

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**CÂMPUS DE DRACENA**

**AÇÕES DO ESTRADIOL NA SÍNTESE DE PROSTAGLANDINA  
F<sub>2α</sub> EM CÉLULAS ENDOMETRIAIS BOVINAS**

**Teissiane Fernanda de Vasconcelos Ferreira**

Médica Veterinária

**2018**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**CÂMPUS DE DRACENA**

**AÇÕES DO ESTRADIOL NA SÍNTESE DE PROSTAGLANDINA  
F2 $\alpha$  EM CÉLULAS ENDOMETRIAIS BOVINAS**

**Teissiane Fernanda de Vasconcelos Ferreira**

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo da Fonseca**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia –  
UNESP, Campus de Dracena/SP, como parte das  
exigências para obtenção do título de Mestre em  
Ciência e Tecnologia Animal.

**2018**

FICHA CATALOGRÁFICA  
Desenvolvida pela Seção Técnica de Biblioteca e Documentação  
Campus de Dracena

F383a

Ferreira, Teissiane Fernanda de Vasconcelos.

Ações do estradiol na síntese de prostaglandina F2 $\alpha$  em células endometriais bovinas / Teissiane Fernanda de Vasconcelos Ferreira. -- Dracena: [s.n.], 2019.

73 f. : il.

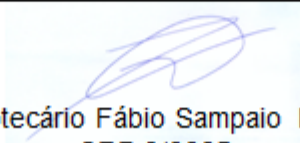
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp). Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena. Área do conhecimento: Produção Animal, 2019.

Orientador: Ricardo da Fonseca

Co-orientador: Claudia Maria Bertan Membrive

Inclui bibliografia.

1. Estradiol. 2. PGF2 $\alpha$ . 3. PKC. 4. PLA2. 5. Células endometriais. I. Título.



Bibliotecário Fábio Sampaio Rosas  
CRB 8/6665



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Dracena



### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Ações do estradiol nas enzimas PKC e PLA2 envolvidas na síntese de PGF2 endometrial em fêmeas bovinas.

**AUTORA: TEISSIANE FERNANDA DE VASCONCELOS FERREIRA**

**ORIENTADOR: RICARDO DA FONSECA**

**COORIENTADORA: CLAUDIA MARIA BERTAN MEMBRIVE**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA E TECNOLOGIA ANIMAL, área: Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. CLAUDIA MARIA BERTAN MEMBRIVE  
Curso de Zootenia / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena

Profa. Dra. JAQUELINE DALBELLO BILLER  
Curso de Engenharia Agrônômica / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológica de Dracena

Profa. Dra. INES CRISTINA GIOMETTI  
Pós-Graduação em Ciência Animal / UNOESTE

Dracena, 21 de dezembro de 2018

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Teissiane Fernanda de Vasconcelos Ferreira – Nascida em 27 de janeiro de 1992, na cidade de Adamantina/SP. Em 2010, ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária pela Fundação Educacional de Andradina - FEA, Andradina/MS. Durante a graduação realizou o estágio curricular na área de reprodução animal, tendo concluído a graduação em março de 2014. Durante 2014 e 2015, exerceu atividade profissional como médica veterinária autônoma, na área de reprodução animal de bovinos de corte. Em março de 2017, ingressou no curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia Animal na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, na área de Produção Animal, sob orientação da Prof. Dr. Ricardo da Fonseca e co-orientação da Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive.

"Ninguém escapa ao sonho de voar, de ultrapassar os limites do espaço onde nasceu, de ver novos lugares e novas pessoas. Mas saber ver em cada coisa, em cada pessoa, aquele algo que a define como especial, um objeto singular, um amigo, é fundamental. Navegar é preciso, reconhecer o valor das coisas e das pessoas, é mais preciso ainda".

Antoine de Saint-Exupéry

## **AGRADECIMENTOS**

Dedico este trabalho primeiramente à Deus, que em todos os momentos me acompanhou em minha trajetória.

A realização desta dissertação de Mestrado foi possível graças a três grandes pessoas, que referencio na sequência, por me ajudarem ao longo do caminho e me influenciarem.

À Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive, por ter ensinado grandes lições ao longo do tempo que pude conviver. E por apoiar todo meu caminho, abrindo possibilidades, principalmente a entrada no Mestrado. Pela sua grande disponibilidade e pela sua dedicação em fazer sempre o melhor. Agradeço imensamente pela dedicação.

Ao Prof. Dr. Ricardo da Fonseca, pela grande ajuda e contribuição para que esta conquista do Mestrado fosse possível.

À Dra. Mariângela Bueno Cordeiro Maldonato, com quem tive o prazer de compartilhar grande parte dos meus dias durante o Mestrado. A quem copieei a determinação.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Animal, em especial ao Coordenador da Pós-Graduação Prof. Dr. Reges Heinrichs, pela valiosa oportunidade do ingresso.

A todos os Professores do programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Animal, pelos valiosos ensinamentos e construtivas discussões.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro ao presente projeto.

Ao Prof. Dr. Mario Binelli, atualmente docente na Universidade da Flórida, pela grandiosa contribuição científica e logística ao presente estudo.

Ao Prof. Dr. William Thatcher, da Universidade da Flórida, pela valiosa contribuição científica e pela doação das células BEND e dos anticorpos para PGF2 $\alpha$  utilizados na técnica de radioimunoensaio.

Ao Dr. Aydyn Guzeloglu, da Universidade da Flórida, pelo processamento das células BEND.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, FCAT - Dracena, por todo o apoio logístico durante a realização do projeto.

Aos funcionários da UNESP de Dracena, pela incondicional colaboração e boa vontade sempre concedidas.

Ao funcionário Daniel Moreto Silvestre, secretário da Pós-Graduação na UNESP de Dracena, pela boa vontade sempre concedida e Jaqueline Piva.

E por último, agradeço a minha família, mãe, pai, esposo, irmã e cunhado pelo apoio que sempre me foi dado para que a realização do Mestrado fosse possível.

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram no planejamento e execução dos experimentos desenvolvidos no presente projeto.

Muito obrigada!!!!!!



## **AÇÕES DO ESTRADIOL NA SÍNTESE DE PROSTAGLANDINA F2 $\alpha$ EM CÉLULAS ENDOMETRIAIS BOVINAS**

**RESUMO** - Em fêmeas bovinas a liberação de prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) endometrial pode ser induzida *in vivo* pelo estradiol (E<sub>2</sub>), entretanto, seu papel ainda não foi esclarecido. Em estudos prévios realizados pelo grupo, o tratamento com E<sub>2</sub> *in vivo* duas horas antes das vacas serem abatidas no 17º dia do ciclo estral, associado à adição de cálcio ionóforo (CI) *in vitro* em explantes endometriais, exacerbou a síntese de PGF2 $\alpha$  quando comparado ao grupo de vacas não tratadas com E<sub>2</sub> e CI. O mesmo foi observado em células endometriais bovinas (BEND) expostas ao E<sub>2</sub> e CI simultaneamente. Considerando que as concentrações plasmáticas de PGF2 $\alpha$  aumentam a partir de 3,5 horas após da aplicação do E<sub>2</sub> *in vivo*, possivelmente tais ações envolvam a síntese de proteínas. Hipotetizou-se que o E<sub>2</sub> estimule a expressão e/ou a atividade das enzimas dependentes de cálcio, especificamente a proteína quinase C (PKC) e fosfolipase A2 citosólica (cPLA2). Assim, objetivou-se analisar o efeito dos inibidores de Proteína G, PKC e PLA2 na síntese de PGF2 $\alpha$  induzida pelo 17 $\beta$ -estradiol e CI em células endometriais bovinas BEND (Experimento 1), e avaliar as proteínas PKC e PLA2 e ERK 1/2, pela técnica de Western Blotting, em explantes endometriais obtidos de fêmeas bovinas abatidas 2 horas após a administração de 17 $\beta$ -estradiol no 17º dia do ciclo estral (Experimento 2). No Experimento 1, células endometriais bovinas (BEND) foram submetidas a ausência ou presença de um inibidor de proteína G - 10 $\mu$ M de Guanosine 5'-{B-thio} difosfato trilitium (Experimento 1A), inibidor de PKC - 10 $\mu$ M de C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> – Bisindolimalimide I (Experimento 1B) ou inibidor de PLA2 - 20 $\mu$ M de AACOCF3 (Experimento 1C), sendo posteriormente tratadas ou não com 17 $\beta$ -estradiol e CI. Os tratamentos foram realizados em triplicata em um total de três repetições. As concentrações de PGF2 $\alpha$  no meio de cultivo foram mensuradas por radioimunoensaio. No Experimento 2, novilhas Nelore cíclicas receberam os tratamentos, com 0mg (n=5) ou 3mg de 17 $\beta$ -estradiol (n=6), ia endovenosa, 17º dia do ciclo estral e foram abatidas 2 horas após. Os explantes endometriais foram avaliados por Western Blotting para as proteínas PKC, PLA2 e ERK1/2. As análises estatísticas dos experimentos foi realizada no programa SAS (SAS Institute, 1988). No experimento 1A, observou-se efeito de repetição (P<0,001) e inibidor (P<0,01), onde os grupos tratados com inibidor da proteína G (Inibidor de Proteína G e Inibidor de Proteína G+CI+ E<sub>2</sub>) apresentaram DIF 12 (concentração de PGF2 $\alpha$  com 12 horas após o tratamento subtraída da concentração de PGF2 $\alpha$  com 0 hora) maior (P<0,01) que os grupos não tratados com o inibidor da proteína G (controle e CI+ E<sub>2</sub>). No experimento 1B, houve efeito de repetição (<0,001) e não houve efeito do inibidor (P=0,2709). No experimento 1C, verificou-se efeito de repetição (P<0,001) e inibidor (P<0,05). As células tratadas com o inibidor de PLA<sub>2</sub> (grupo inibidor de PLA<sub>2</sub> e Inibidor de PLA<sub>2</sub> + CI + E<sub>2</sub>) apresentaram uma DIF 12 menor (P<0,05) que os grupos

