

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Efeitos do 17β -estradiol na abundância de transcritos
para enzimas envolvidas na síntese de $PGF2\alpha$ endometrial
em fêmeas bovinas no final do diestro**

ISABELLA RIO FELTRIN

**Botucatu – SP
2020**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Efeitos do 17β -estradiol na abundância de transcritos
para enzimas envolvidas na síntese de $PGF2\alpha$ endometrial
em fêmeas bovinas no final do diestro**

ISABELLA RIO FELTRIN

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação do Instituto de Biociências de
Botucatu, Universidade Estadual Paulista -
UNESP, para a obtenção do título de Mestre
em Farmacologia e Biotecnologia.**

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Pugliesi

Botucatu – SP

2020

F327e Feltrin, Isabella Rio
Efeitos do 17 -estradiol na abundância de transcritos para enzimas envolvidas na síntese de PGF2 endometrial em fêmeas bovinas no final do diestro / Isabella Rio Feltrin. -- Botucatu, 2020
87 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Botucatu
Orientadora: Claudia Maria Bertan Membrive
Coorientador: Guilherme Pugliesi

1. Medicina Veterinária. 2. Fisiologia da Reprodução. 3. Bovinos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Ins Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Nome da Autora: Isabella Rio Feltrin

Título: Efeitos do 17β -estradiol na abundância de transcritos para enzimas envolvidas na síntese de $PGF2\alpha$ endometrial em fêmeas bovinas no final do diestro

Banca Examinadora

Prof. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive

Presidente e Orientadora

Departamento de Produção Animal - FCAT - UNESP - Campus de Dracena.

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Membro Titular

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária - FMVZ - UNESP - Campus Botucatu.

Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira

Membro titular

Departamento de Produção e Saúde Animal - FMVA - Unesp - Campus Araçatuba.

Data da Defesa: 28/02/2020

Local da Defesa: Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, Botucatu – SP

Comissão de Ética no Uso de Animais

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada "Ação do 17B-estradiol na transcrição e síntese das enzimas PKC e PLA2 envolvidas na síntese de PGF2a endometrial em fêmeas bovinas" (Action of 17B-estradiol on the transcription and synthesis of PKC and PLA2 enzymes involved in the synthesis of endometrial PGF2a in bovine females), registrada com o nº 31/2018.R1 – CEUA, sob a responsabilidade do(a) Prof(a). Dr(a). **Claudia Maria Bertan Membrive** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica** – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da UNESP - Câmpus de Dracena, em reunião de **21/11/2018**.

Dracena, 21 de novembro de 2018.



Profa. Dra. Sirlei Aparecida Maestá
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

*Dedico esta dissertação aos meus pais, Ana e Feltrin,
por todo o apoio e carinho que vocês dedicam à mim e aos meus
sonhos. Vocês são a razão para todas as minhas conquistas!*

Agradecimentos

Ao *Programa de Pós Graduação em Farmacologia e Biotecnologia*, do Instituto de Biociências (IB) da UNESP, Campus de Botucatu/SP, pela oportunidade oferecida de ingressar no mestrado.

À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)*, pelo suporte financeiro ao projeto (Processo FAPESP 2018/24168-1).

À *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)*, pela bolsa de mestrado concedida, condição que possibilitou minha formação e capacitação científica.

Aos *Professores do Programa de Pós Graduação*, pelas disciplinas oferecidas que contribuíram imensamente para o meu conhecimento e crescimento intelectual.

Aos *Membros da banca de qualificação*, Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landin da UNESP – FMVZ, Campus de Botucatu/SP; Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira da UNESP - FMVZ, Campus de Botucatu/SP e Prof. Dr. Anthony Castilho da UNOESTE, Presidente Prudente/SP, pela contribuição científica ao referido trabalho.

À *Profa. Dra. Claudia M. Bertan Membrive*, da UNESP - FCAT, Campus de Dracena/SP, pela orientação e pelo voto de confiança em minha capacidade de executar este projeto. Por todos os ensinamentos e conhecimentos transmitidos ao longo desses anos que contribuíram para minha inserção na vida acadêmica e crescimento pessoal e intelectual. Meu eterno agradecimento e admiração!

Ao *Prof. Dr. Guilherme Pugliesi*, do Departamento de Reprodução Animal e responsável pelo Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga/SP, por aceitar o convite em ser coorientador deste projeto, fornecendo total apoio e disponibilidade para a execução desta pesquisa. Por todo o conhecimento, ensinamentos e contribuição científica; e pela oportunidade em participar das atividades do seu grupo de pesquisa, meu eterno agradecimento.

Ao *Prof. Dr. Ky Pohler*, do Animal Science Department, da Texas A&M University, College Station, Texas, EUA e aos membros de seu laboratório, pela

colaboração em realizar as dosagens de progesterona e PGFM, resultados estes imprescindíveis ao estudo.

Ao **Dr. Thiago Martins**, Pós-doutorando da University of Florida (UF), pela disponibilidade e colaboração em realizar todas as análises estatísticas realizadas neste estudo.

Ao **Prof. Dr. Juliano Silveira**, da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga/SP, pela disponibilização de seu laboratório e auxílio com o protocolo de extração dos fragmentos de biópsia.

À **Profa. Dra. Saara Carolina Scolari**, ex-docente da Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral – FAEF, Garça/SP, pelo carinho e ensinamentos transmitidos que me direcionaram à vida acadêmica. Muito obrigado!

Ao **Alejandro Ojeda**, Doutorando da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga/SP, pelo valioso auxílio na realização das biópsias endometriais.

À **Cecília Constantino Rocha**, Mestranda da da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga/SP, membro do LFEM, por todo o conhecimento e ensinamentos passados para a execução da técnica de PCR.

À **Alessandra Bridi**, doutoranda da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga/SP, por toda sua ajuda, disponibilidade, paciência e cuidado na execução do protocolo de extração de proteínas do tecido endometrial.

Ao **Prof. Dr. José Buratini**, da UNESP - IB, Campus de Botucatu/SP, responsável pelo Laboratório de Fisiologia Molecular Ovariana, do Departamento de Fisiologia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus de Botucatu/SP, por permitir que eu fizesse parte da rotina do seu laboratório, oferecendo conhecimento sobre técnicas laboratoriais e produção *in vitro* de embriões.

As alunas de Pós-Graduação, **Ana Caroline Silva Soares** e **Thaisy Tino Dellaqua**, do Laboratório de Fisiologia Molecular Ovariana da UNESP, Campus

Botucatu/SP, por me receberem tão bem, pelos ensinamentos, amizade e parceria durante esses anos.

Aos meus *amigos de Pós Graduação da UNESP*, Campus Botucatu/SP, Vinícius Rodrigues, Fernanda Fagali Franchi, Priscila Helena Santos e Patrícia Kubo Fontes, por toda a ajuda, esclarecimentos, paciência e apoio.

A minha amiga do coração *Evelyn Fernanda Flores Caron*, por todo o apoio, carinho, amizade, companheirismo e paciência todos esses anos que moramos juntas.

À *Prefeitura do Campus Fernando Costa da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo* (USP – Pirassununga), por disponibilizar os animais utilizados neste estudo.

Ao *Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA)* do Campus Fernando Costa da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP – Pirassununga), pela disponibilização da infraestrutura e logística, o que permitiu a execução deste projeto.

Aos *membros do LFEM*, Cécilia Constantino Rocha, Igor Garcia Motta, Amanda Guimarães, Gilmar Arantes Junior, Gabriela Dalmaso, Thiago Nishimura, Diego Poit e Priscila Ferraz. E aos alunos de iniciação científica e estagiários, Thais, Leonardo, Danilo, Adomar e Carol, por todo o tempo e ajuda disponibilizada para a execução e logística desse projeto.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram no planejamento e para a execução deste estudo. Muito obrigado.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

José de Alencar

RESUMO

FELTRIN, I.R.: Efeitos do 17 β -estradiol na abundância de transcritos para enzimas envolvidas na síntese de PGF2 α endometrial em fêmeas bovinas no final do diestro [Effects of 17 β -estradiol in the abundance of transcripts for enzymes involved in the synthesis of endometrial PGF2 α in bovine females at the end of diestrus] 2020. 87 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia e Biotecnologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2020.

Em bovinos, o 17 β -estradiol (17 β -E2) estimula a expressão de receptores de estradiol (ER) e ocitocina (OXTR) no endométrio. A ativação de OXTR induz a ativação de uma complexa cascata que resulta na síntese de PGF2 α . A hipótese é que o tratamento com 17 β -E2, 15 dias após o estro (D15), modula a expressão gênica das proteínas quinase (PKC) e fosfolipase A2 (PLA2), ambas envolvidas na síntese de PGF2 α e dependentes de cálcio. Objetivou-se neste estudo determinar os efeitos do 17 β -E2 na abundância de transcritos (PKC α , PKC β , PLA2G4, AKR1B1, AKR1C4 e PTGS2) diretamente envolvidos na síntese de PGF2 α . Novilhas (N=50), não prenhes, cíclicas, foram sincronizadas pela inserção de um dispositivo de liberação intravaginal contendo 0,558g de progesterona (P4), pela administração de 1 mg de benzoato de estradiol e 0,075 mg de D-Cloprostenol, ambos intramuscular (IM). Após 6 dias, foi injetado 0,075 mg de D-Cloprostenol, IM. Após 48 horas, o dispositivo contendo P4 foi removido e 0,150 mg de D-Cloprostenol foi administrado IM. Nesta ocasião, um adesivo foi inserido na base da cauda para a identificação dos estros (Boviflag Red Estrus Detector - ABS Pecplan) e observações de estro foram realizadas nos próximos 4 dias. Participaram do experimento somente novilhas identificadas em estro (D0 = dia do estro) e que ovularam (N=46). Entre D14 e D23, a área do corpo lúteo (CL; cm²), fluxo sanguíneo (%) e as concentrações plasmáticas de progesterona (P4) foram avaliadas diariamente. No D15, as novilhas foram randomicamente divididas em dois grupos: Grupo Controle (C; 2mL de óleo de girassol puro, IM; N=22) ou Estradiol (E; 1mg 17 β -E2 diluído em 2ml de óleo de girassol puro, IM, N=24). O momento da administração dos tratamentos foi considerado o tempo 0. Amostras de sangue foram obtidas de 0h a 7h, a cada hora, para a mensuração das concentrações de PGFM no D15. Depois da administração dos tratamentos, biópsias uterinas foram coletadas nos tempos 1,5h (C1,5h, N=8 e E1,5h; N =10) ou 3h (C3h, N =8 e E3h, N=11). A abundância de transcritos para os genes PKC α , PKC β , PLA2G4, AKR1B1, AKR1C4 e PTGS2 foi determinada por qPCR. No período entre o D18 e D20, houve menor área do CL no Grupo E (P = 0,023). O Grupo E apresentou maior concentração de PGFM (P = 0,0002) às 6h (225,45 \pm 16,96 pg/mL) e 7h (285,58 \pm 33,09 pg/mL) após a aplicação de 17 β -E2. No D16 e D17, o Grupo E apresentou menor concentração de P4 (P = 0,019) no D16 (4,14 \pm 0,97 ng/mL) e D17 (2,84 \pm 0,79 ng/mL). A luteólise funcional do Grupo E foi antecipada em 1,14 dias (17,07 \pm 0,43; P= 0,006). Da mesma forma, o Grupo E também apresentou antecipação da luteólise estrutural em 1,26 dias (18,42 \pm 0,33; P= 0,026). Entre os grupos de tratamento, a abundância não diferiu para os genes PKC α (P = 0,79), PKC β (P = 0,17), AKR1B1 (P = 0,34) e PTGS2 (P = 0,22). Houve efeito de tratamento apenas para os transcritos PLA2G4 (P = 0,03) e AKR1C4 (P = 0,05), entretanto, a abundância de ambos diminuiu no Grupo Estradiol à 1,5 e 3,0 h após a administração do 17 β -E2. Conclui-se que a aplicação de 17 β -E2 no 15^o dia do ciclo estral promoveu aumento das concentrações de PGFM e a antecipação da

luteólise funcional e estrutural nas novilhas Nelore, contudo, este aumento não foi associado ao aumento da transcrição gênica das proteínas estudadas

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

ABSTRACT

FELTRIN, I.R.: Effects of 17β -estradiol in the abundance of transcripts for enzymes involved in the synthesis of endometrial $PGF2\alpha$ in bovine females at the end of diestrus [Efeitos do 17β -estradiol na abundância de transcritos para enzimas envolvidas na síntese de $PGF2\alpha$ endometrial em fêmeas bovinas no final do diestro] 2020. 87 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia e Biotecnologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2020.

In cattle, 17β -estradiol (17β -E2) stimulates expression of estradiol (ER) and oxytocin receptor (OXTR) in the endometrium. The activation of OXTR leads to the induction of a complex cascade of molecular activation resulting in $PGF2\alpha$ synthesis. The hypothesis was that 17β -E2 treatment on day 15 (D15) after estrus modulates the gene expression of protein kinase (PKC) and phospholipase A2 (PLA2), both directly involved in the synthesis of $PGF2\alpha$ and calcium dependent. The aim of this study was to determine the effects of 17β -E2 on the abundance of key transcripts (PKC α , PKC β , PLA2G4, AKR1B1, AKR1C4 and PTGS2) involved in $PGF2\alpha$ signaling and synthesis. Nelore heifers (N=50), don't pregnant, cyclic were synchronized by insertion an intravaginal release device containing 0.558g of progesterone (P4), and by the administration of 1 mg of estradiol benzoate and 0.075 mg de D-Cloprostenol, both intramuscularly (IM). After 6 days, 0.075 mg D-Cloprostenol was injected, IM. After 48 hours the P4 device was removed and 0.150 mg D-Cloprostenol was administered IM. On this occasion, an adhesive was inserted at the base of the tail for the identification of estrus (Boviflag Red Estrus Detector - ABS Pecplan) and estrous observation were made in the next 4 days. Participated in the experiment only the heifers identified in estrus (D0 = day of estrus) that ovulated (N=46). Between D14 and D23, corpus luteum (CL) area (cm²), blood flow (%), and progesterone (P4) plasmatic concentrations were evaluated daily. On D15 heifers were assigned randomly to one of two groups: Control Group (C; 2mL of pure sesame oil, IM; N=22) or Estradiol (E; 1mg 17β -E2 diluted in 2mL of pure sesame oil, IM, N=24). Administration of treatment was considered time 0h. Blood samples were obtained from 0h to 7h, every hour, for the measurement of the PGFM concentrations on D15. After the treatments, uterine biopsies were collected at times 1,5h (C1,5h, N=8 and E1,5h; N=10) or 3h (C3h, N=8 and E3h, N=11). Transcript abundance PKC α , PKC β , PLA2G4, AKR1B1, AKR1C4 and PTGS2 genes were determined by qPCR. In the period between D18 and D20, there was a smaller area of CL in Group E (P = 0.023). Group E showed higher

concentration of PGFM ($P = 0.0002$) at 6 hour (225.45 ± 16.96 pg / mL) and 7 hour ($285.58 \pm 33,09$ pg / mL) after the application of 17β -E2. At D16 and D17, Group E showed lower concentration of P4 ($P = 0.019$) at D16 (4.14 ± 0.97 ng / mL) and D17 ($2,84 \pm 0.79$ ng / mL). Functional luteolysis in Group E was anticipated 1.14 days (17.07 ± 0.43 days; $P = 0.006$). Similarly, Group E also showed an anticipation of structural luteolysis in 1.26 days (18.42 ± 0.33 vs. 19.68 ± 0.42 days; $P = 0.026$). Among the treatment groups, abundance did not differ for the PKC α ($P = 0.79$), PRKC β ($P = 0.17$), AKR1B1 ($P = 0.34$) and PTGS2 ($P = 0.22$) genes. There was a treatment effect only for the PLA2G4 ($P = 0.03$) and AKR1C4 ($P = 0.05$) transcripts, however, the abundance of both decreased in the Group E at 1.5 and 3.0 h after administration of 17β -E2. It was concluded that the application of 17β -E2 on the 15th day of the estrous cycle promotes increased concentrations of PGFM and anticipation of functional and structural luteolysis in Nellore heifers, however, this increase was not associated with increased gene transcription of the studied proteins.

Keywords: Luteolysis. Prostaglandin. Endometrium. Cattle.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	ácido araquidônico
AKRs	aldo-ceto redutases
AKR1B1	família aldo-ceto redutase membro B1
AKR1C4	família aldo-ceto redutase membro C4
ATP	adenosina trifosfato
BEND	células endometriais bovinas
bFGF	fator de crescimento fibroblástico básico
CI	cálcio ionóforo
CL	corpo lúteo
CLP	células esteroidogênicas luteais pequenas
CLG	células esteroidogênicas luteais grandes
COXs	cicloxigenases
COX 2	cicloxigenase 2
cPLA2s	PLA2 citosólicas
DAG	diacilglicerol
E ₂	estradiol
ER	receptor de estradiol
ET-1	endotelina 1
IM	intramuscular
IP3	inositol trifosfato
iPLA2s	fosfolipases A2 independentes de Ca ²⁺
kDa	quilodaltons
LH	hormônio luteinizante

mg	miligrama
mL	mililitro
N	número de elementos
ng	nanograma
OT	ocitocina
OXTR	receptor de ocitocina
P4	progesterona
PAF-AH	Platelet-activating factor acetylhydrolase
pg	picograma
PBR	receptor benzodiazepínico tipo periférico
PGF2 α	prostaglandina F2 α
PGD2	prostaglandina D ₂
PGFM	13,14-dihidro-15-ceto-prostaglandina F2 α
PGE2	prostaglandina E ₂
PGG2	hidroperóxido prostaglandina G ₂
PGH2	prostaglandina H ₂
PGI2	prostaglandina I ₂
PKA	proteína quinase A
PKC	proteínas quinase
PKC α	proteína quinase α
PKC β	proteína quinase β
PLA ₂	fosfolipase A ₂
PLA2G4	fosfolipase A ₂ , grupo IV
PLC	fosfolipase C
PIP2	fosfatidilinositol bifosfato

PTGS2	prostaglandina-endoperóxido de sintase 2
P450 scc	enzima citocromo P450 side chain cleavage
qPCR	Real Time Quantitative PCR
RNAm	RNA mensageiro
sPLA2s	PLA2s secretadas
STAR	steroidogenic acute regulatory protein
TNF	fator de necrose tumoral
TNF- α	fator de necrose tumoral α
TXA2	tromboxano A2
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
3-HSD	enzima 3-beta hydroxysteroid dehydrogenase, $\Delta^5\Delta^4$, isomerase - 3-HSD

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via de síntese de PGF2 α endometrial durante a fase luteínica em fêmeas

bovinas. A presença do receptor de progesterona (PGR) inibe a expressão de receptor 1 de estrógeno (ESR1). O estradiol ativa seus receptores nucleares (ESR1 e ESR2). A ativação de ESR1 pelo hormônio 17 β -estradiol estimula a expressão do receptor de ocitocina (OXTR). A ocitocina se liga ao OXTR que estimula proteína G, desencadeando a ativação de fosfolipase C (PLC). A ativação de PLC leva a liberação de inositol trifosfato (IP3) e 2+ diacilglicerol (DAG) no citosol. O IP3 prove a abertura dos canais de Ca e o DAG estimula uma cadeia sequencial de fosforilação de proteína quinase C (PRKC α , PRKC β e PRKC γ), proteína quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e quinases reguladas por sinal extra-celular (ERK1/2). A ERK1/2 promove ativação de fosfolipase A2 (PLA2G4) que induz a liberação de ácido araquidônico (AA) da membrana fosfolipídica. O AA é utilizado como substrato pela enzima ciclooxigenase 2 (PTGS2) para formação de prostaglandina reduzida (PGH2). As prostaglandinas F sintases da família aldo-ceto redutases (AKR1B1, AKR1C3 e AKR1C4) metabolizam a PGH2 em prostaglandina F2 α (PGF2 α).....36

Figura 2. Modelo Hipotético. Fêmeas bovinas tratadas com 1 mg de 17 β -estradiol, via intramuscular, no D15 (D0 = dia do estro) apresentam aumento nas concentrações de PGFM e na expressão de componentes da cascata da síntese PGF2 α , com um aumento da abundância 1,5 horas após a aplicação de 17 β -estradiol e com o máximo de abundância 3 horas após a aplicação de 17 β -estradiol, especificamente as proteínas quinase C (PKC α , PKC β e PKC γ) e fosfolipase A2 (PLA2G4), todas dependentes de cálcio para a ativação.....41

Figura 3. Esquema ilustrando protocolo de sincronização de estro que se iniciou pela inserção do dispositivo intravaginal de liberação de P4 mono dose (0,558g P4; Cronipress ®, Biogénesis Bagó), D-cloprostenol (0,075 mg; Croniben®, Biogénesis Bagó) e Benzoato de Estradiol (1 mg; Sincrodiol®, Ourofino), ambos via intramuscular (IM). Seis dias após (D-6), administrou-se D-cloprostenol (0,075 mg; Croniben®, Biogénesis Bagó) via IM e avaliou-se os ovários para verificar a presença e funcionalidade do CL através de ultrassonografia transretal. No 8º dia (D-8), retirou-se o implante de P4 e administrou-se administrado D-cloprostenol (0,150 mg; Croniben®, Biogénesis Bagó), e realizou-se a colocação da fita de identificação dos estros (Boviflag, ABS) e avaliação dos ovários através de ultrassonografia transretal.

