mostrando uma correlação positiva entre a alteração da ligação ao PGR e a regulação transcricional, ou seja, o aumento da ligação ao PGR foi associado ao aumento da expressão gênica e vice-versa (CHI et al., 2019). A fosforilação do PGR pela Ser294 ocorre rapidamente em resposta à ligação a progesterona (SHEN; HORWITZ; LANGE, 2001) por via independente de MAPK (QIU; LANGE, 2003). A via de sinalização genômica clássica ocorre pela ligação do receptor hormonal ativado pelo seu ligante nos HREs em regiões promotoras de genes alvos. E a via de sinalização genômica não-clássica de receptores hormonais ocorre independente da associação ao DNA aos HREs, vinculando-se a fatores de transcrição ligados à TFBS (MITTELMAN-SMITH et al., 2017).

Os dados de aumento de AP-1 e FOXO3 no cultivo de células luteínicas com adição de P4 (500 ng/mL) e silenciadas com siRNA, sugerem que o PGR possa se ligar a PRE e ser coativo por AP-1 e FOXO3, de forma clássica ou pela via não-clássica através da ligação a esses elementos reguladores (CICATIELLO et al., 2004; LAM; SHAH; BROSENS, 2012). Além disso, atividade transcricional da AP-1 em um TRE pode ocorrer na presença de PGR e P4 (DAI et al., 2003). O c-Jun e PGR estão associados ao controle hormonal da proliferação (DÍAZ FLAQUÉ et al., 2013) e o FOXO3 no controle da proliferação celular, pois o aumento de FOXO3 no dia 40 p.o pode indicar uma redução da proliferação no CL (HABASHY et al., 2011). O aumento de HOXA5 no dia 40 p.o, sugere que ocorra uma regulação negativa na expressão do PGR e por sua vez o silenciamento com siRNA também diminui a expressão do HOXA5, visando a contra-regulação da proliferação diante de uma atípica diminuição do PGR. Este dado indica que o HOXA5 possa atuar na via de sinalização não clássica, se ligando a região promotora do gene PGR e de outros genes alvos regulando a transcrição gênica. O HOXA5 teve correlação positiva com a P4 e a HSD3B2, indicando o controle por P4 durante o diestro canino.

Alternativamente, acreditamos que a expressão do PGR no corpo lúteo canino ocorra de forma clássica e não clássica, dado a interação com os fatores de transcrição, AP-1 (LIEBERT et al., 2003), FOXO3 (VASQUEZ et al., 2018) e HOXA5 (RAMAN et al., 2000),

figura 8. Por essa razão, consideramos que no corpo lúteo canino os efeitos da ativação do receptor de progesterona são mediados através de fatores de transcrição.

Figura 8. Esquema representativo do processo de ativação do PGR pela ligação da P4 e recrutamento dos fatores de transcrição AP-1, FOXO3 e HOXA5 para a expressão de genes envolvidos nos processos de proliferação e regressão do corpo lúteo canino. A síntese hormonal controla os mecanismos de expressão gênica durante o diestro: o aumento da P4 e do PGR indicam o processo de luteinização e a redução a luteólise.



6 CONCLUSÕES

Os PGRs podem interagir com outros fatores de transcrição para modular a atividade transcricional. A expressão de fatores de transcrição no corpo lúteo canino mostra o envolvimento desses fatores na regulação gênica relacionada a ativação do PGR. O AP-1 responde ao PGR pelo aumento de P4 e uma diminuição atípica de PGR pode aumentar AP-1 para regular positivamente a proliferação. O aumento de FOXO3 pela P4 e PGR indica papel na manutenção do corpo lúteo canino, dado que o aumento de FOXO3 no dia 40 p.o sugere o estímulo da expressão de genes pró-apoptóticos. O aumento de HOXA5 sugere uma regulação negativa na expressão do PGR e a diminuição de HOXA5 indica proliferação.

REFERÊNCIAS

- ACCILI, D.; ARDEN, K. C. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. **Cell**, v. 117, n. 4, p. 421–426, 2004.
- ALBANESE, C. et al. Transforming p21(ras) mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 40, p. 23589–23597, 1995.
- ALKHALAF, M.; MURPHY, L. C. Regulation of c-jun and jun-B by progestins in T-47D human breast cancer cells. **Molecular Endocrinology**, v. 6, n. 10, p. 1625–1633, 1992.
- 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 Research**, v. 64, n. 15, p. 5245–5250, 2004.
- ANGEL, P.; KARIN, M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. **Biochim Biophys Acta**, v.1072, p. 129-157, 1991.
- ANGERS, S.; MOON, R. T. Proximal events in Wnt signal transduction. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 7, p. 468–477, 2009.
- ARDEN, K. C.; BIGGS, W. H. Regulation of the FoxO family of transcription factors by phosphatidylinositol-3 kinase-activated signaling. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 403, n. 2, p. 292–298, 2002.
- ASHLEY, R. L.; ARREGUIN-AREVALO, J. A.; NETT, T. M. Binding characteristics of the ovine membrane progesterone receptor alpha and expression of the receptor during the estrous cycle. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 7, p. 1–9, 2009.
- BAH, M. M. et al. Role of intraluteal prostaglandin F2 α , progesterone and oxytocin in basal and pulsatile progesterone release from developing bovine corpus luteum. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 79, n. 3–4, p. 218–229, 2006.
- BAMBERGER, A. M. et al. Modulation of AP-1 activity by the human progesterone receptor in endometrial adenocarcinoma cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 12, p. 6169–6174, 1996.
- BAO, B. et al. Expression of Messenger Ribonucleic Acid (mRNA) Encoding 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase $\Delta^4\Delta^5$ Isomerase (3 β -HSD) during Recruitment and Selection of Bovine Ovarian Follicles: Identification of Dominant Follicles by Expression of 3 β -HSD mRNA within the Granulosa Cell Layer . **Biology of Reproduction**, v. 56, n. 6, p. 1466–1473, 1997.
- BOONYARATANAKORNKIT, V. et al. Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases. **Molecular Cell**, v. 8, n. 2, p. 269–280, 2001.