não tratados com o inibidor de PLA<sub>2</sub> (controle e CI + + E<sub>2</sub>). No experimento 2, não houve efeito significativo do estradiol no aumento da proteína PKC (P=0,08), PLA<sub>2</sub> (P=0,56) e ERK1/2 (P=0,26). Concluiu-se que, no presente estudo, o E<sub>2</sub> não estimulou a síntese das proteínas PKC e cPLA<sub>2</sub>.

**Palavras-chave:** Células endometriais, Estradiol, PGF<sub>2</sub>α, PKC, PLA<sub>2</sub>

## **ACTIONS OF ESTRADIOL IN THE SYNTHESIS OF PROSTAGLANDINE F2 $\alpha$ IN BOVINE ENDOMETRIAL CELLS**

**ABSTRACT** - In bovine females the release of endometrial prostaglandin F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) can be induced in vivo by estradiol (E2), however, its role has not yet been clarified. In previous studies conducted by the group, treatment with E2 in vivo two hours before cows were slaughtered on the 17th day of the estrous cycle, associated with the addition of ionophore calcium (IC) in vitro in endometrial explants, exacerbated PGF2 $\alpha$  synthesis when compared to group of cows not treated with E2 and CI. The same was observed in bovine endometrial cells (BEND) exposed to E2 and IC simultaneously. Considering that plasma concentrations of PGF2 $\alpha$  increase from 3.5 hours after the application of E2 in vivo, possibly such actions involve the synthesis of proteins. E2 has been hypothesized to stimulate the expression and / or activity of calcium dependent enzymes, specifically protein kinase C (PKC) and cytosolic phospholipase A2 (cPLA2). The objective of this study was to analyze the effect of Protein G, PKC and PLA2 inhibitors on the synthesis of PG $\beta$ 2 $\alpha$  induced by 17 $\beta$ -estradiol and IC in BEND bovine endometrial cells (Experiment 1), and to evaluate the proteins PKC and PLA2 and ERK 1/2 by Western Blotting technique in endometrial explants obtained from bovine females slaughtered 2 hours after administration of 17 $\beta$ -estradiol on the 17th day of the estrous cycle (Experiment 2). In Experiment 1, bovine endometrial cells (BEND) were subjected to the absence or presence of a G-10 $\mu$ M inhibitor of Guanosine 5'- {B-thio} diphosphate trilitium (Experiment 1A), PKC inhibitor - 10 $\mu$ M C25H24N4O2 - Bisindolimalimide I (Experiment 1B) or inhibitor of PLA2 - 20 $\mu$ M AACOCF3 (Experiment 1C), and subsequently treated with or without 17 $\beta$ -estradiol and IC. Treatments were performed in triplicate for a total of three replicates. The concentrations of PGF2 $\alpha$  in the culture medium were measured by radioimmunoassay. In Experiment 2, cyclic Nelore heifers were treated with 0mg (n = 5) or 3mg of 17 $\beta$ -estradiol (n = 6), intravenous at day 17 of the estrous cycle and slaughtered 2 hours later. Endometrial explants were evaluated by Western blotting for PKC, PLA2 and ERK1 / 2 proteins. Statistical analysis of the experiments was performed in the SAS program (SAS Institute, 1988). In the experiment 1A, a repetitive effect (P <0.001) and inhibitor (P <0.01) were observed, where the G protein inhibitor (Protein G Inhibitor and Protein G Inhibitor + CI + E2) treated groups showed DIF 12 (concentration of PGF 2 $\alpha$  at 12 hours post treatment subtracted from PGF 2 $\alpha$  concentration with 0 hour) higher (P <0.01) than the groups not treated with the G protein inhibitor (control and CI + E2). In experiment 1B, there was a repetition effect (<0.001) and there was no inhibitor effect (P = 0.2709). In the experiment 1C, there was a repetition effect (P <0.001) and inhibitor (P <0.05). The cells treated with the PLA2 inhibitor (PLA2 inhibitor group and PLA2 + CI + E2 inhibitor) had a lower DIF 12 (P <0.05) than the groups not treated with the PLA2 inhibitor (control and CI + E2). In Experiment 2, there was no significant effect of estradiol on the increase of PKC (P =

0.08), PLA2 (P = 0.56) and ERK1 / 2 (P = 0.26). It was concluded that, in the present study, E2 did not stimulate the synthesis of PKC and cPLA2 proteins.

**Key words:** Endometrial cells , Estradiol, PGF2a, PKC, PLA2

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                     |                                               |
|---------------------|-----------------------------------------------|
| AA                  | Ácido araquidônico                            |
| AACOCF <sub>3</sub> | Araquidonil-trifluorometil-cetona             |
| BEN                 | Células endometriais bovinas                  |
| BIM I               | Bisindolylmaleimide I                         |
| Ca <sup>++</sup>    | Cálcio                                        |
| CI                  | Cálcio ionóforo                               |
| COX-2               | Ciclooxigenase 2                              |
| cPLA <sub>2</sub> s | Enzimas cálcio-dependentes                    |
| DAG                 | Diacilglicerol                                |
| E <sub>2</sub>      | Estradiol                                     |
| ER                  | Receptores de estrógeno                       |
| ERK ½               | Sinal extracelular regulado por kinases 1 e 2 |
| GDP                 | Guanosina difosfato                           |
| GEF                 | Nucleotídeos de guanina                       |
| GTP                 | Guanosina trifosfato                          |
| IP <sub>3</sub>     | Fosfatidilinositol trifosfato                 |
| iPLA <sub>2</sub>   | Isoformas cálcio-independentes                |

|                  |                                        |
|------------------|----------------------------------------|
| LH               | Hormônio luteinizante                  |
| MAPK             | Quinases reguladas por mitógenos       |
| OT               | Ocitocina                              |
| OTR              | Receptores ocitocina                   |
| P4               | Progesterona                           |
| PDBu             | Forbol éster                           |
| PGF2 $\alpha$    | Prostaglandina F2 $\alpha$             |
| PGH <sub>2</sub> | Prostaglandina H <sub>2</sub>          |
| PGFM             | 15-ceto-13,14-diidroprostaglandina F2a |
| PGFS             | PGF sintase                            |
| PKC              | Proteína quinase-C                     |
| PLA <sub>2</sub> | Fosfolipase A <sub>2</sub>             |
| PLA2G4A          | PLA2-dependente de cálcio              |
| PLA2G4A          | 5-lipoxigenase                         |
| $\alpha$         | Alfa                                   |
| $\beta$          | Beta                                   |
| $\gamma$         | Gama                                   |
| $\delta$         | Delta                                  |
| $\epsilon$       | Épsilon                                |

|           |        |
|-----------|--------|
| $\eta$    | Eta    |
| $\theta$  | Teta   |
| $Z$       | Zeta   |
| $\lambda$ | Lambda |