A partir do 9º dia, foi realizada observações de cio diárias durante 30 minutos (início da manhã e final da tarde) e checagem da ovulação a cada 12 horas (*). O dia da identificação do estro foi determinado como D0. Entre o D14 ao D23 pós estro, foram realizadas diariamente coletas de sangue e avaliações ultrassonográficas modo Doppler do CL (*). Quinze dias após o estro, os animais foram divididos em Grupo Estradiol e Controle para receberem os tratamentos. Neste mesmo dia, foram realizadas coletas seriadas de sangue e coleta de fragmentos endometriais através de biópsia uterina.....44

Figura 4. Detalhamento do procedimento experimental de coleta de sangue e biópsia endometrial. O momento zero hora foi definido como o momento em que os animais receberam os tratamentos (Estradiol e Controle). O Grupo Controle recebeu 2 mL (IM) de óleo de gergelim puro. O Grupo Estradiol recebeu 1 mg de 17β-estradiol (IM) diluído em 2 mL de óleo de gergelim puro. Os animais dos Grupos Estradiol e Placebo foram novamente divididos em subgrupos para coleta de biópsia endometrial nos tempos 1,5 e 3 horas pós tratamento. Cada animal foi submetido a coleta de fragmento endometrial em apenas um momento. Amostras de sangue seriadas foram coletadas em todos os animais, simultaneamente, nos momentos zero, 3, 4, 6 e 7 horas (*)...... 47

Figura 5. Variação da área do CL (cm²) (Média ± erro padrão), determinada através de ultrassonografia modo B, identificada do D14 ao D22 (D0 = dia do estro), em novilhas Nelore tratadas com 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Controle; N = 22) ou 1 mg de 17β -E2 diluído em 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Estradiol; N = 24) no D15.....56

Figura 6. Variação da área luteal com perfusão sanguínea (%) (Média ± erro padrão), determinada através de ultrassonografia Doppler, identificada do D14 ao D22 (D0 = dia do estro), em novilhas Nelore tratadas com 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Controle; N = 22) ou 1 mg de 17β -E2 diluído em 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Estradiol; N = 24) no D15.....57

Figura 7. Concentração plasmática de progesterona (ng/mL) (Média ± erro padrão), determinada por Radioimunoensaio (RIA), identificada do D14 ao D23 ao longo dos dias do ciclo estral, em novilhas Nelore tratadas com 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Controle; N = 14) ou 1 mg de 17β -E2 diluído em 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Estradiol; N = 15) no D15.....58

Figura 8. Porcentagem de animais com CL ativo detectado através de ultrassonografia modo Doppler, do D15 ao D24 do ciclo estral (D0 = dia do estro), em novilhas Nelore tratadas com 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Controle; N = 22)

ou 1 mg de 17 β -E2 diluído em 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Estradiol; N = 24) no D15.....59

Figura 9. Concentração plasmática de PGFM (pg/mL) (Média \pm erro padrão), determinada por ELISA, as 0, 3, 4, 6 e 7 horas (Hora 0 = administração do tratamento), em novilhas Nelore tratadas com 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Controle; N = 12) ou 1 mg de 17 β -E2 diluído em 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Estradiol; N = 13) no D15.....60

Figura 10. Abundância relativa de transcritos para PKC α determinada por qPCR, 1,5 e 3 horas após novilhas Nelore serem tratadas com 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Controle; N = 22) ou 1 mg de 17 β -E2 diluído em 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Estradiol; N = 24) no D15.....61

Figura 11. Abundância relativa de transcritos para PKC β determinada por qPCR, 1,5 e 3 horas após novilhas Nelore serem tratadas com 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Controle; N = 22) ou 1 mg de 17 β -E2 diluído em 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Estradiol; N = 24) no D15.....61

Figura 12. Abundância relativa de transcritos para PLA2G4 determinada por qPCR, 1,5 e 3 horas após novilhas Nelore serem tratadas com 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Controle; N = 22) ou 1 mg de 17 β -E2 diluído em 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Estradiol; N = 24) no D15.....62

Figura 13. Abundância relativa de transcritos para AKR1B1 determinada por qPCR, 1,5 e 3 horas após novilhas Nelore serem tratadas com 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Controle; N = 22) ou 1 mg de 17 β -E2 diluído em 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Estradiol; N = 24) no D15.....63

Figura 14. Abundância relativa de transcritos para AKR1C4 determinada por qPCR, 1,5 e 3 horas após novilhas Nelore serem tratadas com 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Controle; N = 22) ou 1 mg de 17 β -E2 diluído em 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Estradiol; N = 24) no D15.....63

Figura 15. Abundância relativa de transcritos para PTGS2 determinada por qPCR, 1,5 e 3 horas após novilhas Nelore serem tratadas com 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Controle; N = 22) ou 1 mg de 17 β -E2 diluído em 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Estradiol; N = 24) no D15.....64

Figura 16. Efeitos da aplicação de 17 β -E2 no D15 pós estro em fêmeas bovinas sobre a abundância de transcritos relacionados a síntese de PGF2 α endometrial, especificamente *PKC α* , *PKC β* , *PLA2G4*, *AKR1B1*, *AKR1C4* e *PTGS2*; 1,5 e 3 horas após a aplicação do tratamento (hora 0 = administração do tratamento) em Novilhas Nelore. no D15 do ciclo estral (D0 = dia do estro).....65

Figura 17. Modelo hipotético representando os efeitos do 17β -E2 sobre as enzimas de sinalização e síntese de $\text{PGF}_2\alpha$ na célula endometrial bovina. A aplicação de 17β -E2 no dia 15 pós estro não promoveu o aumento de transcritos de enzimas-chave envolvidas nesta cascata, sendo elas $\text{PKC}\alpha$, $\text{PKC}\beta$, PLA_2G_4 , PTGS_2 , AKR1B1 e AKR1C4 . Entretanto, a aplicação de 17β -E2 levou ao aumento da síntese de $\text{PGF}_2\alpha$ pela célula endometrial. Esses resultados indicam que possivelmente existam outros mecanismos de ação através dos quais o 17β -E2 exerce seus efeitos sobre a síntese de $\text{PGF}_2\alpha$72

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Sigla da proteína, nome da proteína, sequência dos primers forward (F) e reverse (R), identificação representativa (ID), números de pares de bases (PB) e eficiência da curva para os genes testados.....52
- Tabela 2. Dias da luteólise funcional e estrutural em novilhas Nelore tratadas com 17β -Estradiol (Grupo Estradiol) e não tratadas (Grupo Controle) no dia D15 após o estro (média \pm EPM).....55

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
REVISÃO DE LITERATURA	28
2.1 DESENVOLVIMENTO DO CORPO LÚTEO E ESTEROIDOGÊNESE LUTEAL.....	28
2.2 LUTEÓLISE.....	29
2.3 AÇÃO DA PGF2 α NA LUTEÓLISE	32
2.4 AÇÃO DOS ESTERÓIDES E DA OCITOCINA NA LUTEÓLISE.....	33
2.5 MECANISMOS ENDÓCRINOS E MOLECULARES ENVOLVIDOS NA SÍNTESE DE PGF2 α	34
2.6 CARACTERÍSTICAS DAS PROTEÍNAS PARTICIPANTES DA CASCATA GERADORA DE PGF2 α	37
2.6.1 Proteína Quinase C (PKC)	37
2.6.2 Fosfolipase A2 (PLA2).....	38
2.6.3 Prostaglandina sintetase 2 (PTGS2) ou Cicloxigenase 2 (COX-2).....	39
2.6.4 Aldo-ceto redutases – AKR1B1 e AKR1C4.....	40
3. HIPÓTESE	41
4. OBJETIVOS	42
5. MATERIAL E MÉTODOS	42
5.1 LOCAL DO EXPERIMENTO	42
5.2 ANIMAIS	42
5.3 SINCRONIZAÇÃO DOS ESTROS	43
5.4 OBSERVAÇÕES DE ESTROS.....	43
5.5 AVALIAÇÕES ULTRASSONOGRÁFICAS.....	44
5.6 TRATAMENTO <i>IN VIVO</i>	45
5.7 COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE	45
5.8 BIÓPSIA UTERINA PARA OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS ENDOMETRIAIS.....	46
5.9 MENSURAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE P4 POR RADIOIMUNOENSAIO	47
5.10 MENSURAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE PGFM POR ELISA.....	48
5.11 AVALIAÇÃO DE TRANSCRITOS POR qPCR	49
5. 12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
6. RESULTADOS	54

6.1 MOMENTO DA LUTEÓLISE FUNCIONAL E ESTRUTURAL	54
6.2 ÁREA DO CORPO LÚTEO (CL)	55
6.3 PERFUSÃO SANGUÍNEA NO CORPO LÚTEO (CL)	56
6.4 CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE P4	57
6.5 CURVA DE SOBREVIVÊNCIA PADRÃO EM RELAÇÃO À PORCENTAGEM (%) DE ANIMAIS COM CL ATIVO	58
6.6 CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE PGFM	59
6.7 ABUNDÂNCIA DE RNAm.....	60
7. DISCUSSÃO	65
8. CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

1. INTRODUÇÃO

A produtividade e a lucratividade de um rebanho bovino estão diretamente relacionadas à eficiência reprodutiva. Para se elevar os índices reprodutivos torna-se imprescindível aumentar a eficiência das matrizes de corte na fase de cria. Para tanto, a melhor compreensão dos mecanismos endócrinos e moleculares relacionados à fisiologia do ciclo estral torna-se de extremo interesse, uma vez que constituem à base do entendimento para a implantação de estratégias de manejo reprodutivo que possam colaborar com o aumento do número de bezerros nascidos/vaca/ano. Um dos principais fatores que podem comprometer tal eficiência e determinar elevadas perdas econômicas em matrizes de corte, refere-se à mortalidade embrionária precoce, ocasionada no período compreendido entre o 15º e o 19º dias após a ovulação (DISKIN et al., 2006).

O ciclo estral corresponde ao período compreendido entre dois estros, e em fêmeas bovinas possui a duração média de 21 dias. Posteriormente a ovulação, ocorre o processo de multiplicação, diferenciação e luteinização das células foliculares remanescentes do folículo ovulatório, dando origem ao corpo lúteo - CL (GINTHER et al., 1989). Quando o reconhecimento materno-fetal é realizado com êxito o CL é preservado e mantido ativo até os últimos dias que antecedem o parto. Na ausência da fertilização ou quando o concepto (embrião e membranas anexas) não é capaz de sinalizar adequadamente sua existência no útero materno, ocorre a falência funcional e estrutural do CL no período compreendido entre o 15º e 19º dias pós-ovulação. Neste período específico, denominado de "período crítico", deve ocorrer a ausência da luteólise e a manutenção do CL para que a prenhez se estabeleça ou o desencadeamento da luteólise e a destruição do CL para que se proceda o estro e a possibilidade de um novo acasalamento (GINTHER, 1989).

A prostaglandina $F2\alpha$ ($PGF2\alpha$) endometrial é conhecida como o principal agente luteolítico em fêmeas ruminantes, e é responsável por promover a luteólise e impedir a continuidade da síntese de progesterona (P4) pelo CL (MCCRACKEN et al., 1972, 1973, 1984; MEIDAN et al., 1999; CARAMBULA et al., 2002). Em vacas e ovelhas, demonstrou-se que a síntese de $PGF2\alpha$ é regulada pela ação dos hormônios ovarianos estradiol (E2), P4 e ocitocina (OT) e seus respectivos receptores presentes no endométrio (SPENCER et al., 2007; HUGHES et al., 1987).

Utilizando em vacas a técnica de eletrocauterização de folículos ovarianos através do uso de raio-x (1.500 rads), procedimento que extingue o E2 ovariano

endógeno, observou-se uma supressão da síntese de PGF2 α acompanhada de um atraso na regressão do CL, permitiu demonstrar-se que a presença do E2 é essencial para promover o desencadeamento da luteólise espontânea (VILLA-GODOY et al., 1985). Também foi demonstrado que, a administração de E2 promove a síntese de PGF2 α e a antecipação da luteólise (THATCHER et al., 1986; PUGLIESI et al., 2011), sendo tal estímulo dose dependente (GINTHER et al., 2010; PUGLIESI et al., 2011). Dessa forma, o aumento da concentração plasmática de E2, de origem endógena ou exógena, promove o desencadeamento da luteólise (SALFEN et al., 1988) enquanto a redução da concentração plasmática de E2 promove atraso na luteólise em vacas (ARAUJO et al., 2009).

A síntese de PGF2 α no endométrio das fêmeas bovinas é resultado de uma complexa cascata de eventos intracelulares que ocorrem de forma altamente coordenada, tendo como ponto de partida a ativação dos receptores endometriais de OT (OXTR) (SPENCER et al., 2007; SILVIA; RAW, 1993; MANN et al., 1995). Estudos relataram que o E2 exerce controle positivo sob a expressão dos OXTR, aumentando a concentração de PGF2 α no endométrio das fêmeas ruminantes (SPENCER et al., 1995; ASSELIN et al., 1996; VALLET et al., 1990; FLEMING et al., 2006). Atualmente é descrito que o E2 atua estritamente sob o controle dos receptores endometriais de estradiol (ESR) e ocitocina (OXTR), entretanto, é possível que este também exerça efeitos sob outros componentes da cascata de síntese de PGF2 α . De acordo com Membrive et al. (2014), houve um aumento da síntese de PGF2 α quando explantes endometriais de vacas tratadas com E2 *in vivo* foram posteriormente cultivados *in vitro* com cálcio ionóforo (CI). O mesmo efeito foi observado quando células endometriais bovinas (BEND) foram tratadas *in vitro* com E2 e CI, efeito não observado em células tratadas somente com E2 ou CI. Esses resultados demonstram que o E2 possivelmente promova um aumento da abundância e/ou atividade de enzimas participantes da cascata geradora de PGF2 α , estas dependentes de cálcio.

Perante estes achados, presume-se que a expressão de receptores e de enzimas, assim como a presença de co-fatores são pontos fundamentais para a síntese de PGF2 α . Os efeitos do E2 na expressão de receptores endometriais são conhecidos. Porém, ainda não são conhecidos os efeitos do E2 na expressão das proteínas componentes da via de síntese de PGF2 α por ativação de OXTR durante a luteólise de vacas. A aquisição de tais conhecimentos poderá contribuir para a elaboração de estratégias anti-luteolíticas potencialmente capazes de aumentar as taxas de concepção e a eficiência reprodutiva.

Diante desse contexto, foi formulada a hipótese de que, a aplicação do 17-beta-estradiol (17 β -E2) em vacas de corte, no dia 15 do ciclo estral, modula a expressão gênica das enzimas cálcio-dependentes, especificamente a proteína quinase (PKC) e fosfolipase A2 (PLA2), ambas envolvidas na cascata geradora de PGF2 α . Assim, objetivou-se avaliar os efeitos da administração sistêmica de 17 β -E2 sobre componentes da cascata de síntese endometrial de PGF2 α , em vacas de corte no dia 15 do ciclo estral, especificamente PKC α , PKC β , PLA2G4, AKR1B1, AKR1C4 e PTGS2, utilizando-se a técnica de qPCR.

REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DESENVOLVIMENTO DO CORPO LÚTEO E ESTEROIDOGÊNESE LUTEAL

No momento da ovulação ocorre a ruptura folicular seguida da expulsão do oócito. Logo em seguida, a parede do folículo recém ovulado é colapsada e a cavidade do mesmo é invadida por linfa e sangue provenientes do rompimento dos vasos. Este conjunto de elementos formará inicialmente uma estrutura denominada corpo hemorrágico (DIAZ et al., 2002). No corpo hemorrágico, as células remanescentes são submetidas à hiperplasia e hipertrofia formando o CL. Tais modificações celulares são mediadas por fatores angiogênicos e mitogênicos como o fator de crescimento dos fibroblastos (FGF) (GOSPODAROWICZ et al., 1985; SCHAMS; BERISHA, 2004), fator de crescimento I semelhante à insulina (IGF-1) (SUH et al., 1992; SCHAMS; BERISHA, 2004), fator de crescimento semelhante à heparina (GRAZUL-BILSKA et al., 1992) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (REDMER; REYNOLDS, 1996), dentre outros.

O tecido luteal é formado por diversos tipos celulares heterogêneos, que incluem as células esteroideogênicas luteais pequenas (CLP) e grandes (CLG) e também as células não esteroideogênicas como células endoteliais, fibroblastos, periócitos, fibrócitos e células imunes (SHIRASUNA et al., 2007). Em fêmeas bovinas, o CL cresce rapidamente de 2 a 3 dias após a ovulação, seguido de ampla angiogênese e vascularização (MIYAMOTO et al., 2009). Fatores de crescimento como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF); são fundamentais para que ocorra o desenvolvimento e manutenção da vasta rede de capilares recém-formados e também colaboram para a produção de P4 (SALLES; ARAUJO, 2010).

O CL é um órgão endócrino transitório cuja ação principal é a produção de P4 pelas células esteroideogênicas (NISWENDER et al., 2000; SKARZYNSKI et al., 2008; SALLES; ARAUJO, 2010). A P4 liberada na circulação sistêmica promove a quiescência da musculatura miometrial, desenvolvimento das glândulas endometriais e promove a preparação de um microambiente uterino apropriado para que o conceito se desenvolva. Uma adequada função luteal é essencial para promover o êxito do reconhecimento

materno-fetal e o estabelecimento da prenhez ((NISWENDER et al., 2000; SKARZYNSKI et al., 2008; SALLES; ARAUJO, 2010).

Posteriormente à ovulação, para que as células luteais produzam P4, é necessário que ocorra a diferenciação celular, aumento na expressão das enzimas que convertem colesterol em P4 e aumento de proteínas transportadoras de colesterol para a membrana mitocondrial. O colesterol é o principal substrato utilizado para a formação da P4. Na membrana mitocondrial, o colesterol é convertido à pregnolona pela ação da enzima citocromo P450 side chain cleavage - P450 scc (HANUKOGLU, 1992). A pregnenolona é transportada ao retículo endoplasmático liso, onde pela ação da enzima 3 - beta - hydroxysteroid dehydrogenase, $\Delta 5\Delta 4$, isomerase (3-HSD) é convertida a P4 (HANUKOGLU, 1992; NISWENDER et al., 1994).

Há basicamente três proteínas transportadoras de colesterol para a membrana mitocôndrial, sendo elas, a proteína de regulação aguda da esteroidogênese (StAR “Steroidogenic Acute Regulatory Protein”), o receptor benzodiazepínico tipo periférico (PBR) e a endozepina, uma ligante natural do PBR. Este transporte é condicionado a fosforilação da proteína StAR. Essa proteína possui dois sítios de fosforilação, sendo um deles fosforilado pela PKA e o outro pela PKC. O mecanismo de ativação pela ação da PKA é estimulado pelo hormônio LH, o que acarreta em um aumento do transporte de colesterol e da esteroidogênese com consequente aumento na síntese de P4. A PKA também causa a fosforilação do PBR, gerando um aumento no transporte do colesterol (NISWENDER, 2002).

2.2 LUTEÓLISE

Caso não aconteça a fertilização ou haja a incapacidade do conceito em sinalizar sua existência no útero, o CL deve regredir para que ocorra um novo estro (MILVAE, 2000; WEBB et al., 2002). Durante o processo de luteólise, o qual corresponde a regressão funcional e estrutural do CL, que ocorre durante o 15º e 19º dia do ciclo estral, o tecido luteal sofre alterações bruscas em sua capacidade esteroidogênica, vascularização e remodelamento resultando na substituição da glândula por tecido conjuntivo (GINTHER et al., 1989; STOCCO et al., 2007). Desse modo, a luteólise pode ser subdividida em luteólise funcional e estrutural (STOCCO et al., 2007; SKARZYNSKI et al., 2008).

A luteólise funcional caracteriza-se pela diminuição da produção de P4 em um breve período de tempo na ovelha (MCCRACKEN et al., 1999) e na vaca (GINTHER et al., 2010a); e inicia-se antes de serem observadas alterações morfológicas na integridade das células luteais (STOCCO et al., 2007). Desse modo, observando a concentração plasmática de P4, a luteólise funcional pode ser subdividida em três fases, a "pré-luteólise" que caracteriza-se pelo período antes do início da redução na concentração plasmática de P4; o "período luteolítico" caracterizado pela drástica diminuição da concentração plasmática de P4 e o "período pós-luteolítico" onde a concentração de P4 torna-se menor que 1 ng/mL. Com base em amostras de P4 plasmáticas coletadas de hora em hora, estima-se que o período luteolítico possui a duração de 24 horas em novilhas (GINTHER et al., 2010a). Os pulsos sequenciais ocorrem a cada 9 a 12 horas, e possuem duração média de 4 horas, sendo que todo o processo de luteólise funcional possui duração aproximada de 30 horas (MIYAMOTO et al., 2005; GINTHER et al., 2007, 2010a, 2010b).

Especula-se que a ação da $PGF2\alpha$ neste contexto, seja de inibir as enzimas esteroidogênicas (P450 scc e 3-HSD), essenciais para a síntese de P4. Por outro lado, também existem evidências que a $PGF2\alpha$ possa atuar bloqueando o transporte de colesterol para o interior da mitocôndria, promovendo a restrição de tal substrato. De acordo com estudos, a administração de $PGF2\alpha$ levou à ausência da expressão gênica da 3-HSD e da STAR, enquanto que a P450 scc permaneceu expressa. Assim esses dados sugerem que, a atividade da $PGF2\alpha$ seja de inibir a síntese de P4 através da inibição da 3-HSD e/ou por bloqueio do transporte de colesterol para dentro da mitocôndria por inibição da STAR (TIAN et al., 1994; PESCADOR et al., 1996).

Nas células endoteliais que constituem a parede dos vasos sanguíneos do CL, a $PGF2\alpha$ também estimula a síntese de RNAm e a secreção de endotelina 1 (ET-1). Em vacas, esta característica se torna mais evidente no período entre os dias 17 e 21 do ciclo estral, onde a síntese de ET-1 aumenta em torno de 30 vezes quando comparada aos dias 5 e 6 do ciclo estral. A ET-1 caracteriza-se com uma das mais potentes substâncias vasoconstritoras do organismo (GIRSH et al., 1996).

Em um modelo descrito por Meidan, Milval e Weiss (1999), a $PGF2\alpha$ se liga a receptores presentes nas CLG e promove uma grande diminuição na síntese de P4 e um aumento na síntese de OT, eventos estes que associados beneficiam o aumento da expressão de ET-1. Esta também atua sobre as CLP reduzindo a síntese de P4. A $PGF2\alpha$ se conecta aos receptores que estão presentes nas células endoteliais e estimula a síntese

de ET-1. Esses eventos associados, promovem uma vasoconstrição no CL e subsequente hipóxia, condição que estimula ainda mais a secreção de ET-1, que leva a apoptose das células vasculares e esteroidogênicas. Este processo também é acompanhado por um influxo de monócitos, macrófagos e citocinas inflamatórias, dentre elas o fator de necrose tumoral (TNF) (HAHNKE et al., 1994). As CLP e CLG não apresentam alterações evidentes em sua morfologia 24 a 36 horas após a exposição a PGF 2α , entretanto, sua capacidade esteroidogênica mostrou-se já reduzida neste intervalo de tempo (SAWYER et al., 1990).

A regressão estrutural do CL caracteriza-se pela diminuição do tamanho e peso da glândula, a qual passa a ser um tecido totalmente regredido dentro do estroma ovariano, passando a ser denominado *corpo albicans*. A involução do CL não se trata apenas da apoptose do tecido luteal, mas também de uma substituição do suporte vascular e do tecido conectivo pré-existente com fibras colágenas, fibroblastos e macrófagos; onde a maior parte desta estrutura é substituída por estroma ovariano (STOCCO et al., 2007).