- BROSENS, J. J.; GELLERSEN, B. Death or survival - Progesterone-dependent cell fate decisions in the human endometrial stroma. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 36, n. 3, p. 389–398, 2006.
- BRUNET, A. et al. Stress-Dependent Regulation of FOXO Transcription Factors by the SIRT1 Deacetylase. **Science**, v. 303, n. 5666, p. 2011–2015, 2004.
- BURGERING, B. M. T. The Forkhead Transcription Factor FoxO Regulates Transcription of p27. **The Journal of Immunology**, v. 3, n. 23, 2002.
- BURGERING, B. M. T. A brief introduction to FOXology. **Oncogene**, v. 27, n. 16, p. 2258–2262, 2008.
- CABRERA-MUÑOZ E, RNÁNDEZ-HERNÁNDEZ OT, C.-A. Ih. Role of Progesterone in Human Astrocytomas Growth. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 13, p. 1663–1667, 2011.
- CAI, Z.; STOCCO, C. Expression and regulation of progestin membrane receptors in the rat corpus luteum. **Endocrinology**, v. 146, n. 12, p. 5522–5532, 2005.
- CALNAN, D. R.; BRUNET, A. The FoxO code. **Oncogene**, v. 27, n. 16, p. 2276–2288, 2008.
- CARDOSO, A. P. M. M. **Mecanismo de ação do 17 β -estradiol no corpo lúteo de cadelas não prenhes**. 2016. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
- CARSON-JURICA, M. A.; SCHRADER, W. T.; O'MALLEY, B. W. Steroid receptor family: Structure and functions. **Endocrine Reviews**, v. 11, n. 2, p. 201–220, 1990.
- CEBALLOS-CHÁVEZ, M. et al. The Chromatin Remodeler CHD8 Is Required for Activation of Progesterone Receptor-Dependent Enhancers. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 4, p. 1–25, 2015.
- CHENG, C. et al. Inferring activity changes of transcription factors by binding association with sorted expression profiles. **BMC Bioinformatics**, v. 8, p. 1–12, 2007.
- CHENG, L. et al. Overexpression of progesterone receptor B increases sensitivity of human colon muscle cells to progesterone. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 295, n. 3, p. 493–502, 2008.
- CHIACCHIERA A, F.; SIMONE, C. The AMPK-FoxO3A axis as a target for cancer treatment. **Cell Cycle**, v. 9, n. 6, p. 1091–1096, 2010.
- CICATIELLO, L. et al. Estrogens and Progesterone Promote Persistent CCND1 Gene Activation during G1 by Inducing Transcriptional Derepression via c-Jun/c-Fos/Estrogen Receptor (Progesterone Receptor) Complex Assembly to a Distal Regulatory Element and Recruitment of Cyclin D1 to Its Own Gene Promoter. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 16, p. 7260–7274, 2004.
- CLARKE, C. L.; GRAHAM, J. D. Non-overlapping progesterone receptor cistromes contribute to cell-specific transcriptional outcomes. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, 2012.

CONCANNON, P. W. et al. Suppression of luteal function in dogs by luteinizing hormone antiserum and by bromocriptine. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 81, n. 1, p. 175–180, 1987.

CONCANNON, P. W. Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, 1993.

CONCANNON, P. W. et al. Endocrine control of ovarian function in dogs and other carnivores. **Animal Reproduction**, v. 6, n. 1, p. 172–193, 2009.

CONCANNON, P. W.; MCCANN, J. P.; TEMPLE, M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. **J Reprod Fertil Suppl**, 1989.

CONDON, J. C. et al. Up-regulation of the progesterone receptor (PR)-C isoform in laboring myometrium by activation of nuclear factor- κ B may contribute to the onset of labor through inhibition of PR function. **Molecular Endocrinology**, v. 20, n. 4, p. 764–775, 2006.

CONLON, E. M. et al. Integrating regulatory motif discovery and genome-wide expression analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 6, p. 3339–3344, 2003.

CONNELLY, O. M. et al. Reproductive Functions of the Progesterone Receptor. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 7, n. 1, p. S25–S32, 2000.

CROOKS, G. M. et al. Constitutive HOXA5 expression inhibits erythropoiesis and increases myelopoiesis from human hematopoietic progenitors. **Blood**, v. 94, n. 2, p. 519–528, 1999.

CUEVAS, I. et al. Sustained endothelial expression of HoxA5 in vivo impairs pathological angiogenesis and tumor progression. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–18, 2015.

CUI, C. et al. FOXO3 Is Expressed in Ovarian Tissues and Acts as an Apoptosis Initiator in Granulosa Cells of Chickens. **BioMed Research International**, v. 2019, p. 1–9, 2019.

DAI, D. et al. Progesterone regulation of activating protein-1 transcriptional activity: A possible mechanism of progesterone inhibition of endometrial cancer cell growth. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 87, n. 2–3, p. 123–131, 2003.

DÍAZ FLAQUÉ, M. C. et al. Progesterone receptor assembly of a transcriptional complex along with activator protein 1, signal transducer and activator of transcription 3 and ErbB-2 governs breast cancer growth and predicts response to endocrine therapy. **Breast Cancer Research**, v. 15, n. 6, p. R118, 2013.

DIEP, C. H.; AHRENDT, H.; LANGE, C. A. Progesterone induces progesterone receptor gene (PGR) expression via rapid activation of protein kinase pathways required for cooperative estrogen receptor alpha (ER) and progesterone receptor (PR) genomic action at ER/PR target genes. **Steroids**, v. 114, p. 48–58, 2016.

DINH, D. T. et al. Tissue-specific progesterone receptor-chromatin binding and the regulation of progesterone-dependent gene expression. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2019.

- DOYLE, K. M. H. et al. Coordinate transcription of the ADAMTS-1 gene by luteinizing hormone and progesterone receptor. **Molecular Endocrinology**, v. 18, n. 10, p. 2463–2478, 2004.
- DUARTE, A. et al. Progesterone upregulates GATA-1 on erythroid progenitors cells in liquid culture. **Blood Cells Mol Dis**, v. 29, n. 2, p. 213–224, 2002.
- DUEÑAS JIMÉNEZ, J. M. et al. Aromatase and estrogen receptor alpha mRNA expression as prognostic biomarkers in patients with astrocytomas. **Journal of neuro-oncology**, v. 119, n. 2, p. 275–284, 2014.
- EVANS, R. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. **Science**, v. 240, n. 4854, p. 889–895, 1988.
- FABRIS, L. et al. P27^{kip1} controls H-Ras/MAPK activation and cell cycle entry via modulation of MT stability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 45, p. 13916–13921, 2015.
- FAIVRE, E. J. et al. Progesterone receptor rapid signaling mediates serine 345 phosphorylation and tethering to specificity protein 1 transcription factors. **Molecular Endocrinology**, v. 22, n. 4, p. 823–837, 2008.
- FANG, X.; WONG, S.; MITCHELL, B. F. Messenger RNA for progesterone receptor isoforms in the late-gestation rat uterus. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 283, n. 6 46-6, p. 1167–1172, 2002.
- FERNANDES, P. A. et al. Luteal Function in the Bitch: Changes during Diestrus in Pituitary Concentration of and the Number of Luteal Receptors for Luteinizing Hormone and Prolactin1. **Biology of Reproduction**, v. 37, n. 4, p. 804–811, 1987.
- FERRARA N, CHEN H, DAVIS-SMYTH T, GERBER HP, NGUYEN TN, PEERS D, CHISHOLM V, HILLAN KJ, S. R. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. **Nature medicine**, v. 4, n. 3, p. 336–340, 1998.
- FERREIRA-DIAS, G. et al. Microvascularization and angiogenic activity of equine corpora lutea throughout the estrous cycle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 30, n. 4, p. 247–259, 2006.
- FIELDS, M. J.; FIELDS, P. a. Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. **Theriogenology**, n. 96, p. 1295–1325, 1996.
- FRASER, H. M.; LUNN, S. F. Angiogenesis and its control in the female reproductive system. **British Medical Bulletin**, v. 56, n. 3, p. 787–797, 2000.
- GAO, J.; MAZELLA, J.; TSENG, L. Hox proteins activate the IGFBP-1 promoter and suppress the function of hPR in human endometrial cells. **DNA and Cell Biology**, v. 21, n. 11, p. 819–825, 2002.
- GEHRING, W. J.; HIROMI, Y. Homeotic genes and the homeobox. **Ann. Rev. Genet.**, v.20, p.147-173, 1986.

GENDRONNEAU, G. et al. The loss of *Hoxa5* function causes estrous acyclicity and ovarian epithelial inclusion cysts. **Endocrinology**, v. 153, n. 3, p. 1484–1497, 2012.

GERMAIN, P. et al. Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors. **PHARMACOLOGICAL REVIEWS**, v. 58, p. 685–704, 2006.