## LISTA DE FIGURAS

|           |                                                                                                                                                                             | Página |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Figura 1  | Modelo hipotético, proposto por Membrive et al. 2014, ilustrando o possível mecanismo de atuação do E <sub>2</sub> na síntese de PGF2α em células endometriais bovinas..... | 24     |
| Figura 2  | Estrutura química do Guanosine (C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>11</sub> P <sub>2</sub> ), inibidor da proteína G.....                                | 30     |
| Figura 3  | Estrutura química da Bisindolylmaleimide I (BIM I - C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> ), inibidor seletivo de PKC.....                          | 33     |
| Figura 4  | Estrutura química AACOCF <sub>3</sub> (C <sub>21</sub> H <sub>31</sub> F <sub>3</sub> O), inibidor de PLA <sub>2</sub> .....                                                | 35     |
| Figura 5  | Células BEND (American Type Culture Collection ATCC no CRL-2398) cultivadas in vitro.....                                                                                   | 39     |
| Figura 6  | Ilustração do delineamento experimental do cultivo celular, administração dos tratamentos nos diferentes grupos, coletas de amostras e mensuração de PGF2α.....             | 40     |
| Figura 7  | Ilustração do delineamento experimental do cultivo celular, administração dos tratamentos, coletas de amostras e mensuração de PGF2α.....                                   | 42     |
| Figura 8  | Ilustração do delineamento experimental do cultivo celular, administração dos tratamentos, coletas de amostras e mensuração de PGF2.....                                    | 43     |
| Figura 9  | Ilustrando os mecanismos de atuação dos antagonistas de proteínas envolvidas na síntese de PGF2α na célula endometrial.....                                                 | 44     |
| Figura 10 | Protocolo de sincronização das ovulações utilizado no Experimento 2. Para a sincronização das ovulações.....                                                                | 48     |



|           |                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 11 | Experimento 2 - Ilustração da administração dos tratamentos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> e coletas de amostras e mensuração de proteínas pela técnica de Western Blotting.....                                                                                                       | 49 |
| Figura 12 | Experimento 1A: Concentrações de PGF2 $\alpha$ (pg/mL), nos tempos 0 e 12 horas, para as células endometriais bovinas (BEND) tratadas com meio controle, inibidor proteína G, inibidor de proteína G + CI + E <sub>2</sub> e CI + E <sub>2</sub> .....                                   | 54 |
| Figura 13 | Experimento 1A: Concentrações de PGF2 $\alpha$ (pg/mL), em relação à DIF entre os tempos 0 e 12 horas (DIF 12), para as células endometriais bovinas (BEND) tratadas com meio controle, inibidor de proteína G, inibidor de proteína G + CI + E <sub>2</sub> e CI + E <sub>2</sub> ..... | 55 |
| Figura 14 | Experimento 1B: Concentrações de PGF2 $\alpha$ (pg/mL), nos tempos 0 e 12 horas, para as células endometriais bovinas (BEND) tratadas com meio controle, inibidor de PKC, inibidor de PKC + CI + E <sub>2</sub> e CI + E <sub>2</sub> .....                                              | 56 |
| Figura 15 | Experimento 1B: Concentrações de PGF2 $\alpha$ (pg/mL), em relação à DIF entre os tempos 0 e 12 horas, para as células endometriais bovinas (BEND) tratadas com meio controle, inibidor de PKC, inibidor de PKC + CI + E <sub>2</sub> e CI + E <sub>2</sub> .....                        | 57 |
| Figura 16 | Experimento 1C: Concentrações de PGF2 $\alpha$ (pg/mL), nos tempos 0 e 12 horas, para as células tratadas com meio controle, inibidor de PLA2, inibidor de PLA2 + CI + E <sub>2</sub> e CI + E <sub>2</sub> .....                                                                        | 58 |
| Figura 17 | Experimento 1C: Concentrações de PGF2 $\alpha$ (pg/mL), em relação a DIF entre os tempos 0 e 12 horas, para as células tratadas com meio controle, inibidor de PLA2, inibidor de PLA2 + CI + E <sub>2</sub> e CI + E <sub>2</sub> .....                                                  | 59 |

Figura 18 Experimento 2: Médias  $\pm$  erro padrão da porcentagem de intensidade de densidade óptica (X 1000 pixels) em explantes endometriais de fêmeas bovinas não tratadas (Controle) ou tratadas com 3mg de 17B-estradiol (Grupo E<sub>2</sub>), via intramuscular, no 17<sup>o</sup> dia do ciclo estral, avaliados para as proteínas PKC, PLA2 e ERK1/2 pela técnica de Western Blotting.....

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                          | Página    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                                                 | <b>20</b> |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                                                                                                      | <b>22</b> |
| 2.1 Efeitos do Estradiol na Liberação de PGF2 $\alpha$ Endometrial.....                                                                  | 22        |
| 2.2 Características Moleculares da Proteínas Envolvidas na<br>Síntese de PGF2 $\alpha$ .....                                             | 28        |
| 2.2.1 Proteína G e seus inibidores.....                                                                                                  | 28        |
| 2.2.2 Proteína quinase C (PKC) e seus inibidores.....                                                                                    | 30        |
| 2.2.3 Proteína fosfolipase A2 (PLA2) e seus inibidores.....                                                                              | 34        |
| 2.2.4 Quinases reguladas por sinal extracelular (ERKs).....                                                                              | 37        |
| <b>3 HIPÓTESE .....</b>                                                                                                                  | <b>37</b> |
| <b>4 OBJETIVOS.....</b>                                                                                                                  | <b>37</b> |
| <b>5 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                                                                         | <b>37</b> |
| <b>5.1 Experimento 1.....</b>                                                                                                            | <b>37</b> |
| 5.1.1 Local do experimento.....                                                                                                          | 37        |
| 5.1.2 Delineamento experimental.....                                                                                                     | 38        |
| 5.1.2.1 Experimento 1A - Efeito do inibidor da proteína G na<br>síntese de PGF2 $\alpha$ induzida pelo estradiol e cálcio ionóforos..... | 39        |
| 5.1.2.2 Experimento 1B - Efeito do inibidor da PKC na síntese<br>de PGF2 $\alpha$ induzida pelo estradiol e calico ionóforo.....         | 41        |
| 5.2.2.3 Experimento 1C – Efeito do inibidor da PLA2 na síntese<br>de PGF2 $\alpha$ induzida pelo estradiol e calico ionóforos.....       | 42        |
| 5.1.3 Coleta das amostras de meio de cultivo.....                                                                                        | 45        |
| 5.1.4 Radioimunoensaio para PGF2 $\alpha$ .....                                                                                          | 45        |
| 5.1.5 Análise estatística.....                                                                                                           | 46        |
| <b>5.2 Experimento 2.....</b>                                                                                                            | <b>46</b> |

|                                                                  |           |
|------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.2.1 Local do experimento.....                                  | 46        |
| 5.2.2 Animais.....                                               | 47        |
| 5.2.3 Sincronização das ovulações.....                           | 47        |
| 5.2.4 Tratamento in vivo.....                                    | 49        |
| 5.2.5 Isolamento e armazenamento dos explantes endometriais..... | 50        |
| 5.2.6 Extração e quantificação de proteínas.....                 | 50        |
| 5.2.7 Western blotting.....                                      | 50        |
| 5.2.8 Análise estatística.....                                   | 53        |
| <b>6 RESULTADOS.....</b>                                         | <b>53</b> |
| <b>6.1 Experimento 1.....</b>                                    | <b>53</b> |
| 6.1.1 Experimento 1A.....                                        | 53        |
| 6.1.2 Experimento 1B.....                                        | 55        |
| 6.1.3 Experimento 1C.....                                        | 57        |
| <b>6.2 Experimento 2.....</b>                                    | <b>59</b> |
| <b>7 DISCUSSÃO.....</b>                                          | <b>61</b> |
| <b>7.1 Experimento 1.....</b>                                    | <b>61</b> |
| <b>7.2 Experimento 2.....</b>                                    | <b>63</b> |
| <b>8 CONCLUSÃO.....</b>                                          | <b>65</b> |
| <b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                         | <b>66</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

Na bovinocultura de corte a produtividade está diretamente relacionada à eficiência reprodutiva das fêmeas. Para que os índices reprodutivos possam ser melhorados é necessária a melhor compreensão dos mecanismos endócrinos, fisiológicos e moleculares envolvidos no ciclo estral. Dentre os importantes eventos fisiológicos, a luteólise ocasionada entre os dias 15 e 19 do ciclo estral, torna-se fundamental para determinar a ocorrência de um novo estro e uma nova chance de acasalamento. A regressão funcional do corpo lúteo determina a drástica redução das concentrações plasmáticas de progesterona (P4), evento fisiológico fundamental para o maior crescimento do folículo ovulatório da última onda de crescimento folicular, determinação das características físicas e psíquicas de estro e a ovulação (PUGLIESI *et al.*, 2017).

Em fêmeas bovinas um “período crítico”, entre os dias 15 e 19 do ciclo estral, é determinado quando o estado fisiológico reprodutivo da fêmea deve ser definido para a manutenção do corpo lúteo e da prenhez ou para o desencadeamento da luteólise e do estro. Na ocorrência de uma prenhez, o conceito (embrião e membranas associadas) deve tornar-se capaz de enviar sinais anti-luteolíticos apropriados ao endométrio e este responder a tais sinais, inibindo a síntese de prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) endometrial. Frequentemente, mesmo na presença de um conceito, tal evento fisiológico não é bem sucedido resultando na ocorrência da luteólise, na mortalidade embrionária precoce e em perdas representativas na pecuária.