A diminuição do fluxo sanguíneo no CL tem sido apontada como essencial para o início da luteólise (MIYAMOTO et al., 2005). A aplicação de PGF 2α quando realizada no início da fase de metaestro, até o 5º dia do ciclo estral, não causa efeitos sobre o fluxo sanguíneo e tamanho do CL. Entretanto, quando esta aplicação é realizada em vacas a partir do 6º dia do ciclo estral, determina um aumento do fluxo sanguíneo no CL prosseguido por uma drástica redução do mesmo (ACOSTA et al., 2002).

Em bovinos, a luteólise estrutural inicia-se logo após o início do declínio da P4 plasmática (GINTHER, 2007). Entretanto, este processo pode demorar ainda alguns dias para ser finalizado após o término da luteólise funcional (MCCRACKEN et al., 1999). Muitos agentes têm sido indicados como mediadores da luteólise funcional (MCCRACKEN et al., 1999), como por exemplo, macrófagos e outras células imunes que exercem importante papel na regressão luteal através da liberação de fatores de necrose tumoral- α (TFN- α) e outras citocinas. Além disso, o TFN- α pode também estar relacionado à um efeito anti esteroidogênico durante a luteólise, visto que *in vitro* o TFN- α bloqueia a produção de P4 estimulada pelo hormônio luteinizante (LH) nas células luteais bovinas (BENYO; PATE, 1992).

2.3 AÇÃO DA PGF2 α NA LUTEÓLISE

A PGF2 α é um potente agente luteolítico em diversas espécies de animais domésticos. Nos bovinos, constitui a principal molécula produzida pelo endométrio durante a regressão do CL (MCCRACKEN; CUSTER, 1999; ASSELIN et al., 1996). Nas fêmeas bovinas, a secreção de PGF2 α ocorre decorrente de múltiplos pulsos (4 a 7 pulsos) de curta duração (3 a 6 horas) durante 2 a 3 dias, ocorrendo durante e após a queda da P4 circulante (KINDHAL et al., 1981; GINTHER, 2007; 2010b). Pulsos sequenciais de PGF2 α para induzir a luteólise foram relatados em bovinos (GINTHER et al., 2009a), equinos (GINTHER et al., 2009b) e ovinos (SCHRAMM et al., 1983). Em bovinos evidenciou-se que para a ocorrência da luteólise completa (P4 < 1 ng/mL) são necessárias três sessões de infusão de PGF2 α (0,5 mg, via intravenosa, a cada 12 horas), sendo que após uma única sessão de PGF2 α , as concentrações de P4 permanecem altas (GINTHER et al., 2009a).

Utilizando modelos experimentais onde foram realizadas histerectomias uni e bilaterais, verificou-se que a presença do corno uterino ipsilateral ao ovário contendo o CL é determinante para que ocorra a regressão do CL em ruminantes. Verificou-se também, que histerectomia unilateral do corno uterino ipsilateral ao ovário contendo o CL, acarreta a persistência do CL (MCCRACKEN; CUSTER, 1999). Assim, demonstrou-se a necessidade de haver uma comunicação direta entre útero e ovários para que a PGF2 α uterina chegue até o CL e promova a luteólise. Tal comunicação é possível através do contato vascular entre a veia uterina e a artéria ovariana, sendo esse mecanismo posteriormente denominado “transporte de PGF2 α por contra-corrente”. É de conhecimento, que a PGF2 α é rapidamente metabolizada, onde em apenas uma passagem pelos pulmões sua metabolização é de 90% e 65% de PGF2 α em bovinos e ovinos, respectivamente. Desse modo, através deste importante mecanismo de transporte, a PGF2 α consegue alcançar primeiramente os ovários, chegando aos pulmões posteriormente a sua ação no CL. Além disso, o transporte de PGF2 α também é beneficiado por proteínas transportadoras de prostaglandinas que fazem parte da família “solute carrier” (LEE et al., 2010).

A 13,14-dihydro-15-keto-PGF2 α (PGFM) é o principal metabólito da PGF2 α e sua mensuração no plasma sanguíneo possui alta correlação com as concentrações de PGF2 α . A PGF2 α possui curta meia vida, em torno de 1 minuto, enquanto, a PGFM apresenta meia vida em torno de 8 minutos. Assim, em diversos estudos utilizou-se a

mensuração plasmática de PGFM para indicar as concentrações de PGF2 α (KOTWICA et al., 1997; MANN, 1999; SANTOS et al., 2009; GINTHER et al., 2010). A elevação da amplitude dos pulsos de PGF2 α , que acontece entre os dias 15 e 19 do ciclo estral, torna-se determinante para a adequada regressão do CL em fêmeas bovinas (MCCRACKEN; CUSTER, 1999). Os primeiros pulsos de PGFM possuem concentração menor que 100 pg/mL e posteriormente aumentam até aproximadamente 500 pg/mL, causando a regressão funcional do CL (GINTHER et al., 2010).

Análogos da PGF2 α vêm sendo amplamente utilizados para a sincronização do estro de vacas, onde seus efeitos geram a regressão do CL determinando o início de um novo ciclo estral (PURSLEY et al., 1995; PURSLEY et al., 1997).

2.4 AÇÃO DOS ESTERÓIDES E DA OCITOCINA NA LUTEÓLISE

O E2 e a P4 são importantes hormônios esteróides produzidos pelos ovários e que exercem controle sob o ciclo estral dos mamíferos. Durante o decorrer do ciclo estral normal da vaca, o E2 atua promovendo as manifestações de estro (LYIMO et al., 2000); enquanto a P4 exerce efeitos positivos sob o desenvolvimento da prenhez e a sobrevivência embrionária (CARTER et al., 2008).

Dentre as diversas ações dos hormônios E2, P4 e OT, estes têm sido relacionados a regulação do início da secreção de PGF2 α endometrial durante a luteólise das fêmeas bovinas. Recentemente, diversos modelos de mecanismos controladores da luteólise têm proposto que mudanças na expressão dos receptores endometriais de E2, P4 e OT, influenciam na secreção de PGF2 α uterina e por consequência, na luteólise da vaca (SILVIA et al., 1991; AROSH et al., 2004; WEEMS et al., 2006). Em tais modelos observou-se que a expressão dos receptores de E2 e OT é inibida durante as fases inicial e intermediária do desenvolvimento do CL graças ao efeito inibitório causado pelas altas concentrações de P4 (WATHES; HAMON, 1993; IVELL et al., 2000).

O efeito exercido pela P4 envolve sua ligação com alta afinidade ao OXTR, inabilitando este hormônio de se ligar ao seu receptor, assim por consequência, há uma supressão da produção de IP3 e mobilização de cálcio que são necessários para a resposta celular (ZINGG et al., 1998). Após a ocorrência da ovulação, é necessário que o útero seja exposto à P4 por no mínimo 10 dias, para que sejam ativados os mecanismos responsáveis pela secreção espontânea de PGF2 α . Esta maior exposição a P4 promove o acúmulo de ácido araquidônico (AA) e cicloxigenases (COXs) dentro das células

endometriais, necessários para a síntese de $\text{PGF2}\alpha$ (MCCRACKEN et al., 1984; SILVIA; RAW, 1993).

No final do período luteal, os receptores de E2 no útero se elevam após a diminuição dos receptores de P4 e da sensibilidade uterina à P4 (MEYER et al., 1988). Em sequência, a ação do E2 circulante sobre os seus receptores endometriais, estimula a síntese dos receptores endometriais de ocitocina, o que leva a secreção de $\text{PGF2}\alpha$ através da ligação da OT ao seu receptor endometrial (FLINT; SHELDRIK, 1985; SILVIA et al., 1991; MANN et al., 2001).

O E2 é sintetizado pelas células da granulosa provenientes de folículos antrais, em especial, pelos folículos dominantes pré-ovulatórios (DIELEMAN; BEVERS, 1987). Em bovinos, as concentrações plasmáticas de E2 oscilam de acordo com as ondas de crescimento folicular (GINTHER et al., 1989); sendo alcançada as concentrações plasmáticas máximas, momentos antes da ovulação (ROCHE et al., 1998).

Diversos estudos têm evidenciado a importância do E2 na luteólise e para a produção de $\text{PGF2}\alpha$ pelo endométrio. Thatcher et al. (1986) administraram E2 em vacas no dia 15 do ciclo estral e observaram o desencadeamento da luteólise seguida da manifestação de estro. Em outros estudos, a administração do 17β -E2 aumentou a liberação de PGFM gerando um pico luteolítico (GINTHER et al., 2010). Da mesma forma, a administração do 17β -E2 determinou a elevação da amplitude e da intensidade do pico de $\text{PGF2}\alpha$ no decorrer do pico luteolítico de forma dose dependente (PUGLIESI et al., 2011). Ainda, um único tratamento utilizando 0,1 mg de E2 no dia 14 após a ovulação promoveu um pulso acentuado de PGFM e a luteólise prematura (GINTHER et al., 2010d).

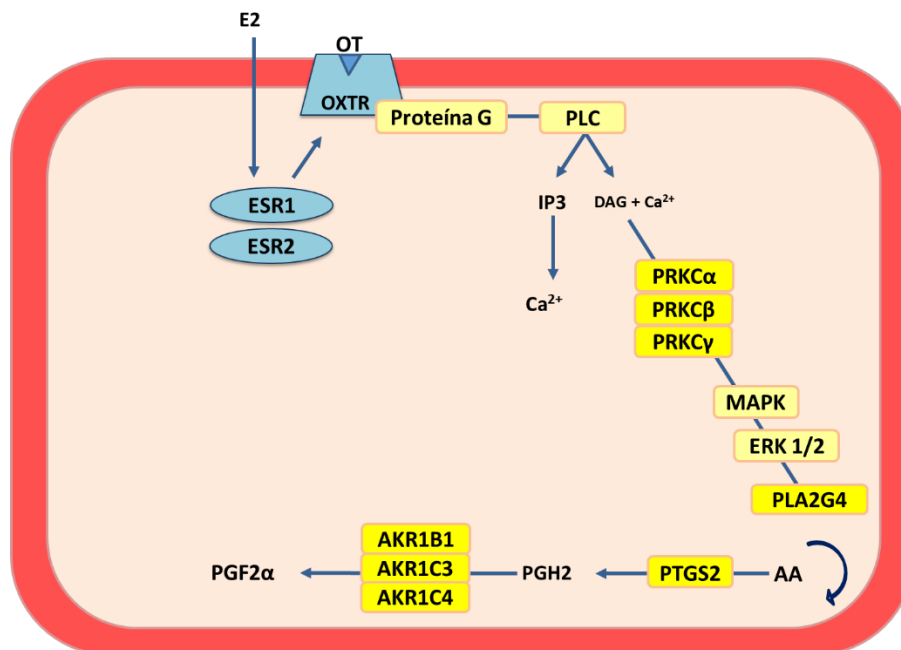
Diante desse contexto, assume-se que o E2 exerce papel fundamental na luteólise, entretanto, os mecanismos envolvidos em sua ação ainda não foram totalmente esclarecidos.

2.5 MECANISMOS ENDÓCRINOS E MOLECULARES ENVOLVIDOS NA SÍNTESE DE $\text{PGF2}\alpha$

As prostaglandinas são compostos eicosanóides bioativos provenientes de ácidos graxos formados de 20 carbonos, que através de ações parácrinas e autócrinas, realizam funções fisiológicas e patológicas em diversos órgãos e tecidos do organismo (BERGSTRON et al., 1964).

Em ruminantes, os pulsos de OT ocorrem simultaneamente aos pulsos de PGF2 α durante a luteólise (FAIRCLOUGH et al., 1980; WEBB et al., 1981). A PGF2 α produzida pelas células endometriais e a OT luteal constituem um sistema de retroalimentação positiva. Em bovinos, a administração de PGF2 α estimula a secreção de OT pelo CL (FLINT; SHELDRIK, 1982; LAMSA et al., 1989), da mesma maneira, altas doses de OT causam o aumento da secreção de PGF2 α (SILVIA; TAYLOR, 1989; KOTWICA et al., 1998). Entretanto, os fatores que levam ao início e término da secreção desses hormônios ainda não foram determinados.

Os receptores endometriais de OT (OXTR) fazem parte da família de receptores acoplados a proteína G, e que ao serem ativados pela sua ligação a OT, estimulam moléculas de sinalização intracelular e proteínas da via de síntese de PGF2 α (SILVIA; HOMANICS, 1988). Um modelo celular da biossíntese de PGF2 α a partir do AA foi descrito por Burns et al. (1997), representado pela Figura 1. A ativação dos OXTR leva a ativação da proteína G, que por sua vez ativa a fosfolipase C (PLC). A PLC ativada cliva o fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) em inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG) (TYSSELING et al., 1997). O IP3 liga-se aos seus receptores presentes no retículo endoplasmático, promovendo a abertura dos canais de cálcio, o que acarreta em um aumento nas concentrações de cálcio no citosol da célula. Algumas enzimas presentes nesta cascata são dependentes de cálcio para sua ativação, dessa forma, o DAG na presença de cálcio, leva a uma cascata de ativação de proteínas quinases - PRKC α , PRKC β , PRKC γ (MELLOR; PARKER, 1998) e fosfolipase A2 (PLA2). Em seguida, a PLA2 cliva o ácido araquidônico (AA) presente na membrana plasmática (GIMPL; FAHRENHOLZ, 2001; TITHOF et al., 2007). Assim, o AA livre no citosol é convertido através da ação da cicloxigenase 2 (COX 2), a prostaglandina H2 (PGH2). A PGH2 é então convertida a PGF2 α através da ação de enzimas sintases (AKR1B1 e AKR1C4) (FORTIER et al., 2008).



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

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

Este mecanismo molecular de biossíntese de PGF2 α realizado a partir da ativação dos OXTR é reconhecido. Comprovou-se que o estímulo exercido pelo E2 na expressão de receptores endometriais de E2, e especialmente sob os OXTR, é passo-chave para a ativação da via de síntese de PGF2 α (FLEMING et al., 2006). Porém, os efeitos desempenhados pelo E2 sobre outros componentes da cascata geradora de PGF2 α endometrial durante a luteólise das fêmeas bovinas ainda permanecem desconhecidos.

Com o passar dos anos, diferentes grupos de pesquisa vêm estudando os mecanismos de regulação da atividade da PKC na ativação da PLA2 para a síntese de PGF2 α . A síntese de PGF2 α exige a ativação, sinalização e fosforilação de um complexo

conjunto de moléculas; onde ambas as enzimas quinases e fosfolipases envolvidas nesse processo, necessitam de cálcio para serem ativadas (BURNS et al., 1998). O cálcio é um importante modulador da sinalização de vias moleculares, atuando na regulação da atividade enzimática a partir de sua ligação à sítios específicos. Nesse contexto da cascata geradora de $PGF2\alpha$, este atua como modulador na ativação de enzimas cálcio dependentes, em especial a PKC e PLA2 (CLARK et al., 1991).

Existem evidências de que o E2 atue estimulando a liberação de cálcio intracelular. Thomas et al. (2006) verificaram que o E2 aumentou a concentração de cálcio intracelular de maneira acelerada, e ativou a via de sinalização da síntese de prostaglandinas em células MCF-7 humanas. Observou-se que em explantes endometriais bovinos tratados com ionóforo de cálcio (CI) *in vitro*, houve um aumento da liberação de $PGF2\alpha$ (DANET-DESNOYERS et al., 1996; BURNS et al., 1997). Verificou-se ainda que o acréscimo de CI ao cultivo de explantes endometriais, coletados no dia 17 do ciclo de vacas previamente tratadas *in vivo* com E2, aumenta a síntese de $PGF2\alpha$ (MEMBRIVE et al., 2014). O mesmo efeito também foi observado em células endometriais bovinas (BEND) submetidas ao tratamento *in vitro* com E2 e CI (MEMBRIVE et al., 2014). Membrive et al. (2014) sugere um modelo, onde o E2 estimularia a síntese das proteínas que participam da cascata geradora de $PGF2\alpha$, sendo estas dependentes de cálcio, assim especificamente a PKC e PLA2.

2.6 CARACTERÍSTICAS DAS PROTEÍNAS PARTICIPANTES DA CASCATA GERADORA DE $PGF2\alpha$

2.6.1 Proteína Quinase C (PKC)

A PKC foi identificada como sendo uma proteína quinase dependente de cálcio e fosfolípido. Nos mamíferos, foram reconhecidos 11 isotipos de PKC que foram classificados em três grupos de acordo com sua estrutura e característica de ativação. O primeiro grupo é composto pelas “PKCs convencionais” ($PKC\alpha$, $PKC\beta I$, $PKC\beta II$ e $PKC\gamma$) as quais são dependentes de cálcio e ativadas pela fosfatidilserina ou diacilglicerol (DAG). O segundo grupo é composto pelas “Novas PKCs” ($PKC\sigma$, $PKC\delta$, $PKC\epsilon$, $PKC\eta$ e $PKC\theta$) as quais são independentes de cálcio, mas também reguladas pela fosfatidilserina ou DAG. O terceiro grupo é composto pelas “PKCs atípicas” que são independentes de

cálcio e não necessitam de fosfatidilserina ou DAG para sua ativação (MACKAY; TWELVES, 2007).

O domínio regulatório da PKC possui dois módulos conservados, o domínio C1 e C2. Ao contrário das “PKCs convencionais”, o domínio C2 das “Novas PKCs” não possui aminoácidos para a ligação com cálcio; e as “PKCs atípicas” não possuem o domínio C2 completo e apenas um anel rico de cisteína no domínio C1 (NISHIZUKA, 1992; NEWTON, 1995; SCHENK; SNAAR-JAGALSKA, 1999; SHIRAI; SAITO, 2002).

A PKC é uma das três principais quinases serina-treonina, e está relacionada com eventos de transdução de sinais, respondendo a estímulos hormonais característicos, neuronais e de fatores de crescimento. Sua ação ocorre catalisando a transferência de um grupo fosfato do ATP (adenosina trifosfato) a diversas proteínas substrato. A PKC também sofre fosforilações antes de ser ativada, que acontece durante sua translocação do citosol para a membrana da célula. Sua ativação e translocação para a membrana plasmática acontecem em resposta ao aumento transitório do DAG ou devido a exposição a agentes exógenos, conhecidos como forbol-ésteres (GRIFFIN et al., 1992; ADAMS, 2001; IBRAHIMI et al., 2004).

2.6.2 Fosfolipase A2 (PLA2)

As fosfolipases compõem uma classe de proteínas denominadas de acordo com o sítio de clivagem sobre o qual atuam, podendo ser classificadas como do tipo A1, A2, B, C e D (MACÊDO, 2011).

As fosfolipases A2 (PLA2s) fazem parte de uma grande família de proteínas cujas funções enzimáticas são semelhantes e que apresentam uma considerável homologia em relação à sequência de aminoácidos. As PLA2s são enzimas que catalisam a hidrólise específica da ligação 2-acil-éster na posição sn-2 de fosfolipídeos, causando a liberação de ácidos graxos e lisofosfolipídeos, como o ácido araquidônico e ácido lisofosfatídico, respectivamente (ARNI; WARD, 1996; KINI; EVANS, 1989; SETÚBAL et al., 2013). Os ácidos graxos liberados são precursores de lipídios biotivos e potenciais mediadores da inflamação, dor e ativação plaquetária, tais como os eicosanóides prostaglandinas, tromboxanas, prostaciclina e leucotrienos (DENNIS, 1997). Os lisofosfolipídeos atuam no remodelamento dos fosfolipídios de membrana e no processo de sinalização celular, participando também como precursores de mediadores lipídicos

relacionados a proliferação, sobrevivência e migração celular (SCHALOSKE; DENNIS, 2006; SIX; DENNIS, 2000).

Schaloske e Dennis (2006) propuseram a atual classificação das PLA2s baseando-se em sua origem, mecanismo catalítico e suas características funcionais e estruturais. Tal designação utiliza algarismos romanos e letras arábicas pré-estabelecidas. Sendo assim, a superfamília das PLA2s pode ser dividida em 15 grupos (GI-GXV) e seus subgrupos, e compreende cinco tipos distintos de enzimas, sendo elas: PLA2s citosólicas (cPLA2s), PLA2s independentes de Ca^{2+} (iPLA2s), acetilhidrolases de fatores ativadores de plaquetas (Platelet-activating factor acetylhydrolase – PAF-AH), PLA2s lisossomais e PLA2s secretadas (sPLA2s).

As cPLA2s são proteínas citosólicas grandes, com massa molecular que varia entre 61 e 114 kDa, sítio catalítico apresentando resíduos de serina e aspartato, e atuam hidrolisando preferencialmente fosfolipídios contendo ácido araquidônico na posição sn-2. Ainda que não dependam de Ca^{2+} para sua catálise, as cPLA2s necessitam deste íon para se translocarem para membranas intracelulares através do domínio C2 (SCHALOSKE; DENNIS, 2006). A cPLA2 é a principal enzima que inicia o metabolismo do ácido araquidônico (AA). Sua ação consiste em clivar o AA dos fosfolipídios de membrana, sendo tal função essencial para o desempenho das atividades reprodutivas, uma vez que esta é a enzima de maior importância em respostas originadas por estímulos celulares e que levam a síntese de prostaglandinas (MURAKAMI; KUDO, 2002).

2.6.3 Prostaglandina sintetase 2 (PTGS2) ou Cicloxigenase 2 (COX-2)

A cicloxigenase (COX), também conhecida como prostaglandina sintetase ou prostaglandina endoperóxido sintetase, em 1972, foi identificada como sendo a principal enzima responsável por converter o AA em prostaglandina H₂ - PGH₂ (SMITH; LANDS, 1972). A mesma foi purificada em 1976 a partir de vesículas seminais de ovelhas (HEMLER; LANDS, 1976; MIYAMOTO et al., 1976).

Ainda que a velocidade de síntese de PGH₂ dependa primeiramente da disponibilidade de AA livre, a cicloxigenase é considerada como enzima limitante da velocidade na via de biossíntese de prostaglandinas e tromboxanos a partir do AA. A cicloxigenase é uma enzima bifuncional que possui duas atividades enzimáticas que ocorrem em dois sítios catalíticos diferentes (VANE et al., 1998; SIMMONS et al., 2004);

a “atividade de cicloxigenase” que catalisa a oxidação e ciclização do AA em hidroperóxido prostaglandina G₂ (PGG₂); e a “atividade de peroxidase” que catalisa a peroxidação do PGG₂ à hidroxiperóxido prostaglandina H₂ (PGH₂). A PGH₂ é quimicamente instável e é rapidamente convertida pela ação de sintases específicas em diversos tipos de prostaglandinas e tromboxanos, como a prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaglandina F₂α (PGF₂α), prostaglandina D₂ (PGD₂), prostaglandina I₂ (PGI₂) e o tromboxano A₂ - TXA₂ (GUPTA; DUBOIS, 2001).