GERTZ, J. et al. Genistein and bisphenol A exposure cause estrogen receptor 1 to bind thousands of sites in a cell type-specific manner. **Genome Research**, v. 22, n. 11, p. 2153–2162, 2012.

GIULIANELLI, S. et al. Estrogen receptor alpha mediates progestin-induced mammary tumor growth by interacting with progesterone receptors at the cyclin D1/MYC promoters. **Cancer Research**, v. 72, n. 9, p. 2416–2427, 2012.

GOLDHAR, A. S. et al. Progesterone induces expression of the prolactin receptor gene through cooperative action of Sp1 and C/EBP. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 335, n. 2, p. 148–157, 2011.

GRACANIN, A. et al. Canid progesterone receptors lack activation function 3 domain-dependent activity. **Endocrinology**, v. 153, n. 12, p. 6104–6113, 2012.

HABASHY, H. O. et al. FOXO3a nuclear localisation is associated with good prognosis in luminal-like breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 129, n. 1, p. 11–21, 2011.

HAUET, T. et al. Peripheral-type benzodiazepine receptor-mediated action of steroidogenic acute regulatory protein on cholesterol entry into Leydig cell mitochondria. **Molecular Endocrinology**, v. 19, n. 2, p. 540–554, 2005.

HERR, D.; BEKES, I.; WULFF, C. Regulation of Endothelial Permeability in the Corpus Luteum : A Review of the Literature. **GebFra**, v. 73, p. 1107–1111, 2013.

HOFFMANN, B. et al. Regulation of corpus luteum-function in the bitch. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, n. 4, p. 232–240, 2004.

HOFFMANN, B.; RIESENBECK, A.; KLEIN, R. Reproductive endocrinology of bitches. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1–4, p. 275–288, 1996.

HU, M. C. T. et al. I κ B kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. **Cell**, v. 117, n. 2, p. 225–237, 2004.

HU, Z. Z. et al. Transcriptional regulation of the generic promoter III of the rat prolactin receptor gene by C/EBP β and Sp1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 40, p. 26225–26235, 1998.

HYDBRING PER, MALUMBRES MARCOS, S. P. Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclindependent kinases Per Hydbring1,2, Marcos Malumb. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 17, n. 5, p. 280–292, 2016.

IRUELA-ARISPE, M. L. et al. Thrombospondin-1, an inhibitor of angiogenesis, is regulated by progesterone in the human endometrium. **Journal of Clinical Investigation**, v. 97, n. 2, p. 403–412, 1996.

JACOBSEN, B. M.; HORWITZ, K. B. Progesterone Receptors, their Isoforms and Progesterone Regulated Transcription. **Mol Cell Endocrinol**, v. 357, p. 18–29, 2013.

JEANNOTTE, L.; GOTTI, F.; LANDRY-TRUCHON, K. Hoxa5: A key player in development and disease. **Journal of Developmental Biology**, v. 4, n. 2, 2016.

JÜNGER, M. A. et al. The Drosophila Forkhead transcription factor FOXO mediates the reduction in cell number associated with reduced insulin signaling. **Journal of Biology**, v. 2, n. 3, 2003.

KARIN, M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 28, p. 16483-16486, 1995.

KARIN, M.; LIU, Zg; ZANDI, E. AP-1 function and regulation. **Current opinion in cell biology**, v. 9, n.2, p. 240-246, 1997.

KEIGHTLEY, M. C. Steroid receptor isoforms: exception or rule? **Mol.Cell.Endocrinol.**, v. 137, p. 1–5, 1998.

KIM, J. J.; KURITA, T.; BULUN, S. E. Progesterone action in endometrial cancer, endometriosis, uterine fibroids, and breast cancer. **Endocrine Reviews**, v. 34, n. 1, p. 130–162, 2013.

KLEIN-HITPASS, L. et al. The progesterone receptor stimulates cell-free transcription by enhancing the formation of a stable preinitiation complex. **Cell**, v. 60, n. 2, p. 247–257, 1990.

KOMIYA, Y.; HABAS, R. Wnt Secretion and Extra-Cellular Regulators. v. 4, n. 2, p. 68–75, 2008.

KOWALEWSKI, M. P. et al. Expression of cyclooxygenase 1 and 2 in the canine corpus luteum during diestrus. **Theriogenology**, v. 66, n. 6–7, p. 1423–1430, 2006a.

KOWALEWSKI, M. P. et al. Characterization of the canine 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and its expression in the corpus luteum during diestrus. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 101, n. 4–5, p. 254–262, 2006b.

KOWALEWSKI, M. P. et al. Canine placenta: A source of prepartal prostaglandins during normal and antiprogesterin-induced parturition. **Reproduction**, v. 139, n. 3, p. 655–664, 2010.

KOWALEWSKI, M. P. et al. Luteal and placental function in the bitch: spatio-temporal changes in prolactin receptor (PRLr) expression at dioestrus, pregnancy and normal and induced parturition. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 9, n. 1, p. 109, 2011.

KOWALEWSKI, M. P. et al. Prostaglandin E2 functions as a luteotrophic factor in the dog. **Reproduction**, v. 145, n. 3, p. 213–226, 2013.

KOWALEWSKI, M. P.; HOFFMANN, B. Molecular cloning and expression of StAR protein in the canine corpus luteum during dioestrus. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**, v. 116, n. 3, p. 158–161, 2008.

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. **Animal Reproduction Science**, v. 109, n. 1–4, p. 319–329, 2008.

KROEMER G, MARIÑO G, LEVINE. B. Autophagy and the integrated stress response. **Mol Cell**, v. 40, n. 2, p. 280–293, 2010.

KUMAR, R.; THOMPSON, E. B. The structure of the nuclear hormone receptors. **Steroids**, v. 64, n. 5, p. 310–319, 1999.

LABIED, S. et al. Progesterins regulate the expression and activity of the Forkhead transcription factor FOXO1 in differentiating human endometrium. **Molecular Endocrinology**, v. 20, n. 1, p. 35–44, 2006.

LAM, E. W. F.; SHAH, K.; BROSENS, J. J. The diversity of sex steroid action: The role of micro-RNAs and FOXO transcription factors in cycling endometrium and cancer. **Journal of Endocrinology**, v. 212, n. 1, p. 13–25, 2012.

LAMBERT, S. A. et al. The Human Transcription Factors. **Cell**, v. 172, n. 4, p. 650–665, 2018.

LANTINGA-VAN LEEUWEN, I. S. et al. Cloning and cellular localization of the canine progesterone receptor: Co-localization with growth hormone in the mammary gland. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 75, n. 4–5, p. 219–228, 2000.

LAVOIE, H. A.; SINGH, D.; HUI, Y. Y. Concerted regulation of the porcine steroidogenic acute regulatory protein gene promoter activity by follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor I in granulosa cells involves GATA-4 and CCAAT/Enhancer binding protein β . **Endocrinology**, v. 145, n. 7, p. 3122–3134, 2004.

LEE, D. LS-GKM: A new gkm-SVM for large-scale datasets. **Bioinformatics**, v. 32, n. 14, p. 2196–2198, 2016.

LEE, T. I.; YOUNG, R. A. Transcriptional regulation and its misregulation in disease. **Cell**, v. 152, n. 6, p. 1237–1251, 2013.

LEONHARDT, S. A.; EDWARDS, D. P. Mechanism of action of progesterone antagonists. **Experimental biology and medicine**, v. 227, n. 11, p. 969–80, 2002.

LEVINE, M.; HOEY, T. Homeobox proteins as sequence-specific transcription factors. **Cell**, v. 55, n. 4, p. 537–540, 1988.