Em fêmeas bovinas, é de amplo conhecimento que a PGF2 $\alpha$  é o principal agente luteolítico e tem como função promover a luteólise (CARAMBULA *et al.*, 2002; MEIDAN *et al.*, 1999). Sabe-se ainda que a estimulação da síntese de PGF2 $\alpha$  envolve fatores endócrinos como o estradiol (E<sub>2</sub>), ocitocina (OT), P4 e hormônio luteinizante (LH). O papel do E<sub>2</sub> neste contexto foi pouco estudado. Contudo, sabe-se que durante o

período crítico a supressão do  $E_2$ , por meio da irradiação ou cauterização de folículos retarda a luteólise (HUGHES *et al.*, 1987). Além disso, vacas prenhes apresentam diminuição do  $E_2$  circulante (Pritchard *et al.*, 1994), provavelmente em função de uma redução no desenvolvimento folicular e na produção de  $E_2$  pelo folículo (THATCHER *et al.*, 1991). Em contrapartida, a administração de  $E_2$  em vacas cíclicas estimula a luteólise e promove o estro (THATCHER *et al.*, 1986) e quando aplicado em vacas no 18º dia da prenhez estimula apenas de maneira modesta a produção de  $PGF2\alpha$  (THATCHER *et al.*, 1991). Sugere-se que, possivelmente a presença do embrião atenua os efeitos do  $E_2$ . Diante destas informações sugere-se que o  $E_2$  desempenha um papel crucial na luteólise, entretanto, os mecanismos pelos quais o  $E_2$  desempenha tal função ainda permanecem desconhecidos.

A síntese de  $PGF2\alpha$  no endométrio de fêmeas bovinas resulta de uma complexa cascata de eventos intracelulares que ocorrem de maneira altamente coordenada. Tais eventos envolvem a ativação seqüencial de várias proteínas como a proteína acopladora do GTP (Guanosina trifosfato ativa), fosfolipase C (PLC), proteína quinase-C (PKC), fosfolipase  $A_2$  ( $PLA_2$ ) e ciclooxigenase 2 (COX-2). Cunha (2004) sugeriu que a produção de  $PGF2\alpha$  *in vitro* não é resultado unicamente da ativação de enzimas, mas da dependência de eventos complexos responsáveis pela expressão de proteínas celulares. Segundo o modelo hipotético proposto por Membrive (2014), o  $E_2$  possivelmente estimule a síntese das proteínas PKC e  $PLA_2$ , ambas dependentes de cálcio e envolvidas na cascata geradora de  $PGF2\alpha$ . No presente estudo, objetivo-se verificar a ação do  $E_2$  na síntese e atividade de proteínas específicas envolvidas na produção de  $PGF2\alpha$ , especificamente, da PKC e  $PLA_2$ . O melhor entendimento destes mecanismos, contribuiria na elaboração de estratégias anti-luteolíticas que possam reduzir a mortalidade embrionária durante o período crítico.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Efeitos do Estradiol na Liberação de PGF2 $\alpha$ Endometrial

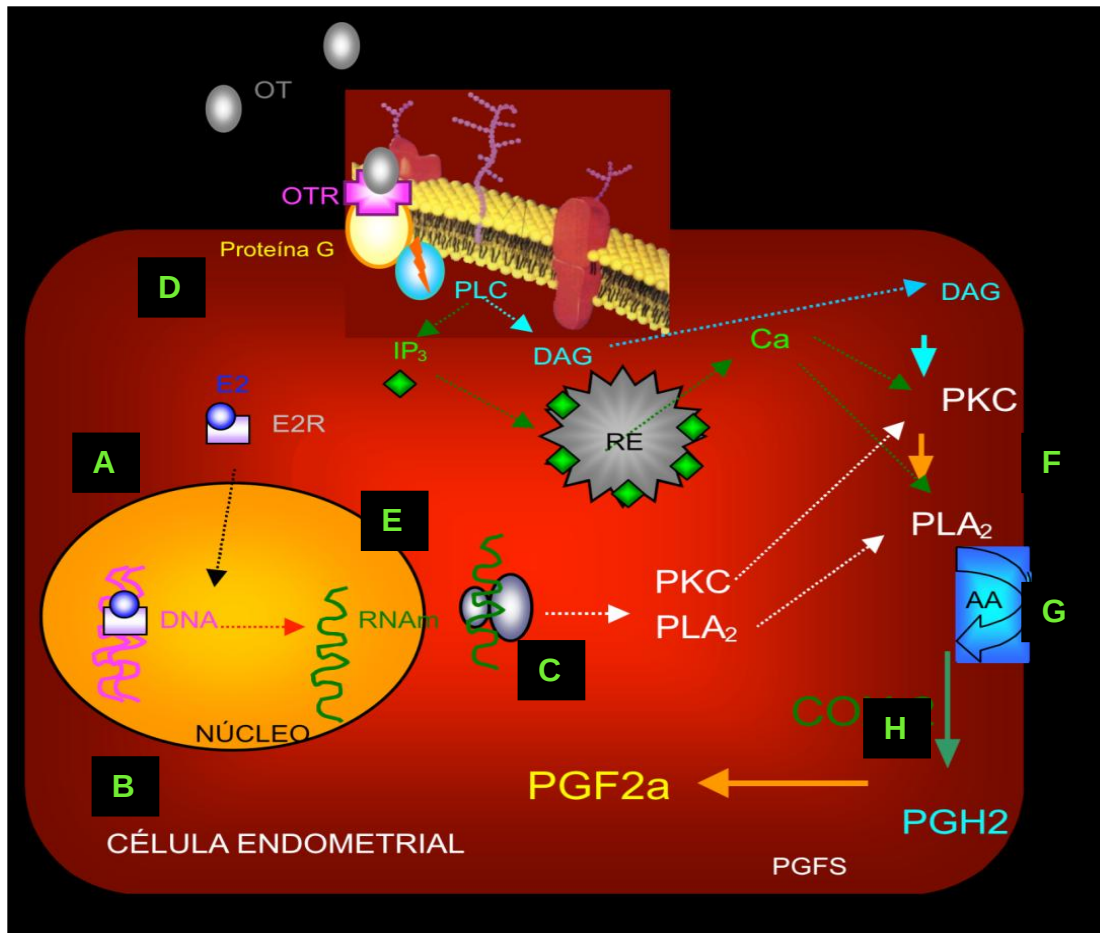
É de amplo conhecimento que a PGF2 $\alpha$ , sintetizada principalmente pelas células epiteliais da região intercaruncular do endométrio (KIM; FORTIER, 1995; ASSELIN *et al.*, 1996; SKARZYNSKI *et al.*, 1999) é o principal agente luteolítico em fêmeas bovinas. A PGF2 $\alpha$  tem como função bloquear a síntese de progesterona no corpo lúteo (McCRACKEN *et al.*, 1973; MEIDAN *et al.*, 1999) determinando o final da fase luteínica e do ciclo estral (DAVIS *et al.*, 1988; CHEN, *et al.*, 1998). Em fêmeas bovinas, a luteólise ocorre normalmente entre os dias 15º e 19º do ciclo estral.

Em estudos sobre a relação da aplicação de E<sub>2</sub> na síntese de PGF2 $\alpha$ , Knickerbocker *et al.* (1986) verificaram aumento das concentrações de PGF2 $\alpha$  na veia uterina de vacas tratadas com E<sub>2</sub>. Thatcher *et al.* (1986) administraram E<sub>2</sub> em vacas no 15º dia do ciclo estral e observaram a ocorrência da luteólise seguida de estro. Em experimentos *in vivo*, verificou-se que a concentração sérica de 15-ceto-13,14-diidroprostaglandina F2a (PGFM), principal metabólito da PGF2 $\alpha$  (PIPER *et al.*, 1970), aumentou 15 minutos após a injeção de OT, e quando houve administração de E<sub>2</sub> houve aumento nas concentrações somente 3,5 horas após (CASTRO; PAULA, 2003). Sugere-se por tais evidências, que o E<sub>2</sub> estimularia a síntese de proteínas envolvidas na cascata geradora de PGF2 $\alpha$ , enquanto a OT ativaria enzimas presentes no meio intracelular.