A COX-2 pode ser estimulada na presença de citocinas como a interleucina 1 e 2 e TNF, ésteres do forbol, fatores de crescimento e endotoxinas, sendo expressa principalmente em células envolvidas no processo inflamatório, tais como macrófagos, monócitos e sinoviócitos. A expressão da COX-2 pode ser bloqueada por glicocorticóides, interleucina-4, interleucina-13 e interleucina-10, enquanto que a prostaglandina E₂ (PGE₂) promove a regulação (up-regulation) de sua expressão (KUJUBU et al., 1991; XIE et al., 1991; FITZGERALD et al., 2001; MEADE et al., 1993; MORISSET et al., 1998).

2.6.4 Aldo-ceto redutases – AKR1B1 e AKR1C4

As Aldo-ceto redutases fazem parte de uma superfamília de enzimas que compartilham características estruturais e funcionais, e possuem mais de 114 proteínas. Com o rápido crescimento desta superfamília, tornou-se necessário estabelecer uma nomenclatura sistemática baseando-se na semelhança entre as sequências de aminoácidos (JEZ et al., 1997; LAMBERT-LAMGLAIS et al., 2009), a qual é periodicamente atualizada (JEZ; PENNING, 2001).

Estabelecer a habilidade e a função destas enzimas no metabolismo do carbonil são importantes, porém há uma dificuldade devido à grande quantidade de substratos presentes na maioria das AKRs e na presença de mais de um tipo de AKR em cada célula. Embora exista uma considerável sobreposição funcional, a estrutura tridimensional das AKRs diferencia-se das proteínas que fazem parte da família das desidrogenases/redutases de cadeia curta (JORNVALL et al., 1995).

As enzimas AKR1B1, AKR1C3 e AKR1C4 fazem parte da família aldo-ceto redutase e participam da via de síntese de prostaglandina, convertendo a PGH₂ à PGF₂α (ACTIVITY et al., 1998). Nos mamíferos, a síntese de PGF₂α pelo útero está relacionada a regulação do ciclo ovariano (MADORE et al., 2003), e sobre sua atuação no CL,

levando ao término o ciclo estral (MCCRACKEN et al., 1999). Além de ser encontrada na placenta, a enzima AKR1B1 é altamente expressa no endométrio durante a luteólise, indicando que a expressão desse gene pode estar correlacionada a falhas na concepção (MADORE et al., 2003).

3. HIPÓTESE

A hipótese, representada na Figura 2, é que o 17 β -E2 no D15 (D0 = dia do estro) modula, em novilhas de corte, a expressão gênica de moléculas envolvidas na síntese de PGF2 α no endométrio bovino, promovendo aumento na concentração de PGFM e na expressão de componentes da cascata da síntese PGF2 α , com um aumento da abundância 1,5 horas após a aplicação de 17 β -E2 e com o máximo de abundância 3 horas após a aplicação do mesmo, em relação as proteínas quinase C (PKC α e PKC β) e fosfolipase A2 (PLA2G4), todas dependentes de cálcio para a ativação.

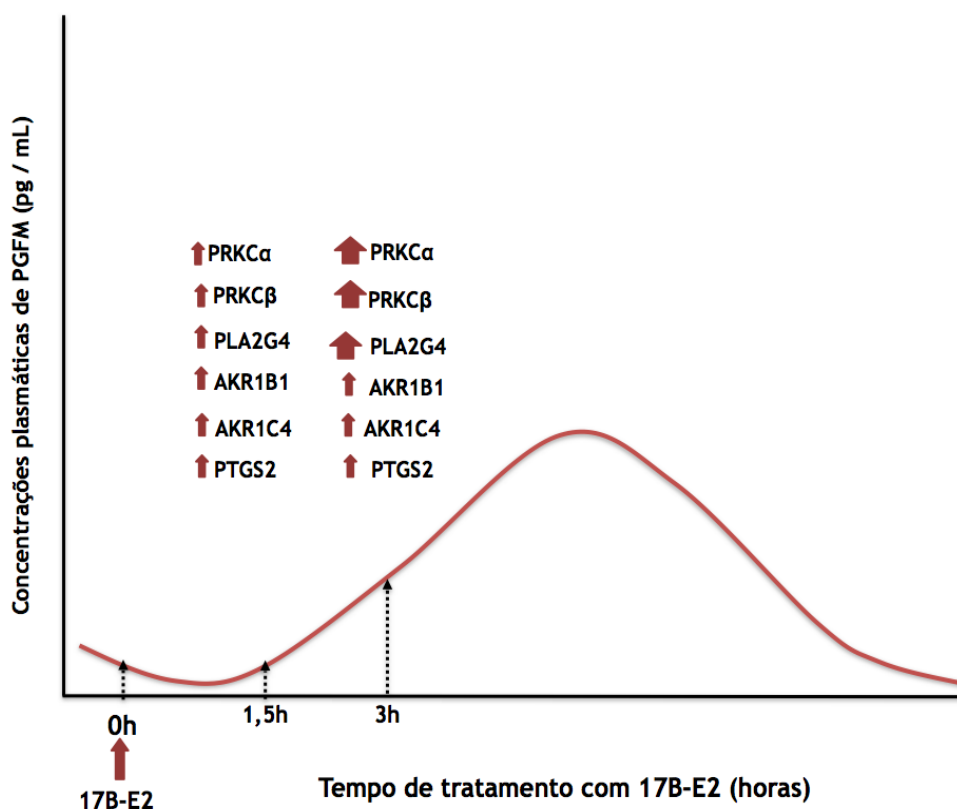


Figura 2. **Modelo Hipotético.** Fêmeas bovinas tratadas com 1 mg de 17 β -estradiol, via intramuscular, no D15 (D0 = dia do estro) apresentam aumento nas concentrações de PGFM e na expressão de componentes da cascata da síntese PGF2 α , com um aumento da abundância 1,5

horas após a aplicação de 17 β -estradiol e com o máximo de abundância 3 horas após a aplicação de 17 β -estradiol, especificamente as proteínas quinase C (PKC α , PKC β e PKC γ) e fosfolipase A2 (PLA2G4), todas dependentes de cálcio para a ativação.

4. OBJETIVOS

Objetivou-se avaliar os efeitos da administração IM de 17 β -E2, em vacas de corte no dia 15 do ciclo estral, na expressão gênica das enzimas PKC α , PKC β , PLA2 G4, AKR1B1, AKR1C4 e PTGS2 (COX 2), todas integrantes da cascata geradora de PGF2 α , através das técnicas de qPCR. Para tanto, objetivou-se avaliar: (1) a concentração plasmática de 13,14-dihydro-15-keto-PGF2 α (PGFM); (2) concentração plasmática de P4; (3) tamanho e perfusão sanguínea do corpo lúteo e (4) abundância dos transcritos diretamente relacionados a síntese de PGF2 α (PKC α , PKC β , PLA2G4, AKR1B1, AKR1C4 e PTGS2).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 LOCAL DO EXPERIMENTO

O manejo dos animais, a coleta dos materiais biológicos e as análises pela técnica de qPCR foram realizados na Universidade de São Paulo (USP), na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal, Pirassununga/SP, Brasil. As mensurações de PGFM e P4 por ELISA foram realizadas na Texas A & M University, College Station, Texas, EUA; com a colaboração do Prof. Dr. Ky Pohler. A análise estatística dos dados foi realizada com a colaboração da University of Florida, Gainesville, Flórida, EUA, pelo Pós-doutorando Thiago Martins.

5.2 ANIMAIS

Foram utilizadas inicialmente 50 novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*), com idade média de 24 meses, não gestantes, não lactantes, cíclicas e com escore de condição corporal entre 3 e 3,5; utilizando uma escala de 1 a 5 (WILDMAN et al., 1982). Os animais foram alojados em piquetes contendo pastagem de braquiária (*Brachiaria sp.*), onde receberam suplementação mineral e água *ad libitum*. A coleta do material biológico foi realizada em novembro de 2018 e novembro de 2019. As práticas envolvendo os

animais foram aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Dracena/SP (Certificado nº 31/2018).

5.3 SINCRONIZAÇÃO DOS ESTROS

Conforme ilustrado na Figura 3, as fêmeas foram submetidas à implantação de um dispositivo intravaginal mono dose contendo progesterona (0,558g P4; Cronipress®, Biogénesis Bagó), momento em que também receberam uma injeção de benzoato de estradiol (1,0 mg; IM; Sincrodiol®, Ouro Fino Saúde Animal) e D-cloprostenol (0,075 mg; Croniben®, Biogénesis Bagó), ambos via intramuscular (IM). Após 6 dias da implantação do dispositivo, aplicou-se D-cloprostenol (0,075 mg; Croniben®, Biogénesis Bagó), via IM. Após 48 horas, o dispositivo intravaginal foi removido e aplicou-se novamente D-cloprostenol (0,150 mg; Croniben®, Biogénesis Bagó), via IM. Nesta ocasião, foi inserido um adesivo na base da cauda com a finalidade de identificação do estro (Boviflag Red Estrus Detector - ABS Pecplan).

5.4 OBSERVAÇÕES DE ESTROS

Conforme ilustrado na Figura 3, após 24 horas da última injeção de D-cloprostenol, iniciou-se as observações de estro, que foram realizadas 2 vezes ao dia (07:30 e 16:30 h), a cada 12 horas, por 40 minutos, durante 4 dias consecutivos. As vacas observadas aceitando monta ou com aproximadamente 50% ou mais do revestimento de prata removido do adesivo Boviflag foram consideradas em estro e este dia foi considerado dia 0. As fêmeas que apresentaram estro, foram submetidas a exames ultrassonográficos para a identificação da ovulação. Participaram deste estudo as fêmeas que manifestaram estro e que posteriormente ovularam. Das 50 novilhas sincronizadas, apenas 46 tiveram o estro detectado e ovularam.

mensuração dos folículos com a finalidade de identificar a presença do folículo dominante (FD com diâmetro > 7,5mm) e determinar a ovulação, através do desaparecimento do FD. Entre o D14 e D23 (D0 = dia do estro), foram realizadas mensurações da área e do fluxo sanguíneo do CL para determinar a % de animais com corpo lúteo ativo. Os corpos lúteos cavitários tiveram a área da cavidade subtraída da área total do CL (KASTELIC, 1990). A luteólise estrutural foi definida pela avaliação das variáveis de área e fluxo sanguíneo do CL. O fluxo sanguíneo do CL foi mensurado pela % de pontos coloridos em relação à área do CL (GINTHER et al., 2007). Considerou-se luteólise estrutural e presença de CLs inativos, quando o CL atingiu valor de área inferior a 2 cm² e fluxo sanguíneo do CL menor ou igual a 25% (PUGLIESI et al., 2014). A luteólise funcional foi determinada no dia em que as concentrações de P4 atingiram valores inferiores a 50% da média da concentração de P4 no dia 14 e 15 após o estro. As análises pertinentes a luteólise, falência estrutural e funcional do CL, foram realizadas nos diferentes dias do ciclo estral, tendo como referência inicial o dia do estro (D0). Para as análises de variáveis contínuas como área, fluxo sanguíneo e concentração de P4, levou-se em consideração o dia do estro (D0).

5.6 TRATAMENTO *IN VIVO*

Conforme representado na Figura 3, no dia do estro (D0) as novilhas (N=46) foram divididas aleatoriamente e equitativamente em dois grupos experimentais: Grupo Controle (C) ou Estradiol (E). Os tratamentos foram realizados no dia 15 após o estro (D15). O momento do tratamento foi definido como o tempo zero hora (0h). Os tempos 1,5h e 3h correspondem ao período após o tratamento. Os animais do grupo estradiol (N=24) receberam por via intramuscular, 1mg de 17β-E2 diluído em 2 mL de óleo de gergelim puro (*Sesamum Indicus L. – Pedaliaceae*, GRAM OILS, Cat. No. ODGNG1), conforme estabelecido por Pugliesi et al. (2011). Concomitantemente, os animais do grupo controle (N=22) receberam, via intramuscular, uma injeção de apenas óleo de gergelim.

5.7 COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE

Para mensuração da concentração plasmática de P4 e caracterização da luteólise funcional, foram realizadas coletas de sangue diárias de cada animal, do D14 ao D23 (Figura 3). Para a quantificação plasmática de PGFM, foram realizadas coletas seriadas

de sangue, no dia 15 após o estro, dia em que os animais receberam os tratamentos, a cada hora do tempo 0 ao tempo 7 horas depois da aplicação do tratamento (Figura 4). Foram escolhidos 5 tempos de coleta para caracterização da liberação de PGFM por ensaio imunoenzimático (ELISA). Os tempos escolhidos para análise foram: 0h, 3h, 4h, 6h e 7h. Todas as amostras de sangue foram obtidas através de punção da veia jugular, sendo coletados aproximadamente 10 mL/animal em tubos contendo heparina. Imediatamente após a coleta, as amostras foram acondicionadas a 4°C e enviadas ao laboratório para centrifugação a 1500g durante 30 minutos, a 4°C. Após a centrifugação o plasma foi imediatamente alíquotado em microtubos e armazenados a -20°C até o momento das análises de quantificação de P4 e PGFM.

5.8 BIÓPSIA UTERINA PARA OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS ENDOMETRIAIS

Para obtenção dos fragmentos endometriais, os animais foram submetidos a anestesia epidural utilizando 0,06g de cloridrato de lidocaína imediatamente antes do procedimento de biópsia (Lidovet, Bravet, Rio de Janeiro, Brasil). As biópsias endometriais foram realizadas utilizando uma pinça Forceps, por via transcervical (PUGLIESI et al., 2014). Os fragmentos foram obtidos do terço médio do corno uterino ipsilateral ao ovário contendo o CL, e apresentavam aproximadamente 4 mm x 4 mm de dimensão. Conforme representado na Figura 4, as coletas foram realizadas 1,5 ou 3 horas após a administração dos tratamentos, onde cada novilha foi submetida a coleta de um fragmento endometrial em apenas um dos momentos (1,5 h ou 3 h após o tratamento). Assim, as novilhas do Grupo Estradiol (N=24) foram submetidas à biópsia na Hora 1,5 (E 1,5h; N=10) ou na Hora 3 (E 3h; N=11). As novilhas do Grupo Controle (N=22) foram submetidas à biópsia na Hora 1,5 (C 1,5h; N=8) ou na Hora 3 (C 3h; N=8). Os tecidos coletados foram então acondicionados em criotubos e armazenados inicialmente em nitrogênio líquido (-196C°) e posteriormente a -80C° até o momento das análises de expressão gênica e proteica.

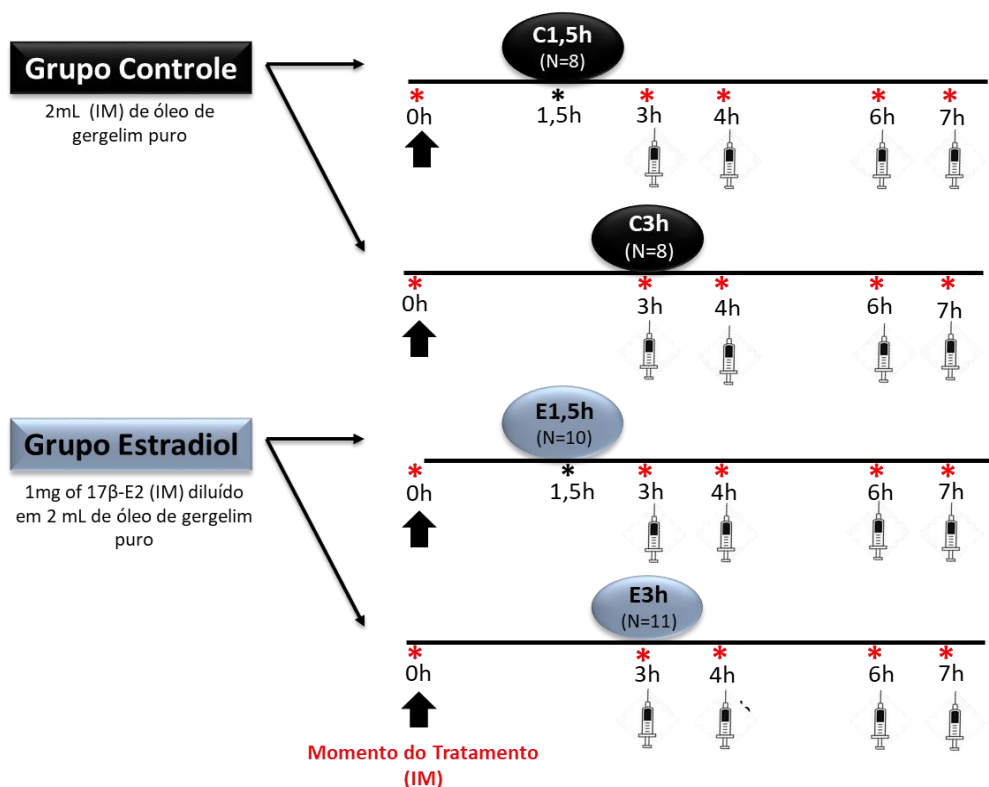


Figura 4. Detalhamento do procedimento experimental de coleta de sangue e biópsia endometrial. O momento zero hora foi definido como o momento em que os animais receberam os tratamentos (Estradiol e Controle). O Grupo Controle recebeu 2 mL (IM) de óleo de gergelim puro. O Grupo Estradiol recebeu 1 mg de 17β -estradiol (IM) diluído em 2 mL de óleo de gergelim puro. Os animais dos Grupos Estradiol e Placebo foram novamente divididos em subgrupos para coleta de biópsia endometrial nos tempos 1,5 e 3 horas pós tratamento. Cada animal foi submetido a coleta de fragmento endometrial em apenas um momento. Amostras de sangue seriadas foram coletadas em todos os animais, simultaneamente, nos momentos zero, 3, 4, 6 e 7 horas (*).

5.9 MENSURAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE P4 POR RADIOIMUNOENSAIO

A concentração sérica de P4 foi quantificada pela técnica de Radioimunoensaio (RIA) utilizando um kit RIA de anticorpo duplo (MP Biomedicals, Costa Mesa, CA), conforme validado por Pohler et al. (2014). A concentração de P4 foi determinada utilizando alíquotas de 100 μ L de soro em triplicata utilizando RIA de anticorpo duplo, de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante (MP Biomedicals, Costa Mesa, CA, Cat. No. 07-170105). Foram adicionados aos tubos de ensaio em triplicata a concentração padrão de P4 (0,005, 0,01, 0,02, 0,05, 1,0, 2,5, e 5 ng/tubo – dados fornecidos pelo fabricante) e volumes crescentes de soro de P4 (25, 40, 60 e 100 μ L), e o volume total foi

ajustado para 100 µL/tubo com solução tampão constituída por 0,1% de gelatina, 0,01 M EDTA, 0,9% NaCl, 0,01 M PO₄, 0,01% azida de sódio e 0,05%, Tween-20, pH = 7,1 (PABET). Anti-soro primário anti-P4 (200 µL; MpBio, Cat. No. 07-170105) foi então adicionado a cada tubo, com exceção dos tubos de ligação total e inespecífica. Logo após, 100 µL de 125I-progesterona (MpBio, Cat. No. 07-170105) foram adicionados a todos os tubos e incubados a 37 ° C por 1 h. O complexo antígeno-anticorpo foi precipitado após uma incubação de 15 min, 22 ° C com 100 µL de um segundo anti-soro, por centrifugação a 3.750 g por 30 min a 4 ° C, e o sobrenadante foi descartado por aspiração. Os tubos de ensaio contendo o complexo antígeno-anticorpo primário precipitado foram contados durante 1 min em um contador gama LKB1277 (LKB Wallac, Turku, Finlândia). Os padrões e as alíquotas combinadas de soro foram lineares (transformação log / logit; R² > 0,99) e paralelos sobre uma massa de 0,005 a 5 ng/tubo e um volume sérico de 25 a 100 µL, respectivamente. A ligação específica total foi em média de 40% e a concentração mínima detectável do ensaio foi de 0,005 ng/tubo. As variações intraensaio foram de 4,7% e as variações inter-ensaios foram de 10%.

5.10 MENSURAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE PGFM POR ELISA

A quantificação de PGFM foi realizada nas amostras de plasma segundo a metodologia proposta por Ginther et al. (2010). Os padrões foram preparados utilizando-se 1 mg PGFM (PGFM Sigma-Aldrich Chemical Co.; MO, Cat. No. 4143), diluída em 200µl de dioxano (Fisher Cientific Fair Law, NJ), seguido pela adição de 5 µL de tributilamina (Sigma Aldrich) e 2,6 µL de cloroformato de isobutil (Sigma Aldrich) e prosseguido pela incubação a 15°C por 1h. A horseradish peroxidase (HRP; 15mg; Tipo 1; Sigma Aldrich) foi preparada por uma solução com proporção de 1:1 de dioxano e 0,5% de bicarbonato de sódio para a obtenção de um volume final de 700µL. Os 200µL de solução contendo PGFM foram adicionados vagarosamente em 700µL da solução de HRP e incubados por 2 horas a 4°C para a preparação da solução PGFM-HRP. Plasma de bovino tratado com banamine, isento de PGFM, foi utilizado como matriz para diluição da curva padrão, onde utilizou-se a concentração de 19,5 a 10000 pg/mL de PGFM. Todas as amostras foram submetidas à extração. As amostras tiveram o pH ajustado para 3,0 e utilizou-se 2 mL de éter para extração, seguido por agitação em vórtex durante 1 minuto e evaporação durante a noite. Após a evaporação do éter, 250 µL de tampão foram

adicionados a cada tubo, seguido por agitação em vórtex por 2 minutos e incubação por 1 hora em temperatura ambiente. O tampão carbonato de sódio (0,5 M; pH 9,6) foi utilizado para a diluição do anticorpo secundário (2 µg/mL). A placa contendo anticorpo secundário permaneceu em incubação durante a noite. No dia seguinte foi preparado o tampão para o ensaio de ELISA, contendo: MOPS (0,04 M), cloreto de sódio (0,12 M), EDTA (0,01 M), Tween 20 (0,05%), digluconato de clorexidina (0,005%) em pH 7,4 e gelatina (0,1%). Todos os poços da placa foram lavados com tampão de lavagem por três vezes. Diluiu-se o anticorpo primário (cedido gentilmente pelo Prof. Dr. W. W. Thatcher, University of Florida) em tampão de ensaio de ELISA (1:2000) que foi colocado em todos os poços, exceto non specific binding (NSB). A placa permaneceu sob incubação por 1,5 horas em temperatura ambiente.