LI, P. et al. AKT-Independent Protection of Prostate Cancer Cells from Apoptosis Mediated through Complex Formation between the Androgen Receptor and FKHR. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 1, p. 104–118, 2003.

- LIANG, J. et al. Progesterone regulates mouse dendritic cells differentiation and maturation. **International Immunopharmacology**, v. 6, n. 5, p. 830–838, 2006.
- LIN, C. J.; BARBOSA, A. S. Técnicas de Análise da Regulação da Transcrição Gênica e suas Aplicações na Endocrinologia Molecular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 330–340, 2002.
- LIU, L. et al. High expression of Ras-related protein 1A promotes an aggressive phenotype in colorectal cancer via PTEN/FOXO3/CCND1 pathway. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 37, n. 1, p. 1–15, 2018.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
- LUO, X. et al. Foxo and Fos regulate the decision between cell death and survival in response to UV irradiation. **EMBO Journal**, v. 26, n. 2, p. 380–390, 2007.
- LÜTZNER, N. et al. FOXO3 is a glucocorticoid receptor target and regulates LKB1 and its own expression based on cellular AMP levels via a positive autoregulatory loop. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 2012.
- MANGELSDORF, D. J. et al. The nuclear receptor superfamily: The second decade. **Cell**, v. 83, n. 6, p. 835–839, 1995.
- MANNA, P. R.; STOCCO, D. M. Crosstalk of CREB and Fos/Jun on a single cis-element: Transcriptional repression of the steroidogenic acute regulatory protein gene. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 39, n. 3–4, p. 261–277, 2007.
- MARIANI, T. C. et al. 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.
- MASTON, G. A.; EVANS, S. K.; GREEN, M. R. Transcriptional Regulatory Elements in the Human Genome. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 7, n. 1, p. 29–59, 2006.
- MAZUR, E. C. et al. Progesterone receptor transcriptome and cistrome in decidualized human endometrial stromal cells. **Endocrinology**, v. 156, n. 6, p. 2239–2253, 2015.
- MCDONNELL, D. P. et al. Analysis of estrogen receptor function in vitro reveals three distinct classes of antiestrogens. **Molecular Endocrinology**, v. 9, n. November, p. 659–669, 1995.
- MCDONNELL, D. P.; CLEMM, D. L.; IMHOF, M. O. Definition of the cellular mechanisms which distinguish between hormone and antihormone activated steroid receptors. **Seminars in cancer biology**, 1994.
- MCGINNIS, W.; KRUMLAUF, R. Homeobox genes and axial patterning. **Cell**, v. 68, n. 2, p. 283–302, 1992.

MCKENNA, N. J. M. C.; LANZ, R. B.; MALLEY, B. W. O. Nuclear Receptor Coregulators : Cellular and Molecular Biology. **Endocrine reviews**, v. 20, n. May, p. 321–344, 1999.

MEYER, M. E. et al. A limiting factor mediates the differential activation of promoters by the human progesterone receptor isoforms. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 15, p. 10882–7, 1992.

MIGLIACCIO, A. et al. Activation of the Src/p21(ras)/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. **EMBO Journal**, v. 17, n. 7, p. 2008–2018, 1998.

MILLER, W. L.; AUCHUS, R. J. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. **Endocrine Reviews**, v. 32, n. 1, p. 81–151, 2011.

MIRANDA-FURTADO, C. L. et al. Differential expression of genes in follicular cells of swines. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 5, p. 1023–1028, 2010.

MITTELMAN-SMITH, M. A. et al. Rodent models of non-classical progesterone action regulating ovulation. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, n. JUL, 2017.

MOHAMMED, H. et al. Progesterone receptor modulates estrogen receptor- α action in breast cancer Hisham. **Nature**, v. 16, p. 523, 2015.

MORGAN, J. Stimulus-Transcription Coupling In The Nervous System: Involvement Of The Inducible Proto-oncogenes fos And jun. **Annual Review of Neuroscience**, 1991.

MORGAN, J. I.; CURRAN, T. Immediate-early genes: ten years on. **Trends in Neurosciences**, v.18, p. 66-67,1995.

NAKASHIMA, K.; YAKABE, Y. AMPK activation stimulates myofibrillar protein degradation and expression of atrophy-related ubiquitin ligases by increasing FOXO transcription factors in C2C12 myotubes. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, n. 7, p. 1650–1656, 2007.

NARITA, Y. et al. Mutant epidermal growth factor receptor signaling down-regulates p27 through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in glioblastomas. **Cancer Research**, v. 62, n. 22, p. 6764–6769, 2002.

NISHITANI, J. et al. Recruitment of the retinoblastoma protein to c-Jun enhances transcription activity mediated through the AP-1 binding site. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 9, p. 5454–5461, 1999.

NISWENDER, G. D. Molecular control of luteal secretion of progesterone. **Reproduction**, v. 123, n. 3, p. 333–339, 2002.

NOHR, B.; HOFFMANN, B.; STEINETZ, B. E. Investigation of the endocrine control of parturition in the dog by application of an antigestagen. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, 1993.

O'SHEA. Heterogeneous cell types in the corpus luteum of sheep, goats and cattle. **J Reprod Fertil Suppl**, v.34, p.71-75, 1987.

OKKENS, A. C. et al. Evidence for prolactin as the main luteotrophic factor in the cyclic dog. **Veterinary Quarterly**, v. 12, n. 4, p. 193–201, 1990.

OLSON, D. H. Circumplex Model VII: Validation Studies and FACES III. **Family Process**, v. 25, n. 3, p. 337–351, 1986.

ONCLIN ET AL. Luteotrophic action of prolactin in dogs and the effects of a dopamine agonist, cabergoline. **J Reprod Fertil Suppl.**, v. 43, n. 404–409, 1993.

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. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 118, n. 2, p. 417–424, 2000.

OTTANDER, U. et al. A Putative Stimulatory Role of Progesterone Acting via Progesterone Receptors in the Steroidogenic Cells of the Human Corpus Luteum1. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 3, p. 655–663, 2000.

OWEN, G. I. et al. Progesterone regulates transcription of the p21(WAF1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene through Sp1 and CBP/p300. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 17, p. 10696–10701, 1998.

PAI, P.; WANG, G.; SUKUMAR, S. The role of HOXA5 in the malignant progression of engineered isogenic MCF10A sublines harboring common breast cancer mutations. **American Association for Cancer Research**, v. 78, p. 4467, 2018.

PAPA, P. et al. Glucose transporter 1 expression accompanies hypoxia sensing in the cyclic canine corpus luteum. **Reproduction**, v. 147, n. 1, p. 81–89, 2014.

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.

PAPANICOLAOU, K. N.; YASUHIRO, I.; WALSH, K. Forkhead Transcription Factors and Cardiovascular Biology. **Circ Res**. v. 102, n. 1, p. 16–31, 2008.

PELUSO, J. J.; PAPPALARDO, A. Progesterone maintains large rat granulosa cell viability indirectly by stimulating small granulosa cells to synthesize basic fibroblast growth factor. **Biol Reprod**, v. 60, n. 2, p. 290–296, 1999.

PENG, X. et al. HOXA5 is a tumor suppressor gene that is decreased in gastric cancer. **Oncology Reports**, v. 40, n. 3, p. 1317–1329, 2018.

PETZ, L. N. et al. Estrogen receptor α and activating protein-1 mediate estrogen responsiveness of the progesterone receptor gene in MCF-7 breast cancer cells. **Endocrinology**, v. 143, n. 12, p. 4583–4591, 2002.