Da Cunha (2004) sugeriu que a produção de PGF2 $\alpha$  *in vitro* parece não ser resultado unicamente da ativação de enzimas, mas da dependência de eventos complexos responsáveis pela expressão de proteínas celulares. De acordo com Membrive (2014), o tratamento com E<sub>2</sub> *in vivo* duas horas antes das vacas serem abatidas no 17º dia do ciclo estral, associado à adição de cálcio ionóforo (CI) *in vitro* em

explantes endometriais provenientes desses animais, exacerbou a síntese de  $\text{PGF2}\alpha$  quando comparado ao grupo de vacas não tratadas com  $\text{E}_2$  *in vivo* e em explantes não tratados com CI *in vitro*. O mesmo foi observado em experimentos utilizando células endometriais bovinas (BEND) expostas ao  $\text{E}_2$  e CI simultaneamente. Segundo o modelo hipotético sugerido por Membrive (2014), representado na **Figura 1**, possivelmente o  $\text{E}_2$  estimule a síntese das proteínas PKC e PLA2, ambas dependentes de cálcio e fundamentais para a síntese de  $\text{PGF2}\alpha$ .





**Figura 1.** Modelo hipotético, proposto por Membrive et al., 2014, ilustrando o possível mecanismo de atuação do E2 na síntese de PGF2α na célula endometrial: (A) o estradiol (E<sub>2</sub>) ativa receptores específicos (E<sub>2</sub>R) no citoplasma; (B) tal complexo (E<sub>2</sub>-E<sub>2</sub>R) se liga a sequências específicas de DNA e estimula a transcrição de RNA mensageiro (RNAm) para as proteínas quinase C (PKC) e/ou fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>); (C) as concentrações de PKC e/ou PLA<sub>2</sub>, são aumentadas na célula endometrial; (D) a ocitocina (OT) se liga a receptores específicos (OTR) na membrana celular e tal complexo (OT-OTR) altera a estrutura conformacional da proteína G que promove a clivagem da fosfolipase C (PLC) em diacilglicerol (DAG) e fosfatidilinositol trifosfato (IP<sub>3</sub>); (E) o IP<sub>3</sub> se liga a receptores específicos no retículo endoplasmático e promove a liberação de cálcio (Ca<sup>++</sup>) do retículo para o citoplasma promovendo um aumento da concentração de Ca<sup>++</sup> no citosol; (F) a PKC é ativada na presença de DAG e Ca<sup>++</sup>; (G) A PLA<sub>2</sub> é ativada na presença de PKC e Ca<sup>++</sup> e promove a mobilização de ácido araquidônico (AA); (H) o AA da membrana celular e este por ação da ciclooxigenase (COX-2) é convertido em prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>); (I) a PGH<sub>2</sub> por ação da PGF sintase (PGFS) é convertida em prostaglandina F<sub>2</sub>α (PGF<sub>2</sub>α).

A síntese de PGF2 $\alpha$  resulta de uma cascata de eventos intracelulares altamente coordenados envolvendo a ativação sequencial de várias proteínas: proteína G, PLC, PKC, PLA2 e COX-2, dentre outras. Burns *et al.* (1997) descreveram um modelo para a síntese de PGF2 $\alpha$  em células epiteliais do endométrio. Em tal modelo, a OT liga-se aos seus receptores, e estes associados à proteína G ativam a PLC, a qual ao ser ativada cliva o fosfatidilinositol bifosfato (PIP<sub>2</sub>) em inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG). O IP<sub>3</sub> liga-se a receptores no retículo endoplasmático, promovendo a liberação de cálcio do interior do mesmo para o citosol. O DAG ativa a PKC, também dependente de cálcio (ALBERTS *et al.*, 1997). A PKC ativada induz a via das quinases reguladas por mitógenos (MAPK) e a ERK1/2 fosforila a cPLA2 na serina 505, assim ocorre translocação da cPLA2 para a membrana, e então, a PLA2 cliva a fosfatidilcolina liberando ácido araquidônico (AA) (GIJON; LESLIE, 1999). Finalmente, o AA livre é convertido pela enzima COX-2 em prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) e esta em PGF2 $\alpha$  pela ação da PGF sintase, em especial a AKR1B1 E AKR1C3 (FORTIER *et al.*, 2008).

Os receptores de estrógeno (ER), subtipos ER $\alpha$  e ER $\beta$ , foram identificados em células endometriais bovinas (ROSENFELD *et al.*, 1998). De acordo com Razandi *et al.* (1999), a maior ação dos hormônios esteróides ocorre pela ativação dos ER nucleares que ocasionam efeitos na transcrição de genes específicos. Tais autores também verificaram que os ER de membrana nas células de ovário de hamster ativaram proteína G e ERK1/2. Acconcia e Marino (2003) verificaram um sinergismo entre as ações moleculares genômica e não genômica do E<sub>2</sub> induzindo a transcrição de genes, sendo a ativação da via ERK1/2 a responsável pela fosforilação da cPLA2, essencial para o E<sub>2</sub> induzir a atividade por ambas as vias.

Schwartz *et al.* (2002) também identificaram efeitos sinérgicos entre as ações genômica e não genômica do E<sub>2</sub> sobre o crescimento de condrócitos da cartilagem de ratas. Esses autores observaram que o E<sub>2</sub> exerceu efeitos diretos sobre a membrana dos condrócitos, causando um rápido aumento na atividade da PKC. No mesmo estudo,

o tamoxifen inibiu de forma dose-dependente a PKC induzida pelo  $E_2$  e pelo  $E_2$ -BSA (estrógeno associado à albumina sérica bovina), o qual não é capaz de atravessar a membrana celular, sugerindo que o  $E_2$  atue sobre a membrana. Ao testarem um antagonista de ER (ICI 182780) e um agonista de ER (dietilestilbestrol), nenhum deles afetou a resposta da PKC estimulada pelo  $E_2$  ou pelo  $E_2$ -BSA nos condrócitos.

Boyan *et al.* (2003) observaram que o  $E_2$  e o  $E_2$ -BSA induziram rapidamente a PKC $\alpha$  tanto em células tumorais humanas positivas quanto negativas para a presença de ER, via PLC-dependente de fosfatidilinositol e proteína G (comprovado pela inibição específica com GDP $\beta$ S), mas não dependente de PLA2 ou AA. Neste estudo, o Tamoxifen também bloqueou a PKC-dependente de  $E_2$ , diferentemente do ICI 182780 que apenas reduziu a síntese de DNA. Os resultados sugeriram que o  $E_2$  aumenta a atividade da PKC por uma via envolvendo a membrana celular, e que o tamoxifen reduz a atividade da PKC através de mecanismos não dependentes de ER $\alpha$  e ER $\beta$ . O domínio C2 da região regulatória da PKC é o sítio de ligação para o cálcio.

A PLA2c também apresenta um domínio de ligação para o cálcio (Nalefski *et al.*, 1994) e na presença deste, liga-se à membrana plasmática (CLARK *et al.*, 1991). A PKC ativa a PLA2 em muitas células, e o aumento da atividade da PLA2 foi associado ao aumento da síntese de PGF2 $\alpha$  (DANET-DESNOYERS *et al.*, 1995; BURNS *et al.*, 1997). O aumento nas concentrações de ERK1/2 fosforilada foi correlacionado com o aumento na quantidade de PLA2c e mobilização de AA (BURNS *et al.*, 2001). A PLA2-dependente de cálcio (PLA2G4A) exibe maior seletividade por lipídeos contendo AA do que outras cPLA2, por isso, essa enzima tem sido primariamente associada com a geração direta de AA (TITHOF *et al.*, 2007).

Evidenciou-se em alguns estudos que a melitina, um estimulador da atividade da PLA2, promoveu a liberação de PGF2a no endométrio bovino; enquanto que o ácido aristolóquico, um inibidor da atividade da PLA2, bloqueou a liberação de PGF2a induzida por OT, por melitina e por AIF<sup>-4</sup>, um estimulador inespecífico de proteína G,

porém não completamente. A partir dos efeitos da melitina e do ácido aristolóquico sugeriu-se que a PLA2 poderia mediar os efeitos estimulatórios da OT sobre a secreção de PGF2a (BURNS *et al.*, 1997).

Burns *et al.* (2001) detectaram concentração de ERK1/2 quatro vezes maior no grupo de explantes endometriais ovinos que receberam OT, e também observaram a inibição da ERK1/2 com PD98059, e que a secreção de PGF2a induzida por OT foi bloqueada de maneira dose-dependente. Chen *et al.* (2004) também observaram que o PD98059 inibiu a fosforilação de ERK1/2 em células endoteliais de artérias uterinas. No mesmo estudo, o E<sub>2</sub> aumentou a fosforilação de ERK1/2 por 60 minutos e a resposta máxima foi aos 5 minutos, porém, não alterou a quantidade total de ERK1/2 nas células do endotélio arterial. O uso de ICI 182780, por 60 minutos, atenuou quase completamente a fosforilação de ERK 1/2 induzida pelo E<sub>2</sub>.