Após a incubação, lavou-se novamente a placa por 3 vezes com tampão de lavagem. Em seguida foram adicionados 100µL de amostras, controle e padrão e realizou-se incubação por 30 minutos. Em seguida, 50µL de PGFM-HRP foram adicionados em cada poço da placa que foi mantida em temperatura ambiente e incubada por 1 hora. A placa foi lavada 4 vezes, posteriormente adicionou-se 125 µL de substrato colorimétrico (TMB) que permaneceu em incubação, na estufa, por 20 minutos a 37 °C. A reação da TMB determina a cor azul. Foi utilizado 50µL de solução contendo 0,5 M de ácido sulfúrico para cessar a reação. A densidade óptica foi quantificada por ondas com 450 e 600 nm de comprimento. A sensibilidade do ensaio foi de 12,04 pg/mL e as variações intraensaio foram de 9,24% e as variações inter-ensaios foram de 14,32%.

5.11 AVALIAÇÃO DE TRANSCRITOS POR qPCR

A abundância de transcritos de nove genes (Tabela 1) foi avaliada nos grupos E 1,5h (N=10); E 3h (N=11); C 1,5h (N=8) e C 3h (N=8).

Extração de RNA. Para a extração de RNA, o tecido endometrial obtido pelas biópsias uterinas foi previamente macerado. Para isso, as biópsias foram submersas em nitrogênio líquido e maceradas segundo a metodologia descrita por Oliveira et al. (2015). Cada fragmento macerado possuía cerca de 50 a 100 mg. A extração do RNA foi realizada através da maceração dos fragmentos endometriais obtidos por meio de biópsia uterina. Para isso, os fragmentos endometriais foram retirados dos criotubos de armazenamento e colocados em placa de petri (60x15 mm). Com o auxílio de agulha e lâmina de bisturi foi realizada a maceração do tecido. Cada fragmento macerado possuía cerca de 50 a 100

mg. Em seguida, para a extração de RNA foi utilizado o reagente Trizol (TRIzol® LS Reagent, Invitrogen™, Cat. No. 10296010), seguindo o protocolo de extração descrito pelo fabricante.

Tratamento com DNase. Ao término da extração, as amostras foram tratadas com enzima DNase (DNase I, Amplification Grade, Invitrogen™, Cat. No. 18069-015), também de acordo com as especificações do fabricante. As amostras de RNA foram diluídas para obtenção da concentração de 100ng/μL de RNA total, em um volume de 8μL. A seguir, foi adicionado 1μL de 10X DNase I Reaction Buffer e 1μL de DNase I, Amp Grade (Deoxyribonuclease I, Amplification Grade; Invitrogen™, Cat. No. 18068-015), alcançando o volume final de 10μL de amostra. As amostras de RNA foram tratadas com DNase (Cat. No. 12185, PureLink™ DNase, Invitrogen, Carlsbad, U.S.A.) durante o procedimento de extração, conforme indicações do fabricante. O referido kit possibilitou a separação de RNA, DNA e proteína.

Síntese de cDNA. Para a síntese de cDNA, utilizou-se ‘High Capacity cDNA Reverse Transcrição Transcription kit’ (Applied Biosystems™, Cat. No 4368814) para o preparo de 10 μL de solução Master Mix de Transcrição Reversa (RT) para cada amostra. Foram adicionados 10 μL de Master Mix RT junto à 10 μL de solução de cada amostra contendo RNA em placa livre de nucleases (MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems™, Cat. No. 4346907), que em seguida foi colocada em termociclador com gradiente (Step One Plus™ Real Time System, Applied Biosystems®, Life Technologies Corporation, Cat. No. 4376600) para RT. Todas as amostras contendo Master Mix RT foram submetidas aos seguintes ciclos de temperatura: 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 120 minutos, 85°C durante 5 minutos e 4°C infinito. Em seguida, as amostras foram acondicionadas a -20°C

Preparação dos primers. Os primers utilizados foram obtidos na literatura científica e os que não puderam ser encontrados em literatura, foram desenhados e validados de acordo com Oliveira et al., 2017 (Tabela 1). Neste estudo foram utilizadas as sequências de primers descritos na Tabela 2. A diluição dos primers foi realizada utilizando-se água DEPC (livre de nucleases) para a obtenção da solução de trabalho. Para isso, foram adicionados 180 μL de água DEPC a 20 μL de primer da solução de estoque (100 μM) para obtenção de um volume total de 200 μL de solução de trabalho (10 μM). Ambas as soluções foram armazenadas a -20°C. Cada poço da placa foi composto por 2 μL de cDNA diluídas na concentração de 1:80. A cada amostra foi adicionado 8 μL de solução Master Mix (PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix,

Applied Biosystems™, Cat. No. A25742) contendo as sequências *reverse* e *forward* de cada primer e água DEPC; chegando a um volume total em cada poço de 10 µL. Para o controle negativo, foi substituída a solução de cDNA diluída por 2 µL de água DEPC.

Tabela 1. Sigla da proteína, nome da proteína, sequência dos primers forward (F) e reverse (R), identificação representativa (ID), números de pares de bases (PB) e eficiência da curva para os genes testados

Símbolo da proteína	Nome da proteína	Sequência de primers Forward (F) e Reverse (R)	Identificação representativa (ID)	Pares de bases (PB)	Eficiência da curva padrão
PKC α	A Proteína quinase C alfaG	PRKC α _F TGCAAAGGGCTGATGACCAAGCA	NM_174435.1	110	97.2
		PRKC α _R AGCTTCTCCCAGTCGATCCTCCG			
PKC β	A Proteína quinase C BetaG	PRKC β _F GGGAGAGGAGAGCACCGTGCG	NM_174587.1	151	104.4
		PRKC β _R CTTCCCGAAGCCCCAGATGAAGTC			
PLA2G4	A Fosfolipase A2, grupo IV	PLA2G4_F GATGCCGCTGTGCGCAGATCCTG	NM_001075864.1	96	105.8
		PLA2G4_R TGTGAGGCCACTGTCCACCACAT			
AKR1B1	B Aldo-ceto redutase família 1, membro B1	AKR1B1_F ATACAAGCCGGCGGTTAAC	NM_001012519	188	93.9
		AKR1B1_R TGTCTGCAATCGCTTTGATC			
AKR1C4	C Aldo-ceto redutase family1, member C4	AKR1C4_F TCCTGTCTGGGATTTGGAACCTT	NM_181027.2	166	102.2
		AKR1C4_R ATCGGCAATCTTGCTTCGAATGG C			
PTGS2/COX 2	C Prostaglandina endoperóxido sintase 2	PTGS2_F CCAGAGCTCTTCCTCCTGTG	NM_174445.2	161	100,8
		PTGS2_R GGCAAAGAATGCAAACATCA			
PPIA	D Peptidilpropil isomerase A (ciclofilina A)	PPIA_F GCCATGGAGCGCTTTGG	NM_178320.2	63	97.9
		PPIA_R CCACAGTCAGCAATGGTGATCT			
RPS18	E Ribosomal Protein S18 ^E	RPS18_F TGGAGAGTATTGCGCCTTCTC	AY_786141.1	79	97.9
		RPS18_R CACAAGTTCCACCACACTATTGG			
GAPDH	E Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	GAPDH_F GCCATCAATGACCCCTTCAT	NM_001034034.2	69	99.9
		GAPDH_R TGCCGTGGGTGGAATCA			

Adaptado de OLIVEIRA, M. L., 2017. Letras sobrescritas no nome da proteína: PrimerQuest; Ulbrich et al., 2009; Oliveira et al., 2015; Bettrrgowda et al., 2006; ^E Sá Filho et al., 2017.

Reação em cadeira da Polimerase em tempo real (qPCR). Para a reação de qPCR foi utilizado o termociclador Step One Plus™ Real Time System (Applied Biosystems®, Life Technologies Corporation, Cat. No. 4376600), com a programação dos seguintes ciclos de temperatura: 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos e 60°C durante 1 minuto. Logo após a amplificação, a placa permaneceu a 95°C durante 15 minutos, 60°C durante 1 minuto e novamente 95°C durante 15 minutos, para obtenção da curva de dissociação (“Curva Melt”).

5. 12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o SAS (versão 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) considerando a novilha como unidade experimental e um delineamento inteiramente casualizado.

As variáveis dependentes contínuas (área e fluxo do CL, concentrações de PGFM e P4) foram analisadas como medidas repetidas no tempo utilizando o PROC MIXED e o comando REPEATED. Considerou-se no modelo como efeito fixo as variáveis: tratamento (administração de Placebo ou 17β-estradiol), dia e a interação entre tratamento e dia. O efeito aleatório de novilha dentro de tratamento foi utilizado como erro termo para se determinar o efeito da administração do 17β-estradiol. A estrutura de variância-covariância empregada em cada modelo foi selecionada de acordo com menor valor do critério de informação corrigido de Akaike (AICC). Para as variáveis área e fluxo do CL, utilizou-se as estruturas ARMA(1,1) e ARH(1), respectivamente. Para as variáveis PGFM e P4, foram utilizadas as estruturas TOEPH e ARH(1), respectivamente. A premissa de normalidade do resíduo foi checada pelos gráficos de diagnóstico do PROC MIXED e pelo teste Shapiro-Wilk do PROC UNIVARIATE utilizando o resíduo estudentizado (output do PROC MIXED). A premissa foi atendida, quando as variáveis área CL e P4 foram transformadas utilizando logaritmo natural, e as variáveis PGFM e fluxo foram transformadas utilizando raiz quadrada.

A variável abundância de transcrito (genes: PRKCA, PRKCB, AKR1B1, AKR1C4, PLA2G4A e PTGS2) foi analisada utilizando o PROC MIXED. Foi considerado, um arranjo fatorial 2 x 2 para essas análises. Os efeitos fixos: administração de Placebo ou 17β-estradiol de transcrito (genes: PRKCA, PRKCB, AKR1B1, AKR1C4, PLA2G4A, PTGS2), foram considerados nos modelos. As premissas de normalidade do resíduo (Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias (teste de Welch) foram checadas.

Quando não atendidas, as variâncias residuais eram primeiramente modeladas utilizando a opção GROUP=Tratamento do comando REPEATED. Logo após, procedia-se a checagem do AICC, quanto menor melhor, e das premissas. Persistindo o problema, os dados eram transformados utilizando Log, raiz quadrada e inversa, sendo então reanalisados.

As variáveis dependentes discreta, momento da luteólise (estrutural e funcional), foram analisadas pelo PROC NPAR1WAY, pois não seguiram a distribuição de Gauss. Adicionalmente, os dados de luteólise estrutural foram selecionados para análise de distribuição do momento da luteólise. Para isso, foi feita uma análise de curva de sobrevivência utilizando PROC LIFETEST para estabelecer o efeito dos grupos placebo e estradiol sobre a incidência de luteólise entre os dias 15 e 24.

A opção Kenward-Roger de ajuste dos graus de liberdade do denominador foi incorporado em todos os modelos do PROC MIXED. Os efeitos das variáveis independentes no PROC MIXED foram determinados pelo teste F utilizando a soma de quadrados tipo III. Quando necessário, o comando SLICE foi adicionado ao procedimento, para identificar o efeito de tratamento dentro da variável, dia. Os resultados foram reportados como LSMEANS \pm EPM. Em todos os casos uma probabilidade ≤ 0.05 indicou que a diferença foi significativa e entre $0,05 > P \leq 0,10$ indicou que diferença tendeu a ser significativa.

6. RESULTADOS

6.1 MOMENTO DA LUTEÓLISE FUNCIONAL E ESTRUTURAL

Neste estudo, a hipótese testada é que a administração de 17β -E2 no D15 seria capaz de antecipar a regressão luteal, conforme ilustrado na Tabela 2.

Tabela 2. Dias da luteólise funcional e estrutural (média ± EPM) em novilhas Nelore tratadas com 17β -Estradiol (Grupo Estradiol) e não tratadas (Grupo Controle) no dia D15 após o estro.

Parâmetro avaliado	Grupo Controle	Grupo Estradiol	Valor de P
Luteólise Funcional ¹	18,21 ± 0,24 dias	17,07 ± 0,43 dias	0,006
Luteólise Estrutural ²	19,68 ± 0,42 dias	18,42 ± 0,33 dias	0,026

¹Dia do ciclo estral em que as concentrações de P4 atingiram valores inferiores a 50% da média das concentrações entre os dias 14 e 15.

²Dia do ciclo estral em que a área do CL foi menor que 2 cm² e o fluxo sanguíneo foi ≤ 25% (mensurado pela porcentagem de pontos coloridos do CL detectados pela ultrassonografia Doppler).

6.2 ÁREA DO CORPO LÚTEO (CL)

Na área do CL não houve efeito de tratamento (P = 0,062), entretanto, houve efeito de dia (P < 0,001) e interação tratamento*dia (P = 0,023). Em ambos os grupos, houve diminuição progressiva da área do CL a partir do D15. Do período compreendido de D18 ao D120, foi observado que a área do CL foi menor no Grupo Estradiol (P = 0,023), conforme ilustrado na Figura 5.

Embora neste estudo, tenham sido realizadas mensurações diárias da área e fluxo sanguíneo do CL entre o D14 ao D23, com o objetivo de determinar a % de animais com corpo lúteo ativo nos diferentes dias do ciclo estral, pouquíssimos animais possuíam CL ainda ativo no D23. Por esse motivo, não foi possível avaliar estatisticamente o D23, devido à uma inabilidade do programa estatístico em aferir os resultados com tão poucos dados.

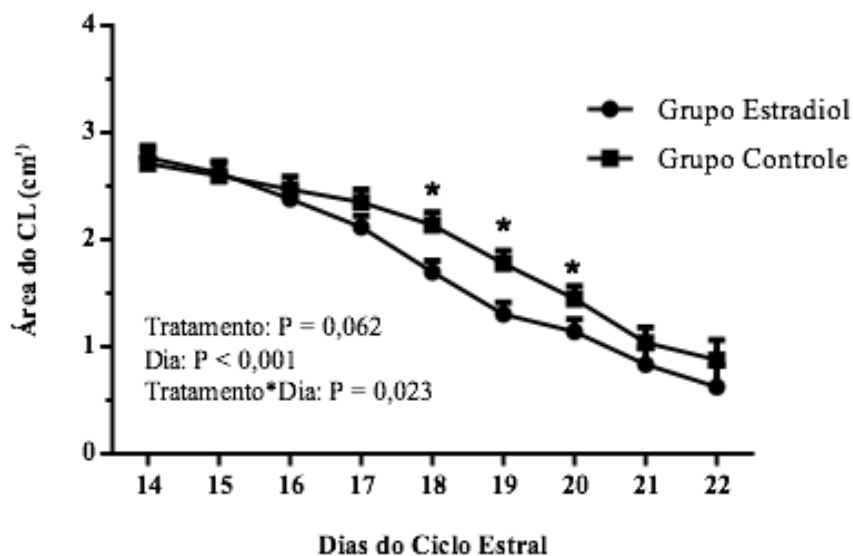


Figura 5. Variação da área do CL (cm²), determinada através de ultrassonografia modo B (média \pm EPM), identificada do D14 ao D22 (D0 = dia do estro), em novilhas Nelore tratadas com 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Controle; N = 22) ou 1 mg de 17 β -E2 diluído em 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Estradiol; N = 24) no D15.

*P \leq 0,05 diferença significativa entre as médias dos grupos

6. 3 PERFUSÃO SANGUÍNEA NO CORPO LÚTEO (CL)

Na perfusão sanguínea do CL (%) não observou-se efeito de tratamento (P = 0,1405) e interação tratamento*dia (P = 0,3286), entretanto, verificou-se efeito de dia (P < 0,001), conforme representado na Figura 6.

Embora neste estudo, tenham sido realizadas mensurações diárias da área e fluxo sanguíneo do CL entre o D14 ao D23, afim de determinar a % de animais com corpo lúteo ativo, pouquíssimos animais possuíam CL ainda ativo no D23. Por esse motivo, não foi possível avaliar estatisticamente o D23, devido à uma inabilidade do programa estatístico em aferir os resultados com tão poucos dados.

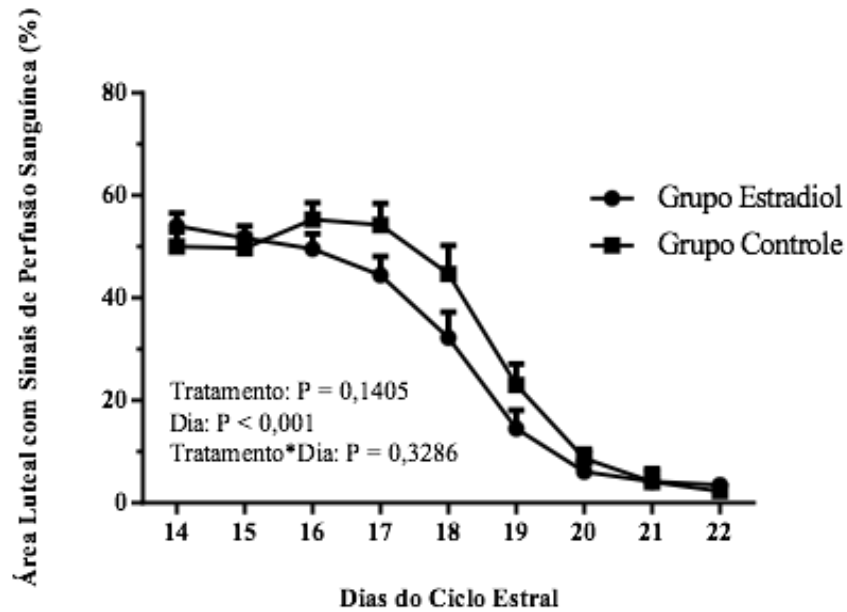


Figura 6. Variação da área luteal com perfusão sanguínea (%) determinada através de ultrassonografia Doppler (média \pm EPM), identificada do D14 ao D22 (D0 = dia do estro), em novilhas Nelore tratadas com 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Controle; N = 22) ou 1 mg de 17β -E2 diluído em 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Estradiol; N = 24) no D15.

6. 4 CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE P4

Em relação a concentração plasmática de P4 observou-se efeito de tratamento ($P = 0,045$), dia ($P < 0,001$) e interação tratamento*dia ($P = 0,019$). Como ilustrado na Figura 7, entre o D16 e D17, houve um decréscimo progressivo da concentração de P4, sendo menor no Grupo Estradiol no D16 ($4,14 \pm 0,97$ ng/mL) e no D17 ($2,84 \pm 0,79$).

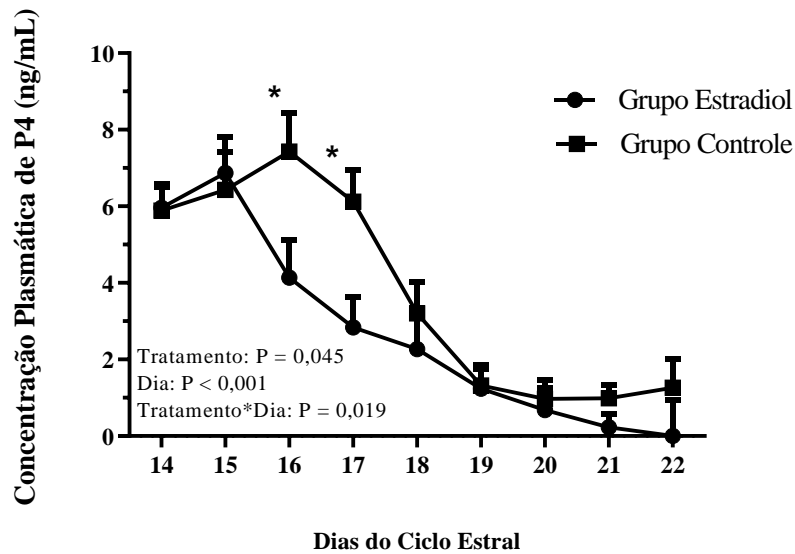


Figura 7. Concentração plasmática de progesterona (ng/mL) determinada por Radioimunoensaio (média \pm EPM), identificada do D14 ao D22 ao longo dos dias do ciclo estral, em novilhas Nelore tratadas com 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Controle; N = 14) ou 1 mg de 17 β -E2 diluído em 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Estradiol; N = 15) no D15.

*P \leq 0,01 diferença significativa entre as médias dos grupos

6.5 CURVA DE SOBREVIVÊNCIA PADRÃO EM RELAÇÃO À PORCENTAGEM (%) DE ANIMAIS COM CL ATIVO

Com base nos resultados obtidos com a área e fluxo sanguíneo do CL, foi possível estabelecer uma relação entre a porcentagem (%) de animais com CL ativo e a distribuição do dia da luteólise estrutural (P = 0,005) ao longo dos dias do ciclo estral.

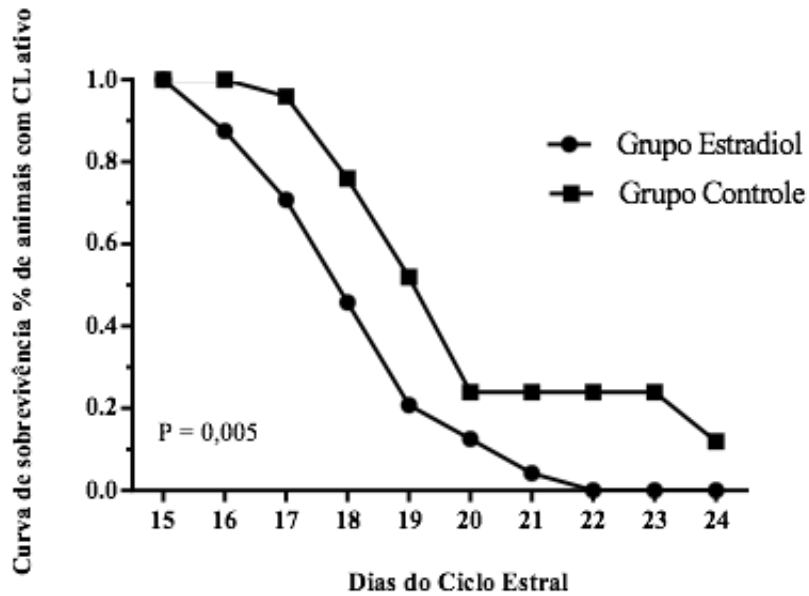


Figura 8. Porcentagem de animais com CL ativo detectado através de ultrassonografia modo Doppler, do D15 ao D24 do ciclo estral (D0 = dia do estro), em novilhas Nelore tratadas com 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Controle; N = 22) ou 1 mg de 17β -E2 diluído em 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Estradiol; N = 24) no D15.