PFAFFL MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, 2001.

PHEMISTER, R. D. et al. Time of ovulation in the beagle bitch. **Biology of Reproduction**, v. 8, n. 1, p. 74–82, 1973.

- POTENTE, M. et al. Involvement of Foxo transcription factors in angiogenesis and postnatal neovascularization. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 9, p. 2382–2392, 2005.
- QIU, M.; LANGE, C. A. MAP kinases couple multiple functions of human progesterone receptors: Degradation, transcriptional synergy, and nuclear association. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 85, n. 2–5, p. 147–157, 2003.
- RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, n. 1, p. 62–66, 2003.
- RAMAN, V. et al. HOXA5 regulates expression of the progesterone receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 34, p. 26551–26555, 2000.
- RAMASWAMY, S. et al. A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. **Cancer Cell**, v. 2, n. 1, p. 81–91, 2002.
- REICHARDT, H. M. et al. DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. **Cell**, v. 93, n. 4, p. 531–541, 1998.
- RENNERT, H. et al. Generation of regulatory oxysterols: 26-hydroxylation of cholesterol by ovarian mitochondria. **Endocrinology**, v. 127, n. 2, p. 738–746, 1990.
- RHOADS, K. et al. A role for Hox A5 in regulating angiogenesis and vascular patterning. **Lymphatic research and biology**, v. 3, n. 4, p. 240–52, 2005.
- RIBEIRO, R. C. . et al. X-ray crystallographic and functional studies of thyroid hormone receptor. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 65, n. 1, p. 133–141, 1998.
- RICHARDS, J. S. et al. Expression of FKHR, FKHRL1, and AFX genes in the rodent ovary: Evidence for regulation by IGF-I, estrogen, and the gonadotropins. **Molecular Endocrinology**, v. 16, n. 3, p. 580–599, 2002.
- RICHER, J. K. et al. Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 7, p. 5209–5218, 2002.
- RIDER, V.; KIMLER, B. F.; JUSTICE, W. M. Progesterone-Growth Factor Interactions in Uterine Stromal Cells. v. 59, p. 464–469, 1998.
- RUDD, M. D. et al. Constitutively active FOXO1a and a DNA-binding domain mutant exhibit distinct co-regulatory functions to enhance progesterone receptor A activity. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 38, n. 5–6, p. 673–690, 2007.
- RUSOVICI, R.; LAVOIE, H. a. Expression and distribution of AP-1 transcription factors in the porcine ovary. **Biology of reproduction**, v. 69, n. 1, p. 64–74, 2003.
- SANER, K. J. et al. Cloning and expression of a novel, truncated, progesterone receptor. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 200, n. 1–2, p. 155–163, 2003.

SANTO, E. E. et al. FOXO3a is a major target of inactivation by PI3K/AKT signaling in aggressive neuroblastoma. **Cancer Research**, v. 73, n. 7, p. 2189–2198, 2013.

SARTORIUS, C. A. et al. A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. **Molecular Endocrinology**, v. 8, n. 10, p. 1347–1360, 1994.

SATO, J.; NASU, M.; TSUCHITANI, M. Comparative histopathology of the estrous or menstrual cycle in laboratory animals. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 29, n. 3, p. 155–162, 2016.

SCHAMS, D. et al. Expression and localisation of oestrogen and progesterone receptors in the bovine mammary gland during development, function and involution. **Journal of Endocrinology**, v. 177, n. 2, p. 305–317, 2003.

SCHUUR, E. R. et al. Ligand-dependent Interaction of Estrogen Receptor- α with Members of the Forkhead Transcription Factor Family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 36, p. 33554–33560, 2001.

SCHWARZENBACH, H. et al. Stimulatory Effect of Progesterone on the Expression of Steroidogenic Acute Regulatory Protein in MA-10 Leydig Cells1. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 3, p. 1054–1063, 2003.

SHAO, W.; BROWN, M. Advances in estrogen receptor biology: Prospects for improvements in targeted breast cancer therapy. **Breast Cancer Research**, v. 6, n. 1, p. 39–52, 2004.

SHARMA, S. C.; RICHARDS, J. A. S. Regulation of AP1 (Jun/Fos) factor expression and activation in ovarian granulosa cells. Relation of JunD and Fra2 to terminal differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 43, p. 33718–33728, 2000.

SHAULIAN, E.; KARIN, M. AP-1 in cell proliferation and survival. **Oncogene**, v. 20, n. 19, p. 2390–2400, 2001.

SHEN, T.; HORWITZ, K. B.; LANGE, C. A. Transcriptional Hyperactivity of Human Progesterone Receptors Is Coupled to Their Ligand-Dependent Down-Regulation by Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Phosphorylation of Serine 294. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 18, p. 6122–6131, 2001.

SHIRASUNA, K. et al. Emerging roles of immune cells in luteal angiogenesis. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, n. 2, p. 351–361, 2013.

SIEGEL, L. Paired Comparison Evaluations of Managerial Effectiveness By Peers and Supervisors. **Personnel Psychology**, v. 35, n. 4, p. 843–852, 1982.

SILVA, J. C. et al. Marcadores moleculares da via da apoptose celular relacionados com o efeito da terapia fotodinâmica em carcinomas mamários. **XI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba**, p. 1–5, 2011.

SILVA, R dos S. **Papel da insulina sobre a esteroidogênese no corpo lúteo canino**. 2017. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

SOUSA, L. M. M. D. C. et al. Is the canine corpus luteum an insulin-sensitive tissue? **Journal of Endocrinology**, v. 231, n. 3, p. 223–233, 2016.

STAHL, M. et al. The Forkhead Transcription Factor FoxO Regulates Transcription of p27 Kip1 and Bim in Response to IL-2. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 10, p. 5024–5031, 2002.

STOECKLIN, E. et al. Interactions in the transcriptional regulation exerted by Stat5 and by members of the steroid hormone receptor family. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 69, n. 1–6, p. 195–204, 1999.

SVINGEN, T.; TONISSEN, K. F. Hox transcription factors and their elusive mammalian gene targets. **Heredity**, v. 97, n. 2, p. 88–96, 2006.

TAKANO, M. et al. Transcriptional Cross Talk between the Forkhead Transcription Factor Forkhead Box O1A and the Progesterone Receptor Coordinates Cell Cycle Regulation and Differentiation in Human Endometrial Stromal Cells. **Molecular Endocrinology**, v. 21, n. 10, p. 2334–2349, 2007.

TEO, W. W. et al. HOXA5 determines cell fate transition and impedes tumor initiation and progression in breast cancer through regulation of E-cadherin and CD24. **Oncogene**, v. 35, n. 42, p. 5539–5551, 2016.

THOMPSON, M. G. et al. FOXO3, estrogen receptor alpha, and androgen receptor impact tumor growth rate and infiltration of dendritic cell subsets differentially between male and female mice. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 66, n. 5, p. 615–625, 2017.

TJIAN; MANIATIS. Transcriptional Activation : A Complex Puzzle with Few Easy Pieces Minireview. **Cell Press**, v. 77, p. 5–8, 1994.

TSAI, M.; O'MALLEY, B. W. Molecular mechanisms of action of steroid / thyroid receptor superfamily members. **Annual Review of Biochemistry**, v. 63, p. 451–486, 1994.

TSENG, L. et al. Progesterone Receptor (hPR) Upregulates the Fibronectin Promoter Activity in Human Decidual Fibroblasts. **Mary Ann Liebert**, v. 22, n. 10, p. 633–640, 2003.