Burlando *et al.* (2002) observaram que o E<sub>2</sub> aumentou a concentração de cálcio livre no citosol em células sanguíneas de mexilhão, enquanto que a presença de um quelante de cálcio preveniu a ação do E<sub>2</sub> em ativar os lisossomos dessas células. Do mesmo modo, o uso de um inibidor de cPLA2-dependente de cálcio também preveniu quase completamente o efeito do E<sub>2</sub> sobre os lisossomos. O uso de ionóforo de cálcio A23187 (CI) resultou em efeitos similares sobre o cálcio intracelular e lisossomos. A exposição ao E<sub>2</sub> também ocasionou a translocação da cPLA2 para a membrana celular.

Thomas *et al.* (2006) constataram que o E<sub>2</sub> aumentou a concentração intracelular de cálcio rapidamente nas células MCF-7 humanas, e que esta resposta foi abolida após o uso de um inibidor de PLA2, a quinacrina, ou após um inibidor de COX-2, a indometacina. Por meio deste estudo, verificaram que ocorreu translocação da cPLA2 para a membrana celular após o estímulo com E<sub>2</sub>; além disso, a fosforilação e a translocação da cPLA2 foram sensíveis à inibição da ERK e ocorreram simultaneamente com a ativação da ERK. A fosforilação da cPLA2 pode ser estimulada pelo E<sub>2</sub>-BSA, no entanto, foi bloqueada pelo antagonista de ER.

Binelli *et al.* (2000) observaram que o forbol éster (PDBu), um indutor de PKC, estimulou a liberação de PGF2 $\alpha$  pelas células BEND entre 3 e 12 horas de incubação, enquanto que a expressão das proteínas COX-2 e PLA2 foi observada por 6 e 12 horas respectivamente. Guzeloglu *et al.* (2004) identificaram as proteínas PKC $\alpha$  e PKC $\epsilon$  às 3 e 6 horas de incubação no citosol e na membrana celular de células BEND não estimuladas; além disso, as células BEND estimuladas por PDBu produziram mais PGF2a do que o grupo controle, enquanto que o uso de um inibidor de PKC aboliu a secreção de PGF2 $\alpha$  induzida pelo PDBu. A partir desses dados, sugere-se que o E<sub>2</sub> estimule a expressão e/ou a atividade das enzimas PKC e cPLA2, e estas na presença de CI são ativadas ao máximo promovendo o aumento da síntese de PGF2 $\alpha$ .

## **2.2 Características Moleculares da Proteínas Envolvidas da Síntese de PGF2 $\alpha$**

### **2.2.1 Proteína G e seus inibidores**

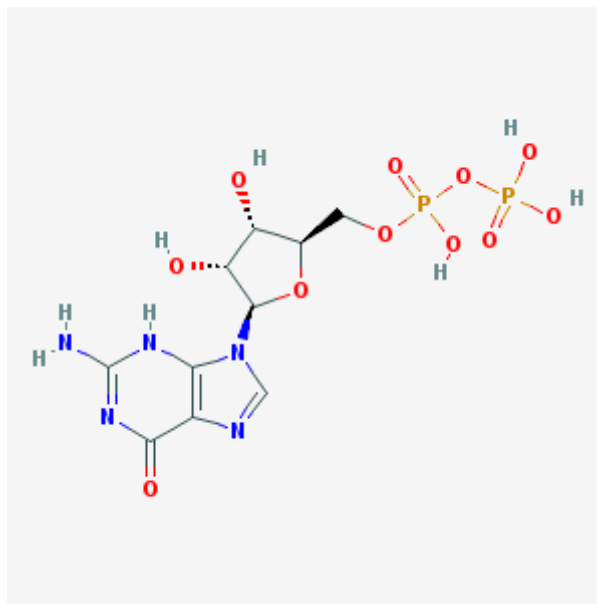
As proteínas G fazem parte de uma superfamília que atualmente compreendem mais de 50 proteínas, possuem alto peso molecular e são formadas por três polipeptídios distintos, chamados heterotrímeros  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . São proteínas que encontram-se acopladas a receptores no meio intracelular da célula, e quando ativadas podem migrar pelo citosol e ativar enzimas amplificadoras ou canais iônicos, determinando a transdução de sinais.

Os receptores acoplados á proteína G são responsáveis por grande parte das respostas celulares que ocorrem no organismo, tais receptores que transmitem o sinal celular via proteínas G possuem uma região extracelular e uma região transmembrana na qual transpassam a membrana com sete domínios hidrofóbicos, sendo denominados

receptores 7TM, com grupos guanílicos guanosina difosfato (GDP) e guanosina trisfosfato (GTP) (MOURA; VIDAL, 2011).

Desta forma quando um agonista liga-se ao receptor acoplado à proteína G, ocorre uma alteração na conformação do receptor, que possibilita o acoplamento ao heterotrímero da proteína G. Este heterotrímero correspondente as subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Essa alteração na conformação faz com que o fator de troca de nucleotídeos de guanina (GEF) induza a troca de GDP por GTP na subunidade  $\alpha$ . A ligação com o GTP por sua vez ativa a subunidade  $\alpha$  e faz com que ela libere o dímero  $\beta\gamma$  e o receptor, deste modo, a subunidade  $\alpha$  ligada ao GTP e o heterodímero  $\beta\gamma$  transformam-se em moléculas sinalizadoras ativas que iniciam cascatas de sinalização intracelular ativando efetores.

A proteína G permanece ativa até que o GTP ligado à subunidade  $\alpha$  seja hidrolisado em GDP pela atividade GTPase intrínseca dessa subunidade. A ligação com o GDP devolve a afinidade da subunidade  $\alpha$  pelo dímero  $\beta\gamma$ , encerrando o ciclo de transdução de sinal e formando novamente o complexo basal inativo, que pode ser reativado por uma nova ligação de um ligante ao receptor. Desta forma portanto, age o inibidor da proteína G escolhido. Fazendo com que não ocorra a troca de nucleotídeos GDP para GTP (Figura 2).



**Figura 2.** Estrutura química do Guanosine (C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>11</sub>P<sub>2</sub>), inibidor da proteína G. Fonte (PUBCHEM, 2015).

### 2.2.2 Proteína quinase C (PKC) e seus inibidores

A PKC faz parte de uma família de proteínas serina/treonina quinases que mediante ativação determinam inúmeras respostas intracelulares (TOKER, 1998). Tal enzima participa de várias etapas do desenvolvimento do sistema nervoso, mediando eventos proliferativos de diferenciação e apoptose (SINGER, 1996). Entretanto, sua atividade não se restringe ao período do desenvolvimento, visto que durante a vida adulta, a PKC controla várias respostas celulares tais como a ativação plaquetária, remodelamento do citoesqueleto de actina e modulação de canais iônicos (TOKER, 1998).

Ao longo dos anos, diferentes grupos de pesquisa vêm estudando os mecanismos de regulação da atividade da PKC. Tal proteína é composta de duas subunidades, designadas de  $\alpha$  e  $\beta$ . A subunidade  $\alpha$  é caracterizada como regulatória e

apresenta os domínios C1 e C2. O domínio C1 é responsável pela ligação da molécula ao DAG e ao PMA. O domínio C2 possibilita a ligação da molécula com o cálcio. A subunidade  $\beta$  representa a porção catalítica, altamente conservada dentre as diferentes isoformas. Tal subunidade, apresenta os domínios C3 responsável pela ligação ao ATP e o domínio C4 responsável pela ligação ao substrato (MICHIE; NAKAGAWA, 2005).