6.6 CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE PGFM

Na concentração plasmática de PGFM, observou-se efeito de tratamento ($P = 0,0009$), dia ($P < 0,01$) e da interação tratamento*dia ($P = 0,0002$). Conforme ilustrado na Figura 9, observou-se no Grupo Estradiol maior concentração de PGFM as 6h ($225,45 \pm 16,96$ pg/mL) e 7h ($285,58 \pm 33,09$ pg/mL) após a administração do tratamento.

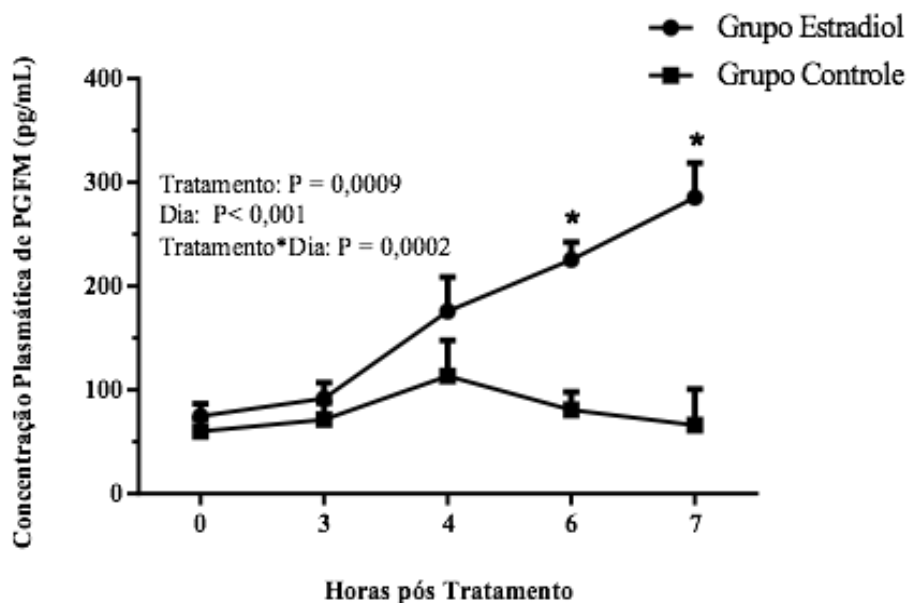


Figura 9. Concentração plasmática de PGFM (pg/mL) (Média \pm erro padrão), determinada por ELISA, as 0, 3, 4, 6 e 7 horas (Hora 0 = administração do tratamento), em novilhas Nelore tratadas com 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Controle; N = 12) ou 1 mg de 17β -E2 diluído em 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Estradiol; N = 13) no D15.

* $P \leq 0,01$ diferença significativa entre as médias dos grupos

6.7 ABUNDÂNCIA DE RNAm

Neste estudo, foi avaliado a expressão gênica de seis genes alvos para a síntese de $PGF2\alpha$ (*PKC α* , *PKC β* , *PLA2G4A*, *AKR1B1*, *AKR1C4* e *PTGS2*) e três genes endógenos (*PPIA*, *RPS18* e *GAPDH*).

Abundância relativa de transcritos para *PKC α* . Conforme ilustrado na Figura 10, não houve efeito de tratamento ($P = 0,5193$) e da interação tratamento*hora ($P = 0,792$), entretanto, observou-se efeito de hora ($P = 0,025$). Observou-se que a abundância de transcritos foi maior no tempo 3 horas comparado ao tempo 1,5 horas ($0,01 \pm 0,001$ vs $0,008 \pm 0,001$ respectivamente; $P = 0,025$).

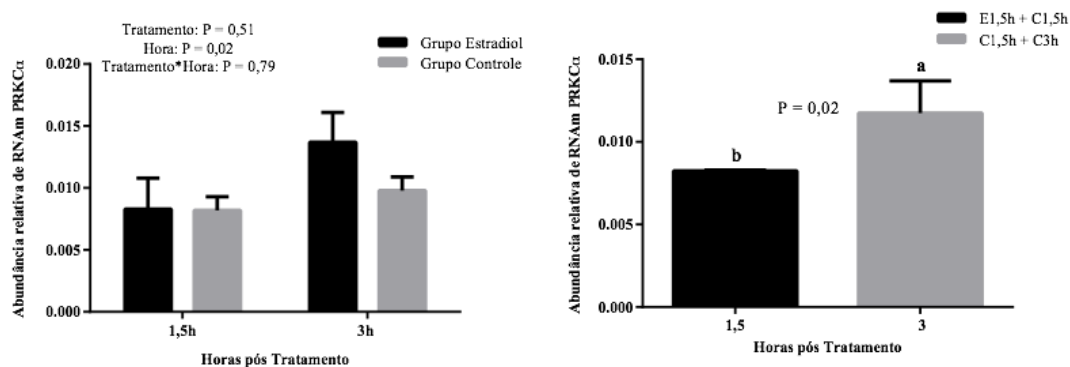


Figura 10. Abundância relativa de transcritos para PKC α determinada por qPCR, 1,5 ou 3 horas após novilhas Nelore serem tratadas com 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Controle; N = 22) ou 1 mg de 17 β -E2 diluído em 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Estradiol; N = 24) no D15.

^{a, b} Diferenças entre as médias nos diferentes tempos ($P \leq 0,01$)

Abundância relativa de transcritos PKC β . Conforme ilustrado na Figura 11, não houve efeito de tratamento ($P = 0,3762$), hora ($P = 0,9676$) e da interação tratamento*hora ($P = 0,1733$).

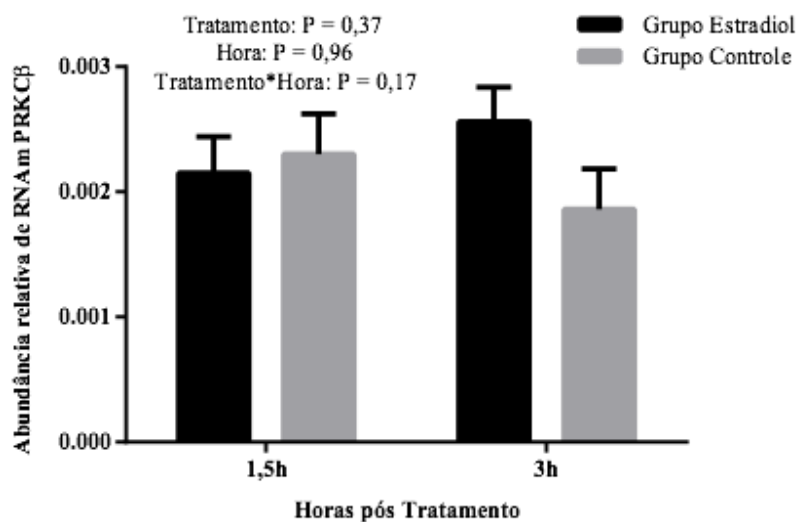


Figura 11. Abundância relativa de transcritos para PKC β determinada por qPCR, 1,5 ou 3 horas após novilhas Nelore serem tratadas com 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Controle; N = 22) ou 1 mg de 17 β -E2 diluído em 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Estradiol; N = 24) no D15.

Abundância relativa de transcritos para PLA2G4A. Conforme ilustrado na Figura 12, não houve efeito na interação tratamento*hora ($P = 0,5600$), entretanto, observou-se efeito de tratamento ($P = 0,0306$) e de hora ($P = 0,0277$). Observou-se uma maior abundância de transcritos no Grupo Controle comparado ao Grupo Estradiol 1,5 ($0,006 \pm 0,001$ vs $0,003 \pm 0,0005$ respectivamente) e 3 horas após o tratamento ($0,0 \pm 0,005$ vs $0,01 \pm 0,002$ respectivamente).

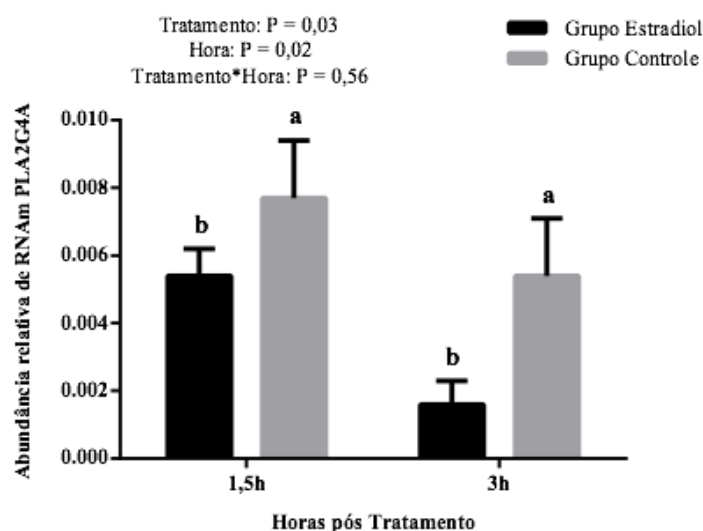


Figura 12. Abundância relativa de transcritos para PLA2G4A determinada por qPCR, 1,5 ou 3 horas após novilhas Nelore serem tratadas com 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Controle; N = 22) ou 1 mg de 17β -E2 diluído em 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Estradiol; N = 24) no D15.

^{a, b}Diferenças entre as médias nos diferentes tempos ($P \leq 0,05$)

Abundância relativa de transcritos AKR1B1. Conforme ilustrado na Figura 13, não houve efeito de tratamento ($P = 0,1871$) e da interação tratamento*hora ($P = 0,3467$), entretanto, observou-se efeito de hora ($P = 0,0079$). Observou-se que a abundância de transcritos foi maior no tempo 1,5 horas comparado ao tempo 3 horas ($0,88 \pm 0,11$ vs $0,42 \pm 0,11$ respectivamente; $P = 0,0079$).

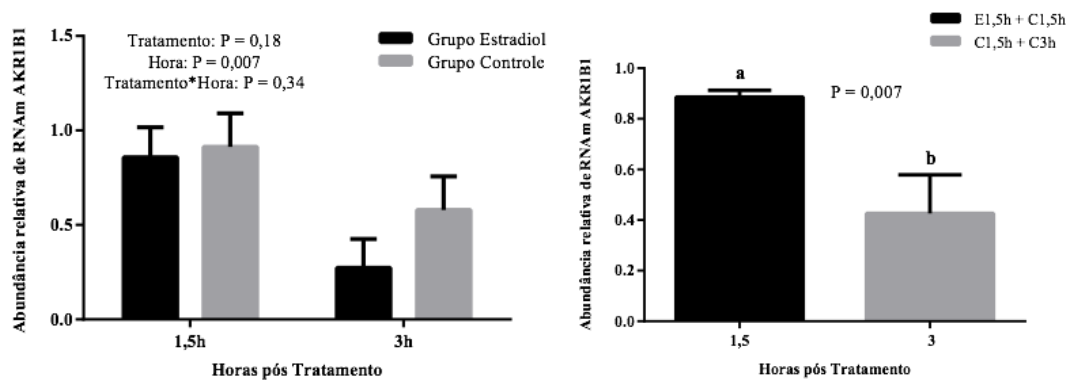


Figura 13. Abundância relativa de transcritos para AKR1B1 determinada por qPCR, 1,5 ou 3 horas após novilhas Nelore serem tratadas com 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Controle; N = 22) ou 1 mg de 17 β -E2 diluído em 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Estradiol; N = 24) no D15.

^{a, b}Diferenças entre as médias nos diferentes tempos ($P \leq 0,01$)

Abundância relativa de transcritos para AKR1C4. Conforme ilustrado na Figura 14, não houve efeito de hora ($P = 0,0747$) e da interação tratamento*hora ($P = 0,8461$), entretanto, houve efeito de tratamento ($P = 0,0538$). Observou-se uma maior abundância de transcritos no Grupo Controle comparado ao Grupo Estradiol 1,5 ($0,02 \pm 0,005$ vs $0,01 \pm 0,002$ respectivamente) e 3 horas após o tratamento ($0,0 \pm 0,005$ vs $0,01 \pm 0,002$ respectivamente).

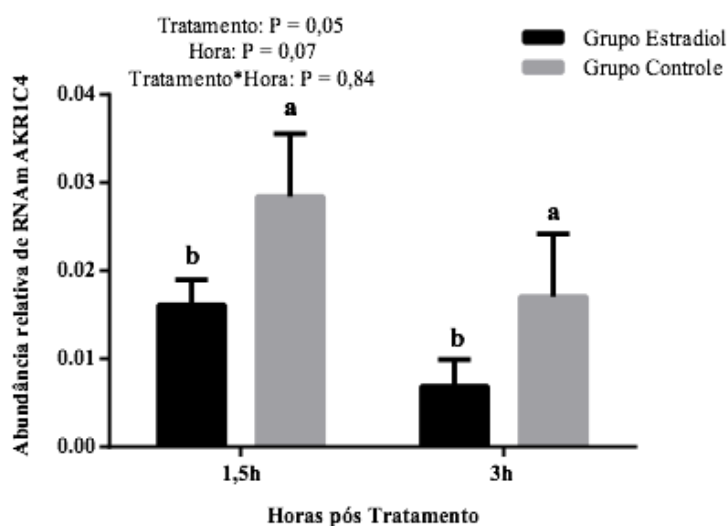


Figura 14. Abundância relativa de transcritos para AKR1C4 determinada por qPCR, 1,5 ou 3 horas após novilhas Nelore serem tratadas com 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Controle; N = 22) ou 1 mg de 17 β -E2 diluído em 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Estradiol; N = 24) no D15.

^{a, b}Diferenças entre as médias nos diferentes tempos ($P \leq 0,05$)

Abundância relativa de transcritos para *PTGS2*. Conforme ilustrado na Figura 15, não houve efeito de tratamento ($P = 0,5645$), hora ($P = 0,8939$) e interação tratamento e dia ($P = 0,2263$) em relação a abundância de transcritos da enzima *PTGS2*.

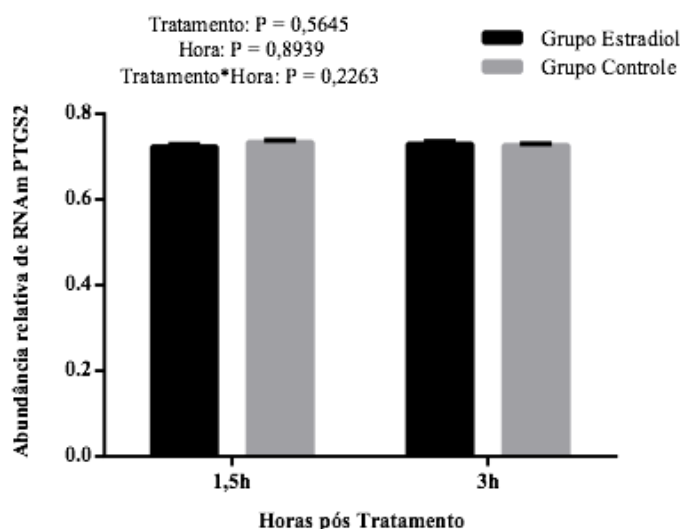


Figura 15. Abundância relativa de transcritos para *PTGS2* determinada por qPCR, 1,5 ou 3 horas após novilhas Nelore serem tratadas com 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Controle; $N = 22$) ou 1 mg de 17β -E2 diluído em 2 mL de óleo de gergelim puro (Grupo Estradiol; $N = 24$) no D15.

Na Figura 16, está ilustrada um sumarização dos resultados referentes à abundância dos transcritos. Para os transcritos *PKC β* e *PTGS2* nenhuma diferença foi encontrada comparando-se tratamento, tempo e a interação tratamento*tempo. Para a *PKC α* e *AKR1B1* observou-se apenas efeito de hora, com uma maior abundância de transcritos *PKC α* na hora 3 do que 1,5 horas após a administração dos tratamentos e maior abundância de transcritos *AKR1B1* na hora 1,5 do que 3 horas após a administração dos tratamentos. Houve efeito de tratamento apenas para os transcritos *PLA2G4* e *AKR1C4*, entretanto, a abundância de ambos foi diminuída no Grupo Estradiol quando comparado ao Controle.

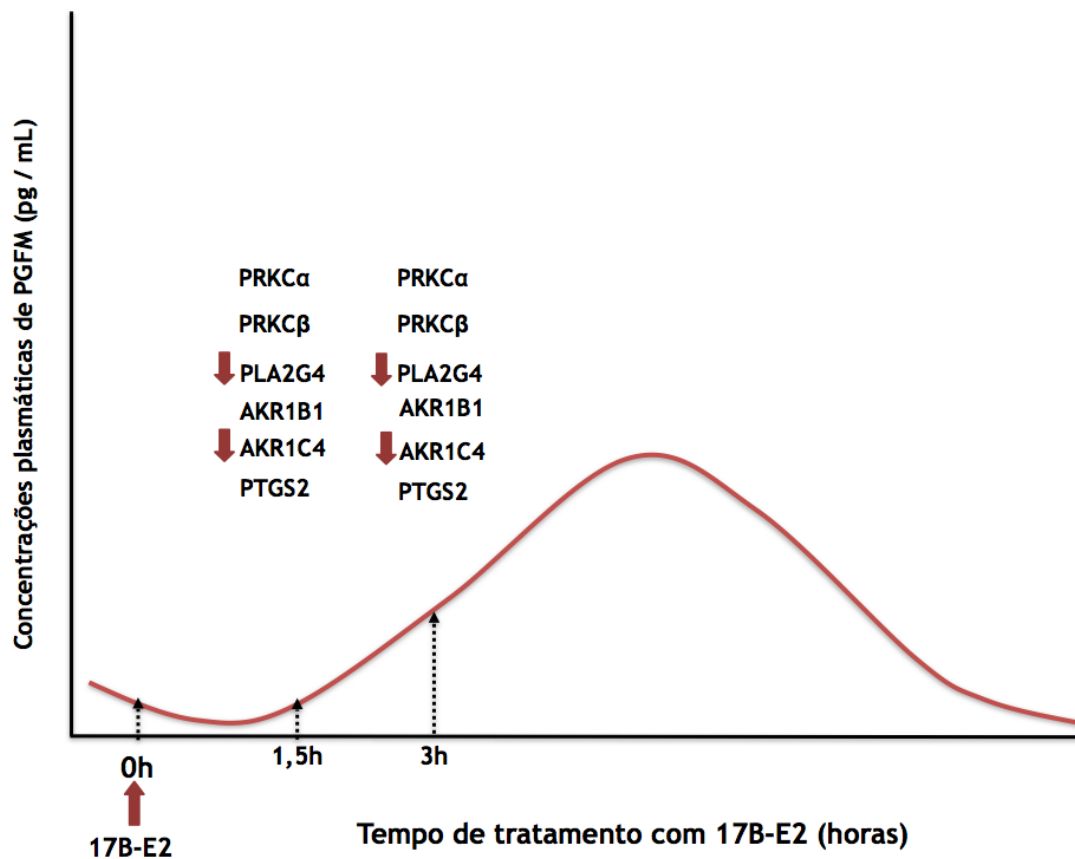


Figura 16. Efeitos da aplicação de 1 mg de 17β-E2 no D15 pós estro em novilhas Nelore, sobre a abundância de transcritos relacionados a síntese de PGF2α endometrial, especificamente *PKCα*, *PKCβ*, *PLA2G4*, *AKR1B1*, *AKR1C4* e *PTGS2*; 1,5 e 3 horas após a aplicação do tratamento (hora 0 = administração do tratamento, no D15 do ciclo estral (D0 = dia do estro)).

7. DISCUSSÃO

Embora a participação do E2 na luteólise das fêmeas bovinas seja reconhecida (KARSH et al., 1970; HANSEL et al., 1973; GENGENBACH et al., 1977; VILLAGODOY et al., 1981; HIXON et al., 1987; HUGHES et al., 1987; AULETTA et al., 1988; BEARD et al., 1994; SPENCER et al., 1995; SALFEN et al., 1999; BALAGUER et al., 2005; WOCLAWEK-POTOCA et al., 2006), os mecanismos pelos quais ocorre sua ação ainda não foram elucidados. No presente estudo, a hipótese testada foi que o tratamento com 17β-E2 no diestro tardio aumentasse a abundância de transcritos para as enzimas envolvidas na sinalização e síntese de PGF2α, especificamente *PKCα*, *PKCβ* e *PLA2G4*, estas dependentes de cálcio. Tal hipótese, baseou-se em resultados anteriores obtidos por este grupo (BERTAN, 2004; MEMBRIVE et al., 2015; OLIVEIRA, 2017). Para tanto, neste estudo objetivou-se determinar os efeitos do 17β-E2 exógeno na abundância de

transcritos chaves (PKC α , PKC β , PLA2G4, AKR1B1, AKR1C4 e PTGS2) envolvidos na sinalização e síntese de PGF2 α , 1,5 e 3 horas após a administração de 17 β -E2. Deve-se salientar que este estudo realizado, é um dos poucos experimentos *in vivo* que averigua os efeitos do 17 β -E2 na modulação da expressão de genes que participam da síntese de PGF2 α endometrial.

A expectativa, era que a aplicação de 17 β -E2 induzisse antecipadamente a luteólise funcional e estrutural. Neste estudo, verificou-se que 1 mg de 17 β -E2 promoveu a antecipação da luteólise funcional em aproximadamente 1,14 dias (17,07 \pm 0,43 vs 18,21 \pm 0,24 dias; P= 0,006) e da luteólise estrutural em aproximadamente 1,26 dias (18,42 \pm 0,33 vs. 19,68 \pm 0,42 dias; P= 0,026). Oliveira (2017), verificou em estudo similar, que no Grupo Estradiol houve uma antecipação na luteólise funcional em 2,5 dias e em 2,4 dias para a luteólise estrutural, quando utilizou 3 mg de 17 β -E2. Ainda, novilhas que receberam 0,1 mg de 17 β -E2 via IM, também observou-se antecipação da luteólise em 2 dias (PUGLIESI et al., 2011).

Neste estudo, as evidências de que a luteólise funcional e estrutural foram antecipadas, permitem assumir que o número de pulsos e as concentrações de PGF2 α minimamente necessárias para promover a luteólise foram garantidas pela dose de 1mg de 17 β -E2 administrada neste estudo. Em outros estudos, também verificou-se que a administração de 17 β -E2 promoveu a síntese de PGF2 α e a antecipação da luteólise (THATCHER et al., 1986; PUGLIESI et al., 2011) e tal estímulo caracterizou-se como sendo dose-dependente (GINTHER et al., 2010; PUGLIESI et al., 2011).

A dose de E2 escolhida neste estudo deveria cumprir duas premissas, garantir a luteólise antecipada e ao mesmo tempo deveria promover concentrações séricas o mais próximo possível das concentrações fisiológicas do organismo. Assim, neste estudo na tentativa de cumprir tais premissas, utilizou-se a dose de 1 mg de 17 β -E2 diluído em 2 mL de óleo de gergelim puro, conforme previamente descrito por Ginther et al. (2000), Ginther et al. (2010) e Pugliesi et al. (2011). De fato, tal dose foi efetiva para garantir a luteólise antecipada.