UNO, M. et al. A Fasting-Responsive Signaling Pathway that Extends Life Span in *C. elegans*. **Cell Reports**, v. 3, n. 1, p. 79–91, 2013.

VAN DER HEIDE, L. P.; HOEKMAN, M. F. M.; SMIDT, M. P. The ins and outs of FoxO shuttling: Mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. **Biochemical Journal**, v. 380, n. 2, p. 297–309, 2004.

VAN DER VOS, K. E.; COFFER, P. J. FOXO-binding partners: It takes two to tango. **Oncogene**, v. 27, n. 16, p. 2289–2299, 2008.

VASQUEZ, Y. M. et al. FOXO1 regulates uterine epithelial integrity and progesterone receptor expression critical for embryo implantation. **PLoS Genetics**, v. 14, n. 11, p. 1–26, 2018.

WANG, X.; HU, S.; LIU, L. Phosphorylation and acetylation modifications of FOXO3a: Independently or synergistically? **Oncology Letters**, v. 13, n. 5, p. 2867–2872, 2017.

WANG, Z.; YU, C.; WANG, H. HOXA5 inhibits the proliferation and induces the apoptosis of cervical cancer cells via regulation of protein kinase B and p27. **Oncology Reports**, v. 41, n. 2, p. 1122–1130, 2019.

WARD, E. C. et al. The regulation and function of the Forkhead transcription factor, Forkhead box O1, is dependent on the progesterone receptor in endometrial carcinoma. **Endocrinology**, v. 149, n. 4, p. 1942–1950, 2008.

WARDELL, S. E. et al. Jun Dimerization Protein 2 Functions as a Progesterone Receptor N-Terminal Domain Coactivator. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 15, p. 5451–5466, 2002.

WÄRNMARK, A. et al. Activation Functions 1 and 2 of Nuclear Receptors: Molecular Strategies for Transcriptional Activation. **Molecular Endocrinology**, v. 17, n. 10, p. 1901–1909, 2003.

WEEMS, Y. S. et al. PGE1 or PGE2 not LH Regulates Secretion of Progesterone in Vitro by the 88-90 Day Ovine Corpus Luteum of Pregnancy. **Prostaglandins**, v. 53, p. 337–353, 1997.

WEI, L. L. et al. An Amino-Terminal Truncated Progesterone Receptor Isoform, PRC, Enhances Progestin-Induced Transcriptional Activity. **Molecular Endocrinology**, v. 10, n. 11, p. 1379–1387, 1996.

WEI, L. L.; NORRIS, B. M.; BAKER, C. J. An N-terminally truncated third progesterone receptor protein, PR(C), forms heterodimers with PR(B) but interferes in PR(B)-DNA binding. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 62, n. 4, p. 287–297, 1997.

WILLERT, K.; JONES, K. A. Wnt signaling: Is the party in the nucleus?. **Genes and Development**, v. 20, n. 11, p. 1394–1404, 2006.

WU, C. I. The genic view of the process of speciation. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 14, n. 6, p. 851–865, 2001.

YANG, D. et al. Enforced expression of Hoxa5 in haematopoietic stem cells leads to aberrant erythropoiesis in vivo. **Cell Cycle**, v. 14, n. 4, p. 612–620, 2015.

YANG, J. Y. et al. ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. **Nature Cell Biology**, v. 10, n. 2, p. 138–148, 2008.

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.

ZAWEL, L.; REINBERG, D. Advances in RNA polymerase II transcription. **Current opinion in cell biology**, v. 4, n. 3, p. 488–95, jun. 1992.

ZEKAS, E.; PROSSNITZ, E. R. Estrogen-mediated inactivation of FOXO3a by the G protein-coupled estrogen receptor GPER. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, p. 1–12, 2015.

ZHAO, H. et al. Lowly-expressed lncRNA GAS5 facilitates progression of ovarian cancer through targeting miR-196-5p and thereby regulating HOXA5. **Gynecologic Oncology**, v. 151, n. 2, p. 345–355, 2018.

ZHAO, H. H. et al. Forkhead Homologue in Rhabdomyosarcoma Functions as a Bifunctional Nuclear Receptor-interacting Protein with Both Coactivator and Corepressor Functions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 30, p. 27907–27912, 2001.

ZOU, Y. et al. Forkhead box transcription factor FOXO3a suppresses estrogen-dependent breast cancer cell proliferation and tumorigenesis. **Breast Cancer Research**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2008.

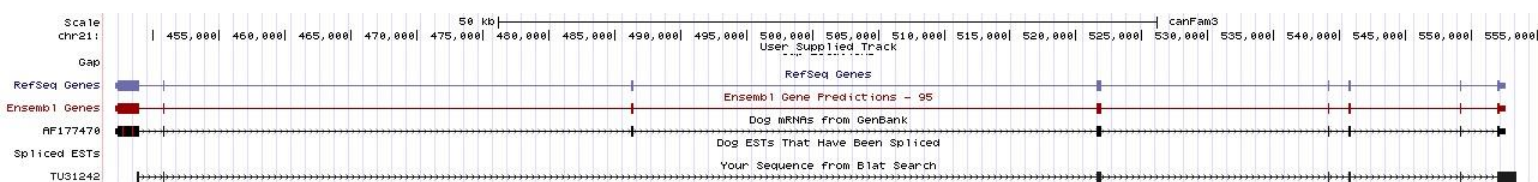
ZUGAIB, R. **Perfil transcricional da infecção crônica pelo vírus da Hepatite C (VHC) por sequenciamento de nova geração**, 2017. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2017.

APÊNDICE A – Identificação de isoforma do receptor de progesterona em corpos lúteos caninos

1. Análise de bioinformática

Os dados em FASTQ do RNA-Seq foram alinhadas no genoma (canFam3) e no transcriptoma (canFam3.1+) de referência canino usando o programa STAR (versão 2.5.0) e os níveis de expressão gênica de isoformas foram determinados com RSEM (versão 1.2.25). Os dados obtidos pelo RSEM foram analisados para verificação do nível de expressão gênica e normalizados em TPM (transcritos por milhão). A isoforma TU31242 (Figura 9) foi detectada a partir do gene de referência do receptor de progesterona canino em 18 amostras de corpos lúteos de cadelas não prenhes.

FIGURA 9. Sequência da isoforma TU31242 do receptor de progesterona



2. Exons da sequência da isoforma TU31242

A sequência da isoforma TU31242 apresentou a ausência do exon 1 (loc.:447,319-448,404) e do exon 4 (loc.:486,298-486,414) do receptor de progesterona canino (Figura 10). A sequência utilizada para análise dos exons da isoforma do receptor de progesterona se encontra no link:

http://www.ensembl.org/Canis_familiaris/Transcript/Exons?db=core;g=ENSCAFG000000003978;r=21:447319-552511;t=ENSCAFT000000006379.