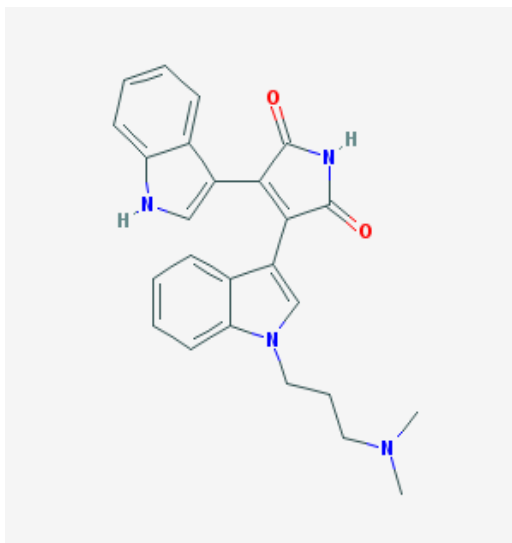
De acordo com Michie e Nakagawa (2005), a família das proteínas quinases C é composta por mais de 10 isoformas, que inicialmente foram subdivididas em 3 classes ou subfamílias. A classe convencional é representada pelas isoenzimas  $\alpha$  (alfa), com peso molecular de 76,83 kDa e formadas por uma sequência de 672 aminoácidos. A classe  $\beta$  (beta), subdividida em  $\beta$ I (beta I) e  $\beta$ II (beta II), apresenta peso molecular de 76,91 kDa e são formadas por uma sequência de 673 aminoácidos. A classe  $\gamma$  (gama), com peso molecular de 77,15 kDa, é formada por uma sequência de 682 aminoácidos. Estas três isoenzimas apresentam como característica sítios de ligação para o éster de forbol e para o cálcio. A ativação destas isoenzimas são dependentes de cálcio, DAG, fosfatidilserina e ácido fosfatídico. A classe nova é representada pelas isoenzimas  $\delta$  (delta),  $\epsilon$  (épsilon),  $\eta$  (eta) e  $\theta$  (teta) cuja ativação independe de cálcio. Estas enzimas são ativadas por DAG, ácido fosfatídico, fosfatidilserina, fosfatidilinositol e forbol éster. A classe atípica é composta pelas isoenzimas  $\zeta$  (zeta) e  $\lambda$  (lambda, também conhecida como iota), são cálcio independentes e possuem um domínio C1 modificado que não permite a interação com o DAG e não apresentam sítio de ligação para o éster de forbol, não sendo portanto por este ativadas. Diversos trabalhos possibilitaram verificar a capacidade de ativação destas enzimas por fosfatidilserina, ácidos graxos, fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato, ceramida e ácido fosfatídico.

Uma das abordagens mais simples para estudar o papel desempenhado pela PKC em processos celulares é inibir a atividade enzimática da quinase em células intactas. Para este propósito, componentes seletivos, permeáveis e potentes são



requeridos. A molécula de PKC contém dois domínios: um domínio regulatório que interage com o cálcio, a fosfatidilserina e o diacilglicerol e um domínio catalítico com sítios de ligação para os substratos de ATP e proteína. Portanto, ambos os domínios da PKC podem ser considerados como alvos farmacológicos para criação de inibidores específicos (TOULLEC et al., 1991).

Muitos inibidores destes dois domínios já foram descritos e a Estaurosporina, que interage com o sítio de ligação de ATP, é o mais potente inibidor da PKC descrito na literatura com uma concentração inibitória ( $IC_{50}$ ) máxima média de 10 $\mu$ M. No entanto, este produto natural é pouco seletivo, quando testado contra outras proteínas quinases e sua completa falta de especificidade é um grande problema quando a via de sinalização do bloqueio seletivo de uma célula PKC dependente é desejado. A fim de se obter inibidores específicos de PKC, uma série de Bisindolylmaleimides tem sido sintetizada (TOULLEC et al., 1991). Bisindolylmaleimide I (BIM) (2-[1-(3-Dimetilaminopropil)indol-3-il]-3-(indol-3-il) maleimide; **(Figura 3)** é um inibidor de PKC altamente seletivo, célula-permeável e reversível que é estruturalmente semelhante à Estaurosporina. Tal molécula age como um inibidor competitivo para o sítio de ligação de ATP da PKC e mostra alta seletividade para PKC $\alpha$ -,  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2-,  $\gamma$ -,  $\delta$ - e  $\epsilon$ -isoenzimas (TOULLEC et al., 1991).



**Figura 3.** Estrutura química da Bisindolylmaleimide I (BIM I; (C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>), inibidor seletivo de PKC  
Fonte (PUBCHEM, 2015).

Várias formas de Bisindolylmaleimide foram descobertas para ser potentes e seletivos inibidores de PKC (valores de IC<sub>50</sub> entre 5 a 70 µM). Dentre estas, a forma de Bisindolylmaleimide I (BIM I), também conhecida como GF109203X, foi escolhida para estudos adicionais objetivando a caracterização da família química. BIM I foi um inibidor competitivo em relação ao ATP e apresentou alta seletividade para PKC, comparando com outras cinco proteínas quinases. A potência e especificidade do inibidor BIM I foi determinada em dois modelos celulares: plaquetas humanas e fibroblastos 3T3 e o inibidor preveniu eficientemente a fosforilação mediada da PKC em ambos os modelos. (TOULLEC *et al.*, 1991).

### 2.2.3 Proteína fosfolipase A2 (PLA2) e seus inibidores

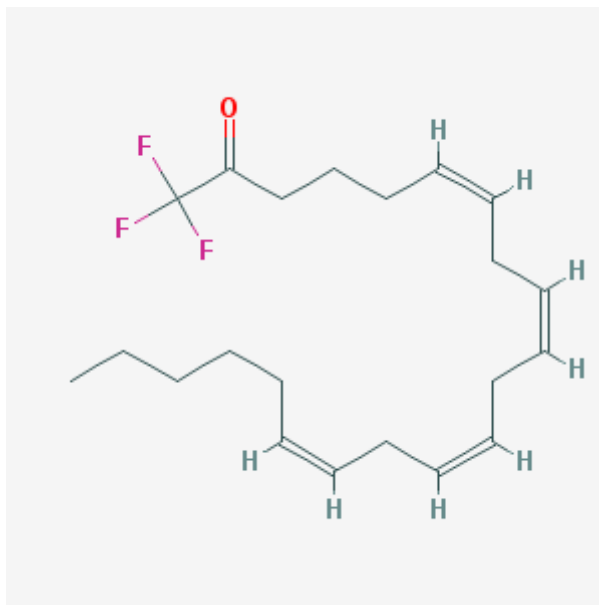
A família da PLAs é subdividida basicamente por tamanho, capacidade secretória e requerimento de cálcio em três subfamílias: as isoformas cálcio-independentes (iPLA2), que removem pequenas quantidades de AA da membrana, as enzimas citosólicas de alto peso molecular cálcio-dependentes (cPLA2s), que estimulam a produção da ciclooxygenase e remove uma maior quantidade de AA das membranas quando comparada a PLA2i e as enzimas secretórias de baixo peso molecular cálcio-dependentes (sPLA2-IB, sPLA2-IIA), que ocasiona, um aumento no estímulo de liberação de AA para a formação de COX-2 (Smith et al., 1996; Gijon et al, 1999; Fitzpatrick e Soberman, 2001; Chakraborti, 2003).

A subfamília cPLA2 é composta por três enzimas que dividem as mesmas características estruturais sem se tornarem funcionalmente redundantes: PLA2G4A (cPLA2a), PLA2G4B (cPLA2b) e PLA2G4C (cPLA2c) (SMITH *et al.*, 1996; TANG *et al.*, 1997; MURAKAMI, KUDO, 2003). Além disso, apresenta peso molecular de 85,35 kDa e é formada por uma sequência de 749 aminoácidos (DIOUF *et al.*, 2006).

A maioria das PLA2 são amplamente expressas em diferentes tecidos, onde são envolvidas em diferentes processos biológicos como inflamação, regeneração de tecido e apoptose (FITZPATRICK; SOBERMAN, 2001; FUENTES *et al.*, 2002).

As fosfolipases A2 podem exercer diferentes funções, dentre estas, remove o AA, ácido graxo essencial precursor de PGF2 $\alpha$ , das membranas fosfolipídicas. Através da catalização da hidrólise na posição sn-2 da membrana glicerofosfolipídica, levando à produção de ácidos graxos livres e lisofosfolipídeos, dois precursores de mediadores ativos potentes. Esta reação é de particular importância se o ácido graxo esterificado é o ácido araquidônico (AA). Assim, a primeira etapa regulada envolvida na formação de prostaglandina (PG) é a liberação de AA da membrana glicerofosfolipídica, que é seletivamente realizada pelas cPLA2 (CLARK *et. al.*, 1991).

O *Araquidonil-trifluorometil-cetona* (AACOCF<sub>3</sub>) é um análogo ao ácido araquidônico (AA) em que o grupo carboxila (COOH) é substituído por um grupo trifluorometilcetona (COCF<sub>3</sub>). Este ácido é um Inibidor reversível da PLA<sub>2</sub>, sendo mais seletivo para PLA<sub>2</sub> intracelulares (dependentes e independentes de cálcio) do que para as PLA<sub>2</sub> extracelulares devido as suas propriedades físicoquímicas, que permite sua rápida penetração na célula. AACOCF<sub>3</sub> (**Figura 4**) inibe cPLA<sub>2</sub> e iPLA<sub>2</sub> de cérebro bovino de maneira dose-dependente com valores de CI<sub>50</sub> de 1,5 e 6,0 μM, respectivamente.



**Figura 4.** Estrutura química AACOCF<sub>3</sub> (C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>F<sub>3</sub>O), inibidor de PLA<sub>2</sub>. Fonte (PUBCHEM, 2015).