A mensuração da concentração de PGFM no plasma sanguíneo foi utilizada com a finalidade de indicar a concentração de PGF2 α , conforme realizado por diversos estudos clássicos relacionados ao entendimento da síntese de PGF2 α endometrial (KINDAHL et al., 1976; VIGHIO; LIPTRAP, 1986; KOTWICA et al., 1998; GINTHER et al., 2007). Em estudos prévios realizados pelo grupo, o aumento na concentração plasmática de PGFM iniciou-se 4 horas após a administração, e de fato atingiram um pico de PGFM 6

a 7 horas após os animais terem recebido o tratamento com estradiol (THATCHER et al., 1986; BERTAN, 2004; PUGLIESI et al., 2011; OLIVEIRA, 2017). De fato, no modelo experimental utilizado, verificou-se no Grupo Estradiol maior concentração plasmática de PGFM as 6h ($225,45 \pm 16,96$ pg/mL) e 7h ($285,58 \pm 33,09$ pg/mL) após a administração do tratamento, quando a concentração máxima de PGFM atingiu valores quatro vezes maiores nos animais tratados com estradiol comparado aos animais do Grupo Controle, evidenciando que de fato o 17β -E2 estimulou a síntese de $PGF2\alpha$.

A $PGF2\alpha$ é o principal agente luteolítico produzido pelo endométrio durante a regressão do CL nas fêmeas bovinas (MCCRACKEN; CUSTER, 1999; ASSELIN et al., 1996), promovendo efeitos na diminuição da concentração plasmática de P4 e fluxo sanguíneo do CL (GINTHER et al., 2007). Neste estudo, entre o D16 e D17, houve um decréscimo progressivo da concentração de P4, sendo significativamente mais acentuado no Grupo Estradiol. Também foi verificado que a área do CL foi menor no Grupo Estradiol no período compreendido entre o D18 ao D20.

Embora tenha havido uma redução na área do CL do D18 ao D20 nos animais tratados com estradiol, não houve uma redução no fluxo sanguíneo nesses mesmos animais, conforme esperado. Possivelmente esta ausência de efeito no fluxo sanguíneo se deva à alta variabilidade entre os dados, devido aos escores de fluxo sanguíneo serem expressos em porcentagem em uma escala de 5% em 5%. Assim, a progressiva e acentuada diminuição da concentração plasmática de P4 caracterizou a antecipação da luteólise funcional seguida pela luteólise estrutural no Grupo Estradiol. Sendo assim, o estradiol promoveu uma redução na concentração plasmática de P4 no D16 e D17, redução esta que se iniciou 1 dia após a aplicação do tratamento e a uma redução da área do CL que ocorreu 3 dias após a aplicação do tratamento, efeito evidenciado do D18 ao D20. Em síntese, a redução da área do CL ocorreu 2 dias após a queda abrupta na concentração plasmática de P4.

A avaliação ultrassonográfica do CL é considerada uma importante ferramenta no manejo reprodutivo afim de estimar o status funcional do CL, tanto em vacas de leite como de corte. Embora a avaliação do tamanho do tecido luteal tenha uma correlação positiva com a concentração de P4 circulante e servir como indicativo da função luteal, ao decorrer da fase de regressão do CL esta correlação se torna menor devido as taxas de decréscimo serem mais rápidas para a P4 do que para o tamanho do CL (KASTELIC et al., 1990; ASSEY et al., 1993). Neste estudo, nos animais tratados com estradiol houve redução da concentração plasmática de P4 entre o D16 e D17. Resultados similares foram

encontrados por Pugliesi et al. (2011) e Oliveira (2017). A avaliação da vascularização do tecido luteal indica uma forma mais precisa de estimar a função do CL, visto que há uma intensa rede vascular presente nesta glândula transitória (BOLLWEIN et al. 2002; 2012), entretanto, neste estudo não foi constatada diferença entre os grupos de tratamento no D16 e D17.

Diante deste contexto, este modelo mostra-se eficiente para o estudo dos mecanismos pelos quais o 17β -E2 estimula a síntese de $PGF2\alpha$ endometrial em fêmeas bovinas.

Muitos estudos permitiram demonstrar os efeitos do 17β -E2 na atividade de enzimas que participam da cascata geradora de $PGF2\alpha$ endometrial. Onde evidenciou-se que as PKCs são importantes sinalizadoras na síntese de $PGF2\alpha$ por contribuir com a ativação da PLA2 (BURNS et al., 1997; TYSELING et al., 1997; BINELLI et al., 2000; GUZELOGLU et a., 2004). O uso de um estimulador de PKC, o phorbol 12,13 dibutyrate (PDBu), promoveu aumento da secreção de $PGF2\alpha$ em células endometriais cultivadas *in vitro* - células BEND (BINELLI et al., 2000), além disso, os efeitos do E2 na ativação das PKCs foram inibidos pelo tamoxifen, que constitui um inibidor dos receptores de E2 (SCHWARTZ et al., 2002). Além disso, o estradiol foi objeto de pesquisas envolvendo vias alternativas de sinalização que levam a uma resposta rápida na ativação da PKC (BOYAN et al., 2003; SEGARS; DRIGGERS, 2014). Segundo Membrive et al. (2014), houve um aumento na síntese de $PGF2\alpha$ quando explantes endometriais de vacas tratadas com E2 *in vivo* foram subsequentemente cultivados *in vitro* com ionóforo de cálcio (CI). O mesmo efeito foi observado quando células endometriais bovinas (BEND) foram tratadas *in vitro* com E2 e CI, um efeito não observado em células tratadas apenas com E2 ou CI. Estes resultados demonstram que E2 possivelmente promova um aumento na abundância e/ou atividade de enzimas participantes da cascata geradora de $PGF2\alpha$, dependentes de cálcio, especificamente a $PKC\alpha$, $PKC\beta$ e PLA2G4. No entanto, neste estudo atual, a hipótese de que o tratamento com 17β -E2 no diestro tardio aumenta a abundância de transcritos para as enzimas envolvidas na sinalização e síntese de $PGF2\alpha$, não foi confirmada.

Em estudos prévios e similares a este, reportou-se que a administração de 17β -E2 estimula o gradual aumento da concentração plasmática de PGFM, aumento iniciado 4 horas após a injeção e que atinge concentrações máximas de pico 6 horas após o tratamento (THATCHER et al., 1986; BERTAN, 2004; PUGLIESI et al., 2011). Oliveira (2017) conduziu um estudo similar onde biópsias endometriais foram coletadas 4 e 7

horas após o tratamento com 17 β -E2 e observou que nos animais tratados houve um decréscimo na abundância dos transcritos para PKC α , PKC β , PLA2G4, AKR1B1 e AKR1C4, mas embora tenha havido tal redução na transcrição das enzimas envolvidas na síntese de PGF2 α , as concentrações de PGFM foram aumentadas e a luteólise foi antecipada nas fêmeas bovinas tratadas 17 β -E2. Neste estudo de Oliveira (2017) concluiu-se que a ativação das enzimas envolvidas na síntese de PGF2 α e que os possíveis mecanismos de estimulação da síntese de PGFM pelo 17 β -E2 ocorreria por efeitos anteriores as 4 horas, o que promoveria um *feed back* negativo dos níveis transcricionais, ou o 17 β -E2 poderia promover um aumento na ativação de enzimas pré-existentes nas células endometriais que participariam na cascata de síntese de PGF2 α . Neste contexto, a abundância de transcritos teria sido antecipada para antes da hora 4 que precedeu a administração de 17 β -E2. Pensando nessa premissa, direcionamos este estudo atual, para que as biópsias fossem antecipadas em relação ao estudo anterior, com coletas 1,5 e 3 horas após a administração de 17 β -E2. Mesmo antecipando as biópsias, de forma geral houve uma redução na abundância de transcritos na hora 1,5 e 3 após a administração de 17 β -E2. Evidenciou-se que, para os transcritos PKC β e PTGS2 (COX 2) nenhuma diferença foi encontrada comparando-se tratamento, tempo e a interação tratamento*tempo. Para a PKC α e AKR1B1 observou-se apenas efeito de hora, com uma maior abundância de transcritos PKC α na hora 3 do que 1,5 horas após a administração dos tratamentos e maior abundância de transcritos AKR1B1 na hora 1,5 do que 3 horas após a administração dos tratamentos. Houve efeito de tratamento apenas para os transcritos PLA2G4 e AKR1C4, entretanto, a abundância de ambos foi diminuída no Grupo Estradiol, exatamente ao contrário do que era esperado. A possibilidade que o 17 β -E2 poderia promover um aumento na ativação de enzimas pré-existentes nas células endometriais que participariam na cascata de síntese de PGF2 α é bastante remota, considerando o tempo de ação requerido para o 17 β -E2 promover o aumento nas concentrações séricas de PGFM, o tempo de 4 horas sugere o requerimento da síntese de novas proteínas, pois a ativação de proteínas pré-existentes na célula endometrial promoveria uma resposta fisiológica muito mais rápida, semelhante ao que ocorre quando administramos uma injeção de OT no D15 (BERTAN, 2004). A OT promove um aumento nas concentrações de PGFM cerca de 30 minutos após sua administração.

Contrário à nossa hipótese, os isotipos PKC α e PKC β não apresentaram aumento da expressão gênica após o tratamento com 17 β -E2. Esses resultados são similares aos obtidos em outro estudo realizado pelo grupo, onde os isotipos PKC α e PKC β também

tiveram a expressão gênica reduzida em biópsias endometriais coletadas 4 e 7 horas após o tratamento com estradiol (OLIVEIRA et al., 2017). Anteriormente, Alves Júnior et. al., (2011) mostraram que o tratamento *in vivo* com 17β -E2 não modulou a quantidade de proteína total extraída de explantes endometriais coletados 2 horas após o tratamento. Nesse mesmo estudo, também não houve modulação na abundância de proteínas de peso molecular por volta de 80 kDa, compatível ao peso molecular das PKCs. Entretanto, foi observado aumento de proteínas com menor e maior peso molecular que as PKCs, entre 108-110 kDa e 75-76 kDa, respectivamente (ALVES JUNIOR et al., 2011). Dessa forma, outras enzimas que não foram avaliadas neste estudo podem ter importância para a síntese de $PGF2\alpha$ por estímulo do 17β -E2.

A síntese de $PGF2\alpha$ por estímulo de OXTR também está associada à atividade da PLA2. As PLA2 são enzimas que atuam na mobilização de ácidos graxos presentes na membrana plasmática, como o AA, principal precursor da $PGF2\alpha$ (ARNI; WARD, 1996; KINI; EVANS, 1989; SETÚBAL et al., 2013). A utilização de estimulador de PLA2 levou ao aumento da síntese de $PGF2\alpha$ em cultivos de explantes endometriais (BURNS et al., 1997). Assim como, a inserção de implantes uterinos de estradiol no útero de ratas, promoveu o aumento da atividade da PLA2, correspondendo a um aumento 167 vezes maior comparado ao placebo, e a um aumento da síntese de $PGF2\alpha$ (PAKRASI; CHENG; DEY, 1983). Assim, esperávamos que o estradiol levasse ao aumento dos transcritos de PLA2. Contudo, em nosso estudo não houve aumento de transcritos influenciados pelo tratamento com estradiol. A abundância de transcritos foi maior no Grupo Controle em ambos os horários (1,5 e 3 horas).

Sendo assim, mesmo não ocorrendo o aumento dos transcritos $PKC\alpha$, $PKC\beta$ e $PLA2G4A$, o tratamento com 17β -E2 aumentou a concentração plasmática de PGFM, o que levou a antecipação da luteólise. Além disso, outros estudos mostram o aumento da atividade dessas enzimas em benefício da síntese de $PGF2\alpha$ (BURNS et al., 1997, BURNS et al., 1998; BINELLI et al., 2000, GUZELOGLU et al 2004).

A enzima PTGS2 também conhecida como COX-2 é uma molécula chave para a síntese de $PGF2\alpha$ em diversos tecidos, por ser a principal enzima responsável por converter o AA em $PGH2$ (SMITH; LANDS, 1972). Na tuba uterina de camundongos, o estradiol estimulou o aumento de COX-2. Ainda, a COX-2 pode ser inibida por tamoxifen, indicando um possível estímulo do estradiol via seus receptores na expressão dessa enzima (MARTÍNEZ et al., 2006). Embora existam evidências de que o estradiol estimule a ação da COX-2, em nosso estudo não houve aumento dos transcritos para essa

enzima. Esses resultados também foram similares aos encontrados por Oliveira et al. (2017).

As enzimas AKR1B1 e AKR1C4 fazem parte da família aldo-ceto redutase e participam da via de síntese de final de prostaglandina, convertendo a PGH2 à PGF2 α . Desse modo, devido a ação do estradiol em estimular a liberação de PGFM, esperava-se que a transcrição dessas enzimas fosse aumentada. Contudo, em nosso estudo não houve aumento de transcritos devido a ação do estradiol. Para a enzima AKR1B1, houve um efeito de dia, onde a expressão relativa foi maior no momento 1,5 horas, mas independente do grupo tratado. Já em relação a enzima AKR1C4, houve efeito de tratamento, porém, a abundância de transcritos foi maior no Grupo Controle comparado ao Grupo Estradiol em ambos os horários (1,5 e 3 horas). Em contradição, em estudo realizado por Oliveira et al. (2015) a expressão gênica das enzimas sintases de PGF2 α (AKR1C3 e AKR1C4) e PGE2 (PTGES1) aumentou no grupo de vacas cujo ambiente uterino estava sob influência de maiores concentrações de esteroides. Entretanto, esse aumento de expressão gênica das enzimas sintases não resultou em aumento de seus respectivos metabólitos no lavado uterino e tecido endometrial. Sendo assim, a análise da abundância de transcritos mostrou ser um ponto entre vários outros possíveis para averiguar os efeitos do estradiol sob os componentes da via de síntese de PGF2 α .

Diante dos resultados obtidos neste estudo, conforme ilustrado na Figura 17, e de nossa hipótese negada, especulamos outros possíveis mecanismos de ação do 17 β -E2 na síntese de PGF2 α . Uma das possibilidades é que no D15 as células endometriais apresentem quantidade suficiente das enzimas estudadas estocadas para promover pulsos de PGFM desencadeando a luteólise funcional e estrutural, independente da transcrição de novas enzimas, tornando o papel do 17 β -E2 restrito a fosforilar muitas destas enzimas. Desta forma, promovendo pulsos de PGFM sem promover a transcrição de novas enzimas envolvidas na síntese de PGF2 α . Outra possibilidade seria que o 17 β -E2 promoveria um "start" na comunicação entre a OT e a PGF2 α , ocasionando um aumento nos receptores de OT que aliado uma liberação inicial de OT promoveria a liberação de PGF2 α nas células endometriais, que por sua vez estimularia a liberação de mais OT acionando a retroalimentação do sistema de liberação ocitocina-PGF2 α . Uma outra possibilidade seria a administração de 17 β -E2 promover aumento dos receptores de P4, e pela ação da P4 ligada aos receptores, haveria uma diminuição na transcrição das enzimas envolvidas na síntese de PGF2 α . Outros estudos serão realizados na tentativa de elucidar estas outras possibilidades de ação do 17 β -E2 na síntese de PGF2 α .

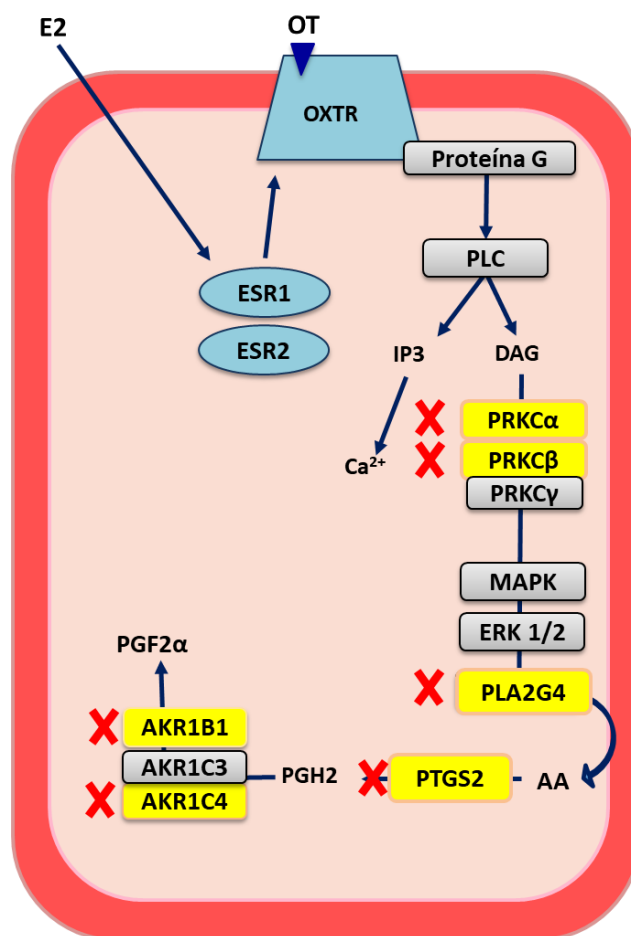


Figura 17. Modelo hipotético representando os efeitos do 17β -E2 sobre as enzimas de sinalização e síntese de $\text{PGF}_2\alpha$ na célula endometrial bovina. A aplicação de 17β -E2 no dia 15 pós estro não promoveu o aumento de transcritos de enzimas-chave envolvidas nesta cascata, sendo elas $\text{PKC}\alpha$, $\text{PKC}\beta$, PLA_2G_4 , PTGS_2 , AKR1B1 e AKR1C4 . Entretanto, a aplicação de 17β -E2 levou ao aumento da síntese de $\text{PGF}_2\alpha$ pela célula endometrial. Esses resultados indicam que possivelmente existam outros mecanismos de ação através dos quais o 17β -E2 exerce seus efeitos sobre a síntese de $\text{PGF}_2\alpha$.

8. CONCLUSÃO

Conclui-se que a aplicação de 17β -E2 no 15º dia do ciclo estral promoveu aumento das concentrações de PGFM e a antecipação da luteólise funcional e estrutural nas novilhas Nelore, contudo, este aumento não foi associado ao aumento da transcrição gênica das proteínas estudadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, T. J.; YOSHIKAWA, N.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after PGF₂ α injection in the cow. **Biology of Reproduction**, v.66, p.65–8, 2002.

ACTIVITY, H. P. D. et al. Identification of a Principal mRNA Species for Human 3 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase Isoform (AKR1C3). **That Exhibits**, v. 946, p. 940-946, 1998.

ADAMS J. A. Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. **Chem Rev**, v.101, n.8, p.2271–2290, 2001.

ALVES JUNIOR, S. S.; SOARES, N.; CASTRO, F. C.; THOMAZ, F.; PEREIRA, V.; BALIEIRO, J. C. C.; MUNIN, S. F.; CESAR, M. C.; BINELLI, M.; MEMBRIVE, C. M. B. Estradiol-17 β altera expressão proteica endometrial em fêmeas bovinas tratadas no 17o dia do ciclo estral. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 48, n. 17, p. 27–37, 2011.

ARAUJO, R. R.; GINTHER, O. J.; FERREIRA, J. C.; PALHÃO, M. M.; BEG, M. A.; WILTBANK, M. C. Role of follicular estradiol-17 β in timing of luteolysis in heifers. **Biology of reproduction**, v. 81, n. 2, p. 426–37, 2009.

ARNI, R.K.; WARD, R.J. Phospholipase A₂ – a structural review. **Toxicon**, v. 34, n. 8, p. 827-841, 1996.

AROSH, J. A.; BANU, S. K.; CHAPDELAIN, P.; MADORE, E.; SIROIS, J.; FORTIER, M. A. Prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling in corpus luteum: a basis for autoregulation of luteal function. **Endocrinology**, v.145, p.2551–60, 2004.

ASSELIN, E.; GOFF, K.; BERGERON, H.; FORTIER, M. Influence of sex steroids on the production of prostaglandins F₂ α and E₂ and response to oxytocin in cultured epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. **Biology of Reproduction**, v. 54, n. 2, p. 371–9, 1996.

ASSEY R. J.; PURWANTARA B.; GREVE T.; HYTTEL P.; SCHMIDT M. H. Corpus luteum size and plasma progesterone levels in cattle after cloprostenol-induced luteolysis. **Theriogenology**, v.39, p.1321-1330, 1993.

AULETTA, F. J.; FLINT, A. P. F. Mechanisms controlling corpus luteum function in sheep, cows, non human primates and women, especially in relation to the time of luteolysis. **Endocrine Reviews**, v. 9, n. 1, p. 88-105, 1988.

BALAGUER, S. A.; PERSHING, R. A.; RODRIGUEZSALLABERRY, C.; THATCHER, W. W.; BADINGA, L. Effects of bovine somatotropin on uterine genes

related to the prostaglandin cascade in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 2, p. 543-552, 2005.

BEARD, A. P.; LAMMING, G. E. Oestradiol concentration and the development of the uterine oxytocin receptor and oxytocin-induced PGF₂ alpha release in ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 100, n. 2, p. 469-475, 1994.

BENYO, D. F.; PATE, J. L. Tumor necrosis factor alpha alters bovine luteal cell synthetic capacity and viability. **Endocrinology**, v.130, p.854-960, 1992.

BERGSTROM, S.; DANIELSSON, H.; KLENBERG, D.; SAMUELSON, S. The enzymatic conversion of essential fatty acids into prostaglandins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 239, p. 4006-4009, 1964.

BERTAN, C. M. **Mecanismos endócrinos e moleculares pelos quais o estradiol estimula a síntese de prostaglandina F₂α endometrial em fêmeas bovinas**. [Endocrine and molecular mechanisms by which estradiol stimulates endometrial prostaglandin F₂α synthesis in the cow]. 2004. 180 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

BERTAN, C. M.; BINELLI, M.; MADUREIRA, E. H.; TRALDI, A. S. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.43, p.824-840, 2006.

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

BOLLWEIN H.; BAUMGARTNER U.; STOLLA R. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow in cows during pregnancy. **Theriogenology**, v.57, p.2053-2061, 2002.

BOLLWEIN H.; LÜTTGENAU J.; HERZOG K. Bovine luteal blood flow: basic mechanism and clinical relevance. **Reprod Fertil Dev**, v.25, p.71-79, 2012.

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

BRUNNER, M.A.; DONALDSON, L.E.; HANSEL, W. Exogenous hormones and luteal function in hysterectomized and intact heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 52, p. 1849-1854, 1969.