Figura 10. Comparação da sequência da isoforma TU31242 com a sequência correspondente aos exons do receptor de progesterona canino (CanFam3.1/Location: 21:447,319-552,511). A sequência em **negrito** correspondente ao exon 2, em realce cinza 25% está sequência do exon 3, em formato *itálico* a sequência do exon 5, em formato sublinhado está a sequência do exon 6, em **negrito e itálico** está a sequência referente ao exon 7, em formato ~~tachado~~ se encontra a sequência do exon 8 e em realce cinza 50% a sequência do exon 9 é definida.

ggcgggggcgcgggggcgagccccgcg**TCTACCAGCCGCTCGGCCTCGGCGCCCTTCCGCAGCT**
CGGCTACCAGGCGGCCGTGCTCAAGGAGGGCTTGCCGCAGGTGTACCAGCCGTACC
TCAACTACCTGAGGCCTGATTCAGATGCCAGCCAGAGCCACAGTACAGCTTTCGAGTCA
TTACCTCAGAAGATTTGTTTAATCTGTGGGGATGAAGCATCAGGCTGTCATTATGGTGTCC
TAACTTGTGGGAGCTGTAAGGTCTTCTTTAAAAGGGCAATGGAAG*GTTCGAAAATTTAAAA*
GTTCAATAAAGTCAGAGTTATGAGAACATTGGATGCTGTTGCTCTCCACAACCTGTGGGCATTC
CAAATGAAAGCCAAGCTCTAAGCCAAAGAATATCTTTTTACCAAGTCAAGATATACAGTTAATTC
CCCCATTGATTAACCTGCTAATGAGCATTGAACCAGATGTGATCTATGCAGGACATGACAACACC
AAACCTGATACCTCCAGTTCTTTGCTGACGAGTCTTAATCAACTAGGCGAGAGACAACCTTCTTTC
AGTAGTCAAGTGGTCTAAATCATTGCCAGGTTTTTCGAAATTTACACATTGATGACCAAATAA
CTCTCATCCAGTATTCTTGGATGAGCTTAATGGTGTGGACTAGGATGGAGATCTTACAA
ACATGTCAGTGGGCAGATGCTATATTTTGCACCTGATCTAATACTAAATGAACAGAGGAT
GAAGGAATCATCATTCTATTGCTCACCATGTGGCAGATCCCACAGGAGTTTGTA
AGCTTCAAGTTAGCCAGGAAGAGTTCCTGTGTATGAAAGTATTGCTACTTCTTAATACAAT~~T~~
CCTTTGGAAGGACTAAGAAGTCAAAACCAGTTTGAAGAGATGAGATCAAGCTACATTAG
AGAGCTCATCAAAGCAATTGGCTTGAGGCAAAAAGGAGTTGTCTCTAGCTCACAGCGTTT
CTACCAACTCACAAAACCTTCTTGATAACTTGCATGAT~~C~~TTGTCAAACAGCTTCATCTGTAC
TGCTTGAATACATTTATCCAGTCCCGGGCACTGAGTGTGAGTTTCCAGAAATGATGTCTG
AAGTTATTGCCGCACAGTTACCCAAGATCTTGGCAGGGATGGTGAACCTCTGCTCTTTC
ATAAAAAGTGAATGCCATTTTTATCTTTAACAATTAATTTTTGTGGTATGTCTGTTTCTCTT
TTGGTCAGGATTGTGAGGTCTTGGGATTTTACAATTTTCTTCTCAAAGCCTTACATTTATA
ACATATCACATTGTGTTAATTTTCAGAAAAAATGTGAAGTTTTGTTTTCTGTATAATGCAT
AATTAGAATTTAAGGTGTTTCTGTGTGCCATATATTCTTTAACAGTTCACAAGATTA
AAAGTACTAAAATTGTTTGCCAAAGTAACTTAGTCTTTTCCATGCTATTTTCATATCATT
AAGTGAAGATTTTAACTTTTGCATCTAACCAATCTTCTACTCTAGAGGAAAAAATCTT
ATATGTAAAAATAAAAAGTTATTTTATGTTCCCTCCTAGGTAGTTCCCTTTGTCTTCTTGAG
 TTTATTTACAAAATGAGTcttttaaagtgtatgcaaaatttctctacatgagcgtatataaattttgtgaagagaaaattcataacct
 taggttttctaaaggtTTTTAATGAAAAAATAGAAAGAGAGTTTAAAATTTCTGAAATAGACGAA
 GGGTGTGATATTAGGAAAAACAGCTCATATATTGACTGTTGCCCAAATTGGAAATCTCTA
 GGAGAGTTATTAAGGAGAGCCATATTATTATGACAACAGTATTAGGGGTTTTGTAGTTTT
 TTAGTAACCTTTTTGGGGACTTGTCTTTAATAAAAATATTGTGAATCGAAATAGCAGTCCA

GAAGCATCTGTGGCCTAATGCCACACCTTTCCATCTGGCGCAAGTGGAAAATCACTTAAC
 CTTACTGATTTTTTATTTTCCTTACCTTTACCACTGCAAATGTTTCCTTTTGGTCAGAGCTCCT
 TACTCCCTTCTTAATCAAaaaagaaggaaggggaaggatgaaggaaaggatggaggaaggggaagagaaaataagAAA
 TACTATTCTCTTTCTTTACTCAGTGGGAGATAACGACAAATCGAAAGTTTTTGGAGTGCCTC
 TGATCCAATTCTAAGAGAGAAATTTCAAGAAATACTAGATACTGTCTTAAAATAATACAG
 CCAATTACAATAACTAGAAAACACAATTCACACTGTTATATGAACTGAAAATATTACATT
 AGAAAATGGACAAGAGTTCTTTTCTGAGATGAGTCACTGGAGATCCATTTATTTTTTAAA
 GATCTATCTATATATCTGTATATGTAAATATAGATAGATATATATAAAAAATAACAGGAAA
 AACTAAG

3. ORF da isoforma TU31242

A sequência da isoforma TU31242 apresentou uma ORF (Open Reading Frame) de 300 aminoácidos (Figura 11).

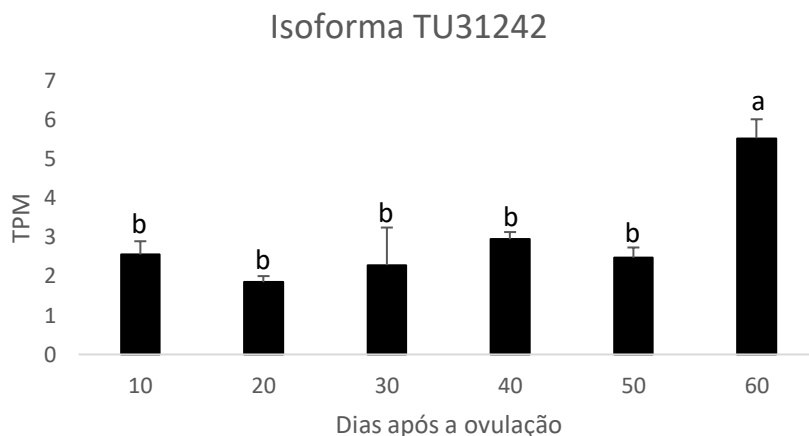
Figura 11. Sequência de aminoácidos da isoforma TU31242

MEGRKFKKFNKVRVMRTLDAVALPQPVGIPNESQALSQRISFSPSQDIQLIPPLINLLM
 SIEPDVIYAGHDNTKPDTSSSLTSLNQLGERQLLSVVKWSKSLPGFRNLHIDDQITLI
 QYSWMSLMVFGLGWRSYKHVSGQMLYFAPDLILNEQRMKESSFYSLCLTMWQIPQE
 FVKLQVSQEEFLCMKVLLLLNTIPLEGLRSQNQFEEMRSSYIRELIKAIGLRQKGVVSS
 SQRFYQLTKLLDNLHDLVKQLHLYCLNTFIQSRALSVEFPSEMMSEVIAAQLPKILAGM
 VKPLLFHKK

4. Expressão da isoforma TU31242

Para a análise da expressão da isoforma nos períodos do diestro (Figura 12) foi utilizado os dados em TPM para o teste de Kruskal Wallis e as médias foram comparadas por meio do teste de Student Newman Keuls, assim como a análise de regressão ($Y = 22,4998 + 0,9773X + 0,9143X^2$ ($R^2=0,3912$)). O programa SAS foi utilizado para as análises e o nível de significância de 5% ($p < 0,05$) foi considerado.