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

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

CARAMBULA, S. F.; MAITIKAINEM, T.; AITIKAINEM, T. Caspase-3 is a pivotal mediator of apoptosis during regression of ovarian corpus luteum. **Endocrinology**, v. 143, n. 4, p. 1495-1501, 2002.

CARTER, F.; FORDE, N.; DUFFY, P.; WADE, M.; FAIR, T.; CROWE, M. a; EVANS, C. O.; KENNY, D. a; ROCHE, J. F.; LONERGAN, P. Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. **Reproduction, fertility, and development**, v. 20, n. 3, p. 368–75, jan. 2008.

CHEN, G. T. C.; GETSIOS, S.; MACCALMAN, C. D. 17beta-estradiol potentiates the stimulatory effects of progesterone on cadherin-11 expression in cultured human endometrial cells. **Endocrinology**, v. 139, p.35123519, n. 8, 1998.

DAVIS, S. R.; COLLIER, R. J.; MCNAMARA, J. P. Effects of thyroxine and growth hormone treatment of dairy cows on milk yield, cardiac output and mammary blood flow. **J. Anim. Sci.**, v. 66, p. 70-79, 1988.

DENNIS, E.A. History, classification, structure and function of phospholipase A2. In: UHL, W.; NEVALAINEN, T.J.; BÜCHLER, M.W. (Eds.). **Phospholipase A2: Basic and Clinical Aspects in Inflammatory Diseases**. 1. ed. Basel: Karger, p. 1-7, 1997.

DEVINE, K.; DRIGGERS, P. H.; SZU, S. C.; ZAREK, S.; COX, J.; SEGARS, J. H. Follicle stimulating hormone (FSH) induction of aromatase and luteinizing hormone receptor (LHR) is dependent, in part, on the protein kinase a regulatory-rho-guanine nucleotide exchange factor AKAP13. **Fertility and Sterility**, 102(3): e271–e272, 2014.

DIAZ, F. J.; ANDERSON, L. E.; WU, Y. L.; RABOT, A.; TSAI, S. J.; WILTBANK, M. C. Regulation of progesterone and Prostaglandin F₂ α production in the CL. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 191, p. 65-68, 2002.

DIELEMAN, S. J.; BEVERS, M. M. Effects of monoclonal antibody against PMSG administered shortly after the preovulatory LH surge on time and number of ovulations in PMSG/PG-treated cows. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 81, n. 2, p. 533-542, 1987.

DISKIN, M. G.; MURPHY, J. J.; SREENAN, J. M. Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. **Animal Reproduction Science**, v.96, p.297–311, 2006.

FAIRCLOUGH, R. J.; MOORE, L. G.; MCGOWAN, L. T.; PETERSON, A. J.; SMITH, J. F.; TERVIT, H. R.; WATKINS, W. B. Temporal relationship between plasma concentrations of 13,14-dihydro-15- ketoprostaglandin F and neurophysin I/II around luteolysis in sheep. **Prostaglandins**, v.20, p.199–208, 1980.

FITZGERALD, G. A.; PATRONO, C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. **N Engl J Med.**, 345:433-442, 2001.

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

FLINT, A. P. F.; SHELDRIK, E. L. Ovarian secretion of oxytocin is stimulated by Prostaglandins. **Nature**, v.297, p.587–8, 1982.

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

GENGENBACH, D.R.; HIXON, J.E.; HANSEL, W. A luteolytic interaction between estradiol and prostaglandin F_{2α} in hysterectomized ewes. **Biology of Reproduction**, v. 16, p. 571, 1977.

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

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. **Biol Reprod**, 63:383–389, 2000.

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

GINTHER, O. J.; SILVA, L. a; ARAUJO, R. R.; BEG, M. A. Temporal associations among pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF 2α , luteal blood flow, and luteolysis in cattle. **Biology of reproduction**, v. 76, n. 3, p. 506–513, 2007.

GINTHER, O. J; ARAUJO, R. R.; PALHAO, M. P.; RODRIGUES, B. L.; BEG, M. A. Necessity of sequential pulses of prostaglandin F 2α for complete physiologic luteolysis in cattle. **Biology of Reproduction**, v.80, p.641– 8, 2009a.

GINTHER, O. J; SIDDIQUI, M. A.; BEG, M. A. Physiologic and nonphysiologic effects of exogenous prostaglandin F 2α on reproductive hormones in mares. **Theriogenology**, v.72, p.417–24, 2009b.

GINTHER, O. J.; SHRESTHA, H. K.; BEG, M. A. Circulating hormone concentrations within a pulse of a metabolite of prostaglandin F 2α during preluteolysis and early luteolysis in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 122, n. 3–4, p. 253–258, 2010.

GINTHER, O. J; SHRESTHA, H. K.; FUENZALIDA, M. J.; SHAHIDUZZAMAN, A. K.; BEG, M. A. Characteristics of pulses of 13,14-dihydro-15ketoprostaglandin F 2α before, during, and after spontaneous luteolysis and temporal intrapulse relationships with progesterone concentrations in cattle. **Biology of Reproduction**, v.82, p.1049 –56, 2010b.

GINTHER, O. J; SHRESTHA, H. K.; FUENZALIDA, M. J.; BEG, M. A. Stimulation of pulses of 13,14dihydro-15-keto-PGF 2α (PGFM) with estradiol-17 β and changes in circulating progesterone concentrations within a PGFM pulse in heifers. **Theriogenology**, v.74, p.384–92, 2010d.

GIRSH, E.; MILVAE, R.; WANG, W. Effect of endothelin1 on bovine luteal cell function, role in prostaglandin F 2α -induced steroidogenic action. **Endocrinology**, 1996, 137, p.1306. 88.

GIRSH, E.; WANG, W.; MAMLUCK, R. Regulation of endothelin-1 expression in the bovine corpus luteum, elevation by prostaglandin F 2α . **Endocrinology**, 1996, 137, p.5191-96.

GOSPODAROWICZ, D.; CHENG, J.; LUI, G. M. Corpus luteum angiogenic factor is related to fibroblast growth factor. v. 117, n. 6, p. 2383-2391, 1985.

GUPTA, R. A.; DUBOIS, R. N. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. **Nat Rev Cancer**, 1:11-21, 2001.

GUZELOGLU, A.; BINELLI, M.; BADINGA, L.; HANSEN, T.R.; THATCHER, W.W. Inhibition of phorbol ester-induced PGF 2α secretion by IFN- τ is not through regulation of protein kinase C. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**, v.74, p. 87–99, 2004.

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

GRAZUL-BILSKA, A. T.; REDMER, D. A.; KILLILEA, S. D. Production of mitogenic factor(s) by ovine corpora lutea throughout the estrous cycle. **Endocrinology**, v. 130, n. 6, p. 3625-3632, 1992.

GRIFFIN, J. E. & OJEDA S. R. Textbook of endocrine physiology. **Oxford University Press, New York**, p.66, 67, 149, 1992.

HAHNKE, K. E.; CHRISTENSON, S. P.; TAYLOR, M. Macrophage infiltration into the porcine corpus luteum during prostaglandin F_{2a}-induced luteolysis. **Biol. Reprod.**, v. 50, p.10-15, 1994.

HANSEL, H.; CONCANNON, P. W.; LUKASZEWSKA, J. H. Corpora lutea of large domestic animals. **Biology of Reproduction**, v. 8, p. 222, 1973.

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

HEMLER M., LANDS, W. E. Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins. Demonstration of two forms of iron in the holoenzyme. **J Biol Chem.** 251:5575-5579, 1976.

HIXON, J. E.; FLINT, A. P. Effects of a luteolytic dose of oestradiol benzoate on uterine oxytocin receptor concentrations, phosphoinositide turnover and prostaglandin F₂ alpha secretion in sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 79, n. 2, p. 457-567, 1987. HOOPER, S. B.; WATKINS, W. B.; THORBURN, G. D. Oxytocin, oxytocin-associated neurophysin, and prostaglandin F₂ α concentrations in the utero-ovarian vein of pregnant and nonpregnant sheep. **Endocrinology**, v.119, p.2590–7, 1986.

HUGHES, T. L.; VILLA-GODOY, A.; KESNER, J. S.; FOGWELL, R. L. Destruction of bovine ovarian follicles: effects on the pulsatile release of luteinizing hormone and prostaglandin F₂ α -induced luteal regression. **Biology of Reproduction**, v. 36, p. 523-529, 1987.

IBRAHIMI, O.A.; ZHANG, F.; HRSTKA, S.C.L.; MOHAMMADI, M.; LINHARDT, R. J. **Signal transduction complex assembly. Biochemistry**, v.43, p.4724-4730, 2004.

IVELL, R.; FUCHS, A. R.; BATHGATE, R.; TILLMANN, G.; KIMURA, T. Regulation of oxytocin receptor in bovine reproductive tissues and the role of steroids. **Reproduction of Domestic Animals**, v.35, p.134–41, 2000.

JEZ, J. M.; FLYNN, T. G.; PENNING, T.M. A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily. **Biochemical Pharmacology**, 54:639-647, 1997.

JEZ, J. M.; PENNING, T.M. The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: an update. **Biochemical Pharmacology Interactions**, 130-132: 499-525, 2001.

JORNVALL, H.; PERSSON, B.; KROOK, M.; ATRIAN, S.; GONZALEZ-DUARTE, R.; JEFFEREY, J.; GHOSH, D. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). **Biochemistry**. 34:6003-6013, 1995.

KARSH, F. J.; NOVEROSKE, J. W.; ROCHE, J. F; NORTON, H. W.; NALBANDOV, A. V. Maintenance of ovarian corpora lutea in absence of ovarian follicles. **Endocrinology**, v. 87, p. 1228-1235, 1970.

KASTELIC, J. P.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. **Theriogenology**, v.33, p.1269-1278, 1990.

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

KINDHAL, H.; LINDELL, J. O.; EDQVIST, L. E. Release of prostaglandin F₂ α during oestrus cycle. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.77, p.143–58, 1981.

KINI, R.M.; EVANS, H.J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. **Toxicon**, v. 27, n. 6, p. 613-635, 1989.

KNICKERBOCKER, J. J.; THATCHER, W. W.; FOSTER, D. B.; WOLFENSON, D.; BARTOL, F. F; CANTON, D. Uterine prostaglandin and blood flow responses to estradiol 17- β in cyclic cattle. **Prostaglandins**, v. 31, p. 757-767, 1986.

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

KOTWICA, J.; SKARZYNSKI, D.; JAROSZEWSKI, J.; WILLIAMS, G.L.; BOGACHI, M. Uterine secretion of PGF₂ α , stimulated by different doses of oxytocin and released spontaneously during luteolysis in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v.38, p.217–226, 1998

KUJUBU, D. A.; FLETCHER, B. S.; VARNUM, B. C. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. **J Biol Chem.**, 266:12866-12872, 1991.

KULICK, L. J., KOT, K.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. **Theriogenology**, 52:913–921, 1999.

LAMSA, J. C.; KOT, S. J.; ELDERING, J. A.; NAY, M. G.; MCCRACKEN, J. A. Prostaglandin F₂ α stimulated release of ovarian oxytocin in the sheep in vivo: threshold and dose dependency. **Biology of Reproduction**, v.40, p.1215–23, 1989.

LAMBERT-LANGLAIS, S.; POINTUD, J. C.; LEFRANÇOIS-MARTINEZ, A. M.; VOLAT, F.; MANIN, M.; COUDORE, F.; VAL, P.; SAHUT-BARNOLA, I.; RAGAZZON, B.; LOUISET, E.; DELARUE, C.; LEFEBVRE, H.; URADE, Y.; MARTINEZ, A. Aldo keto reductase 1 B7 and prostaglandin F₂ α are regulators of adrenal endocrine functions. **PLoS one**, San Francisco, v. 4, n. 10, e. 7309, 2009.

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

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

MACÊDO, J. K. A. Análise da peçonha de *Bothropoides marmoratus*, com ênfase na caracterização de proteínas com atividade antimicrobiana e/ou antitumoral. 104 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

MACKAY, H. J.; TWELVES, C. J. Targeting the protein kinase C family: are we there yet? **Nature**, v. 7, p. 554–567, 2007.

MADORE, E.; HARVEY, N.; PARENT, J.; CHAPDELAIN, P.; AROSH, J. A.; FORTIER, M. A. An Aldose reductase with 20-hydroxysteroid dehydrogenase activity is most likely the enzyme responsible for the production of prostaglandin F₂ α in the bovine endometrium. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 278, p. 11205- 11212, 2003.

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

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

MANN, G. E.; PAYNE, J. H.; LAMMING, G. E. Hormonal regulation of oxytocin-induced prostaglandin PGF₂ α secretion by the bovine and ovine uterus in vivo. **Domestic Animal Endocrinology**, v.2, p.127–41, 2001.

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

MCCRACKEN, J. A.; CARLSON, J. C.; GLEW, M. E. Prostaglandin F₂ identified as a luteolytic hormone in sheep. **Nat New Biol.**, 1972, Aug, 2, 238 (83), p.12934.

MCCRACKEN, J. A.; BARCIKOWSKI, B.; CARLSON, J. C. The physiological role of prostaglandin F₂ α in corpus luteum regression. **Adv Biosci.**, 9, p.599-624, 1973.

MCCRACKEN, J. A.; SCHRAMM, W.; OKULICZ, W. C. Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF₂ α from ovine uterus during luteolysis and its abrogation in early pregnancy. **Anim Reprod Sci**, v.7, p.31-55, 1984.

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

MEADE, E. A.; SMITH, W. L.; DEWITT, D. L. Differential inhibition of spinal nociceptive processing. **Pain**. 9-43, 1993.

MEIDAN, R. Intraovarian regulation of luteolysis. **J Reprod Fertil Suppl**, 54, p.217-28, 1999.

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

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

MEYER, H. D. D.; MITTERMEIER, T. H.; SCHAMS, D. Dynamics of oxytocin, estrogen and progestin receptors in the bovine endometrium during the estrous cycle. **Acta Endocrinologica** v.118, p.96–104, 1988.

MILVAE, R. A. Inter-relationships between endothelin and prostaglandin F₂ α in corpus Luteum function. **Rev. Reproduction**, v.5, p.1–5, 2000.

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

MIYAMOTO, T.; OGINO, N.; YAMAMOTO, S.; HAYAISHI, O. Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. **J Biol Chem**. 251:2629-2636, 1976.

MOORE, L. G.; CHOY, V. J.; ELLIOT, R.L.; WATKINS, W. B. Evidence for the pulsatile release of PGF₂ α inducing the release of ovarian oxytocin during luteolysis in the ewe. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.76, p.159–66, 1986.

MORISSET, S.; PATRY, C.; LORA, M. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in bovine chondrocytes in culture by interleukin 1 α , tumor necrosis factor- α , glucocorticoids, and 17 β -estradiol. **J Rheumatol.**, 25:1146-1153, 1998.

NEWTON, A. C. Protein kinase C; structure, function, and regulation. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 270, p. 28495–28498, 1995.

MURAKAMI, M.; KUDO, I. Phospholipase A₂. **Journal of Biochemistry**, v. 131, n. 3, p. 285–292, 2002.

NISHIZUKA, Y. Intracellular signalling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. **Science**, v. 258, p. 607–614, 1992.

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

NISWENDER, G. D. Molecular control of luteal secretion of progesterone. **Reproduction**. Mar, 123(3), p.333-9. Review, 2002.

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

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

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

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

POHLER, K. G.; PEREIRA, M. H. C.; LOPES, F. R.; LAWRENCE, J. C.; KEISLER, D. H.; SMITH, M. F.; VASCONCELOS, J. L. M. GREEN, J. A. Circulating concentrations of bovine pregnancy-associated glycoproteins and late embryonic mortality in lactating dairy herds. **J. Dairy Sci**, 99:1–11, 2016.

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

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

REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Angiogenesis in the ovary. **Rev Reproduction**, v. 1, n. 3, p. 182-192, 1996.

ROCHE, J. F.; MIHM, M.; DISKIN, M. G.; IRELAND, J. J. A review of regulation of follicle growth in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 16-29, 1998.

SCHENK, P. W.; SNAAR-JAGALSKA, B. E. Signal perception and transduction: the role of protein kinases. **Biochemistry Biophysics Acta**, v. 1449, p. 1–24, 1999.

SALLES, M. G. F.; ARAÚJO, A. A. Corpo lúteo cíclico e gestacional: revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, p.185–94. 2010.

SALFEN, B. E.; CRESSWELL, J. R.; XU, Z. Z.; BAO, B.; GAVERICK, H. A. Effects of the presence of a dominant follicle and exogenous estradiol on the duration of the luteal phase of bovine estrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 115, p. 15-21, 1999.

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

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

SAWYER, H. R.; NISWENDER, K. D.; BRADEN, T. D. Nuclear changes in ovine luteal cells in response to PGF₂ alpha. **Domest Anim Endocrinol.**, Apr, 7(2), p.229-37, Apr. 1990.

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

SCHALOSKE, R.H.; DENNIS, E.A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1761, n. 11, p. 1246-1259, 2006.

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

SHIRAI, Y.; SAITO, N. Activation mechanisms of protein kinase c: maturation, catalytic activation, and targeting. **Journal of biochemistry**, v. 132, p. 663–668, 2002.

SHIRASUNA, K.; SHIMIZU, T.; HAYASHI, K-G.; NAGAI, K.; MATSUI, M.; MIYAMOTO, A. Positive association, in local release, of luteal oxytocin with endothelin 1 and prostaglandin f₂alpha during spontaneous luteolysis in the cow: a possible intermediary role for luteolytic cascade within the corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v.76, p.965– 70, 2007.

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

SILVIA, W. J.; LEWIS, G. S.; MCCRACKEN, J. A.; THATCHER, W. W.; WILSON, L. Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F₂ α during luteolysis in ruminants. **Biology of Reproduction**, v.45, p.655–63, 1991.

SILVIA, W. J.; TAYLOR, M. E. Relationship between uterine secretion of prostaglandin F₂ α induced by oxytocin and endogenous concentrations of estradiol and progesterone at three stages of the bovine estrous cycle. **Journal of Animal Science**, v.67, p.2347–53, 1989.

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

SIMMONS, D. L.; BOTTING, R. M.; HLA, T. Cyclooxygenase isozymes: The biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Pharmacological Reviews**. 56:387-437, 2004.

SIX, D.A.; DENNIS, E.A. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1488, n. 2, p. 1-19, 2000.

SKARZYNSKI, D. J.; FERREIRA-DIAS, G.; OKUDA, K. Regulation of luteal function and corpus luteum regression in cows: hormonal control, immune mechanisms and intercellular communication. **Reproduction of Domestic Animals**, v.43, p.57–65, 2008.

SMITH, W.L.; LANDS, W. E. Oxygenation of polyunsaturated fatty acids during prostaglandin biosynthesis by sheep vesicular gland. **Biochemistry**, 11:3276- 3285, 1972.

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

SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BAZER, F. W.; BURGHARDT, R. C.; PALMARINI, M. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: Roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, n. 1, p. 65–78, 2007.

STOCCO, C.; TELLERIA, C.; GIBORI, G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. **Endocrine Reviews**, v.28, p.117–149, 2007.

SETÚBAL, S.S.; PONTES, A.S.; FURTADO, J.L.; XAVIER, C.V.; SILVA, F.L.; KAYANO, A.M.; IZIDORO, L.F.M.; SOARES, A.M.; CALDERON, L.A.; STÁBELI, R.G.; ZULIANI, J.P. Action of Two Phospholipases A2 Purified from Bothrops alternatus Snake Venom on Macrophages. **Biochemistry**, v. 78, n. 2, p. 194-203, 2013.

SUH, D. Y.; HUNT, T. K.; SPENCER, E. M. Insulin-like growth factor-I reverses the impairment of wound healing induced by corticosteroids in rats. **Endocrinology**, v. 131, n. 5, p. 2399-2403, 1992.

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

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

TITHOF, P. K.; ROBERTS, M. P.; GUAN, W.; ELGAYYAR, M.; GODKIN, J. D. Distinct phospholipase A2 enzymes regulate prostaglandin E2 and F2 α production by

bovine endometrial epithelial cells. **Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E**, v. 5, p. 16, 2007.

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

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

VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. 38:97-120, 1998.

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

VILLA-GODOY, A.; IRELAND, J. J.; WORTMAN, J. A.; AMES, N. K.; FOGWEL, R. L. Luteal function in heifers following destruction of ovarian follicles. *Journal of Animal Science*, v. 53, p. 372, 1981.

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

WATHES, D. C.; HAMON, M. Localization of oestradiol, P₄ and oxytocin receptors in the uterus during the oestrus cycle and early pregnancy of the ewe. **Journal of Endocrinology**, v.138, p.479–91, 1993.

WALTERS, D. L.; SCHAMS, D.; SCHALLENBERGER, E. Pulsatile secretion of gonadotropins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during the luteal phase of the oestrous cycle of the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.71, p.479–91, 1984.

WEBB, R.; MITCHELL, M. D.; FALCONER, J.; ROBINSON, J. S. Temporal relationships between peripheral plasma concentrations of oxytocin, progesterone and 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F₂ α during the oestrus cycle and early pregnancy in the ewe. **Prostaglandins**, v.22; p.443–53; 1981.

WEBB, R.; WOAD, K. J.; ARMSTRONG, D. J. Corpus luteum function: local control mechanisms. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.277–285, 2002.

WEEMS, C. W.; WEEMS, Y. S.; RANDEL, R. D. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. **Vet J**, v.171, p.206–28, 2006.

WILDMAN, E. E.; JONES, G. M.; WAGNER, P. E.; BOMAN, R. L.; TROUTT JR, H. F.; LESCH, T. N. A Dairy Cow Body Condition Scoring System and Its Relationship to Selected Production Characteristics. 65(3): 495-501, 1982.

WOCLAWEK-POTOCA, I.; BOBER, A.; KORZEKWA, A.; OKUDA, K.; SKARZYNSKI, D. J. Equol and para-ethyl-phenol stimulate prostaglandin F(2alpha) secretion in bovine corpus luteum: intracellular mechanisms of action. **Prostaglandins & Other Lipides Mediators**, v. 79, n. 3-4, p. 287-297, 2006.

XIE, W.; CHIPMAN, J. G.; ROBERTSON, D. L. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. **Proc Natl Acad Sci**. 88: 2692-2696, 1991.

ZINGG, H. H.; GRAZZINI, E.; BRETON, C. ; LARCHER, A. ; ROZEN, F. ; RUSSO, C. ; GUILLON, G.; MOUILLAC, B. Review. Genomic and non-genomic mechanisms of oxytocin receptor regulation. **Adv Exp Med Biol**, v.449, p.287-95, 1998.