Figura 12. Expressão da isoforma TU31242 no diestro canino



5. Considerações

A sequência da isoforma TU31242 é diferenciada principalmente pela ausência dos exons 1 e 4 do receptor de progesterona canino nos corpos lúteos. As regiões de domínios de transativação, de domínio inibidor, de domínio de sinais de localização nuclear e do domínio de ligação ao ligante, estão representadas nas regiões dos exons 1 e 4. Desta forma podemos considerar a possibilidade de ligação ao DNA (DBD) pela presença dos exons 2 e 3. Não há informações sobre o papel da isoforma TU31242 no corpo lúteo canino, mas pela presença de regiões do domínio de transativação (AF-2), essa isoforma pode influenciar eventos de transcrição, dimerização e interação com cofatores nucleares.

O aumento da expressão da isoforma no dia 60 p.o em relação aos dias anteriores do diestro nos permite identificar a sua responsividade no corpo lúteo canino, uma vez que a expressão de qualquer isoforma ou variante pode atuar em resposta à progesterona em tecidos alvos ou modular indiretamente a atividade do receptor de progesterona, ligando-se competitivamente a proteínas comuns de co-regulação nuclear.

Deste modo, relatamos pela primeira vez a expressão da isoforma TU31242 do receptor de progesterona e uma caracterização detalhada nos permitirá identificar o papel da isoforma nos mecanismos de proliferação e regressão do corpo lúteo canino durante o diestro.

6. Referências

CORK, D. M.; LENNARD, T.W.; TYSON-CAPPER, A.J. Alternative splicing and the progesterone receptor in breast cancer. **Breast Cancer Research**, n.207, v.10, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1186/bcr2097>

DJEBALI, S. et al. Bioinformatics Pipeline for Transcriptome Sequencing Analysis. **Methods Mol. Biol.**, n. 1468, p. 201–219, 2017. DOI: 10.1007/978-1-4939-4035-6_14.

DOBIN, A. et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics**, n.29, v.1, p. 15–21, 2013. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts635

LI, B.; DEWEY, C. N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. **BMC Bioinformatics.**, n. 12, p. 323, 2011. DOI: 10.1186/1471-2105-12-323.

ANEXO

Anexo A- Identificação dos termos de ontologia para os genes PGR, StAR, CYP11A1, HSD3B2, AP-1, FOXO3, HOXA5 (DAVID 6.8)

Genes	Termos funcionais representativos de processo biológico, do componente celular e da função molecular
PGR, StAR, CYP11A1, HSD3B2, AP-1, FOXO3, HOXA5	GO:1901576-organic substance biosynthetic process, GO:0009058-biosynthetic process, GO:0071704-organic substance metabolic process, GO:0008152-metabolic process, GO:0043231-intracellular membrane-bounded organelle, GO:0043229-intracellular organelle, GO:0043227-membrane-bounded organelle, GO:0043226-organelle
PGR, StAR, CYP11A1, HSD3B2, AP-1	GO:1901362-organic cyclic compound biosynthetic process, GO:1901360-organic cyclic compound metabolic process
PGR, StAR, CYP11A1, AP-1, FOXO3, HOXA5	GO:0097159-organic cyclic compound binding
PGR, StAR, AP-1, FOXO3, HOXA5	GO:0009889-regulation of biosynthetic process, GO:0019222-regulation of metabolic process
PGR, StAR	GO:0005496-steroid binding
PGR, CYP11A1, AP-1, FOXO3	GO:0071310-cellular response to organic substance, GO:0070887-cellular response to chemical stimulus, GO:0010033-response to organic substance, GO:0042221-response to chemical
PGR, CYP11A1, AP-1	GO:0032870-cellular response to hormone stimulus, GO:0009725-response to hormone, GO:0071495-cellular response to endogenous stimulus, GO:0009719-response to endogenous stimulus
PGR, AP-1, FOXO3, HOXA5	GO:0010556-regulation of macromolecule biosynthetic process, GO:0000981-RNA polymerase II transcription factor activity, sequence-specific DNA binding, GO:0044212-transcription regulatory region DNA binding, GO:0000975-regulatory region DNA binding, GO:0001067-regulatory region nucleic acid binding, GO:0043565-sequence-specific DNA binding, GO:0001071-nucleic acid binding transcription factor activity, GO:0003700-transcription factor activity, sequence-specific DNA binding, GO:0003677-DNA binding
PGR, AP-1, HOXA5	GO:0000978-RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific DNA binding, GO:0001228-transcriptional activator activity, RNA polymerase II transcription regulatory region sequence-specific binding, GO:0000982-transcription factor activity, RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific

	binding, GO:0000987-core promoter proximal region sequence-specific DNA binding, GO:0001159-core promoter proximal region DNA binding, GO:0000977-RNA polymerase II regulatory region sequence-specific DNA binding, GO:0001012-RNA polymerase II regulatory region DNA binding, GO:0000976-transcription regulatory region sequence-specific DNA binding, GO:1990837-sequence-specific double-stranded DNA binding, GO:0003690-double-stranded DNA binding
PGR, HOXA5	GO:0001077-transcriptional activator activity, RNA polymerase II core promoter proximal region sequence-specific binding
CYP11A1, AP-1, FOXO3, HOXA5	GO:0065008-regulation of biological quality
StAR, CYP11A1, HSD3B2, AP-1	GO:0044710-single-organism metabolic process
StAR, CYP11A1, HSD3B2	GO:0006694-steroid biosynthetic process, GO:0008202-steroid metabolic process, GO:0008610-lipid biosynthetic process, GO:0044711-single-organism biosynthetic process, GO:0006629-lipid metabolic process, GO:0005739-mitochondrion
StAR, CYP11A1	GO:0008211-glucocorticoid metabolic process
AP-1, FOXO3, HOXA5	GO:0030099-myeloid cell differentiation, GO:0045597-positive regulation of cell differentiation, GO:0030097-hemopoiesis, GO:0048534-hematopoietic or lymphoid organ development, GO:0002520-immune system development, GO:0009887-organ morphogenesis, GO:0042981-regulation of apoptotic process, GO:0043067-regulation of programmed cell death, GO:0010941-regulation of cell death, GO:0051240-positive regulation of multicellular organismal process, GO:0042127-regulation of cell proliferation, GO:0006915-apoptotic process, GO:0045595-regulation of cell differentiation, GO:0012501-programmed cell death, GO:0008283-cell proliferation, GO:0008219-cell death
AP-1, FOXO3	GO:0043523-regulation of neuron apoptotic process, GO:0051402-neuron apoptotic process, GO:1901214-regulation of neuron death, GO:0070997-neuron death
AP-1, HOXA5	GO:0050678-regulation of epithelial cell proliferation
FOXO3, HOXA5	GO:0045646-regulation of erythrocyte differentiation, GO:0045639-positive regulation of myeloid cell differentiation, GO:0030218-erythrocyte differentiation, GO:0034101-erythrocyte homeostasis, GO:0002262-myeloid cell homeostasis, GO:0048469-cell maturation, GO:1903708-positive regulation of hemopoiesis, GO:0045637-regulation of myeloid cell differentiation, GO:0021700-developmental maturation, GO:0048872-homeostasis of number of cells