Em contraste à lenta dissociação do complexo de Ca<sup>+2</sup>/cPLA<sub>2</sub>/AACOCF<sub>3</sub> (Street et al., 1993), o complexo iPLA<sub>2</sub>/AACOCF<sub>3</sub> dissocia-se rapidamente sob diluição e aproximadamente toda a atividade de PLA<sub>2</sub> pode ser recuperada, sugerindo uma maior afinidade para cPLA<sub>2</sub> (ACKERMAN et al., 1995). Sua maior seletividade para PLA<sub>2</sub> intracelulares (dependentes e independentes de cálcio) em relação à PLA<sub>2</sub>

extracelulares é justificada por suas propriedades físico-químicas que permitem sua rápida penetração para a célula AACOCF3 exerce uma inibição 500 vezes mais potente para cPLA2 que para sPLA2 (TRIMBLE *et al.*, 1993). Contudo, essa inibição também bloqueia a atividade da cicloxigenase (RIENDEAU *et al.*, 1994). Em relação ao mecanismo de bloqueio enzimático, estudos de ressonância magnética nuclear mostram que a cadeia carbônica de AACOCF3 liga-se a uma região hidrofóbica da enzima, onde o grupo carbonil de AACOCF3 forma uma ligação covalente com o aminoácido Ser228 no local ativo da enzima. Isso gera um axoanion carregado que interage com um grupo da enzima carregado positivamente (STREET *et al.*, 1993; TRIMBLE *et al.*, 1993).

A atuação de AACOCF3 sobre a atividade de PLA2 é investigada em inúmeros tipos celulares. Concentrações de 5 a 20µM bloqueiam a liberação de AA, produto da PLA2, em plaquetas, células monocíticas humanas e células mesangiais (GRONICH *et al.*, 1994). O tratamento de células NG 108-15 com AACOCF3 diminui a formação inicial de neuritos de maneira dose-dependente (SMALHEISER *et al.*, 1996). Em cultura neuronais primárias, esse inibidor previne a ativação de caspatases-3 e neurodegeneração induzida pelo peptídeo  $\beta$ -amilóide (A $\beta$ ) e peptídeo prion humano (BATE *et al.*, 2004), o que infere o papel nos subtipos de PLA2 em processos neurodegenerativos (FAROOQUI; HORROCKS, 1994; FAROOQUI *et al.*, 1997). Em astrócitos, a geração de radicais livres é fortemente inibida pelo AACOCF3. AACOCF3 também inibiu a ativação de cPLA2 e, conseqüentemente aumento de AA, mediada por metilmercúrio (MeHg+2) (SHANKER; ASCHNER, 2003).

No entanto, apesar de ser descrito como um inibidor específico de cPLA2, estudos recentes em células não-neuronais indicam que AACOCF3 pode inibir também COX e 5-lipoxigenase (5-LOX) (CUMMINGS *et al.*, 2000; FUENTES *et al.*, 2003).

#### **2.2.4 Quinases reguladas por sinal extracelular (ERKs)**

As Map Kinases ou ERKs são koléculas que participam de atividades intracelulares por meio de sinalização. Classificada como Kinase regulada por sinal extracelular. Na célula a PKC quando ativada induz a MAPK e ERK  $\frac{1}{2}$ , que fazem com que ocorra a fosforilação da Fosfolipase A2 (Cpla2). O PLA2 é mobilizado para a membrana da célula, onde libera ácido aracdÇónico (AA), que posteriormente é convertido em cicloxigenase 2 (cox2) em seguida em PGH2.

### **3. HIPÓTESE**

Hipotetizou-se que o E<sub>2</sub> estimule a expressão e/ou a atividade das enzimas dependentes de cálcio, especificamente, proteína quinase C (PKC) e fosfolipase A2 citosólica (cPLA2).

### **4. OBJETIVOS**

Objetivou-se avaliar o efeito dos inibidores de Proteína G, PKC e PLA2 na síntese de PGF2 $\alpha$  induzida pelo 17 $\beta$ -estradiol e CI em células endometriais BEND (Experimento 1) e avaliar as proteínas PKC e PLA2, pela técnica de Western Blotting, em explantes endometriais obtidos de fêmeas bovinas abatidas 2 horas após a administração de 17 $\beta$ -estradiol no 17<sup>o</sup> dia do ciclo estral (Experimento 2).

### **5. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **5.1 Experimento 1**

##### **5.1.1 Local do Experimento**

A parte experimental do cultivo celular, tratamento das células BEND e a técnica de radioimensaio foram realizadas na Universidade de São Paulo, na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, na cidade de Pirassununga/SP, nas dependências do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal, no Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM), com a colaboração do Prof. Dr. Mario Binelli.

### **5.1.2 Delineamento experimental**

Células endometriais BEND (**Figura 5**) foram suspensas em meio de cultivo completo contendo: 40% HAM F-12 (Sigma N6760); 40% de Minimal Essential Médium (MEM; Sigma M0643); 200UI de insulina/L (Sigma I5500); 10% v/v de Soro Fetal Bovino (FBS; Gibco Life 10270-106); 10% v/v de soro eqüino (Nutricel) e 1% v/v de solução antibiótica e antimicótica (Sigma A7292). As células BEND ( $4 \times 10^4$ ) foram semeadas em poços de 1,5cm de diâmetro e 2cm de altura, em placas de 24 poços (Costar, Corning Incorporated), em 1,5mL de meio de cultivo completo e cultivadas a 38,5°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>, até terem atingido a confluência de 90%. A seguir as células foram lavadas duas vezes meio idêntico ao citado acima, porém com a ausência de soro fetal bovino e eqüino (meio sem soro). Após a lavagem as células foram incubadas em meio sem soro por 24 horas. Após tal período de incubação, os poços das placas contendo as células cultivadas foram equitativamente divididos para receberem um dos diferentes tratamentos estipulados. Para a melhor compreensão do Experimento 1, o mesmo foi subdividido em Experimento 1A, Experimento 1B e Experimento 1C.



**Figura 5.** Células BEND (American Type Culture Collection AYCC no CRL-2398) cultivadas *in vitro*.

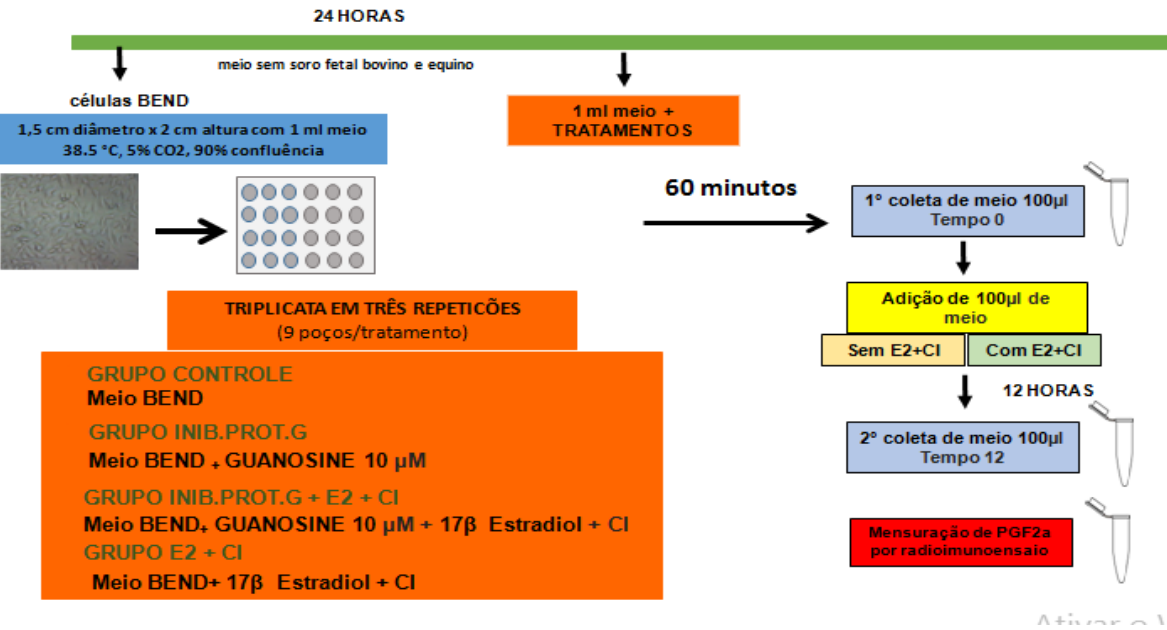
Para a melhor compreensão do Experimento 1, o mesmo foi subdividido em Experimento 1A, Experimento 1B e Experimento 1C. Em todos experimento após realização da administração dos tratamentos foi realizada a coleta das amostras item (5.1.3) e a técnica de radioimunoensaio (5.1.4).

#### **5.1.2.1 Experimento 1A - Efeito do inibidor da proteína G na síntese de PGF2 $\alpha$ induzida pelo estradiol e cálcio ionóforo**

Os poços contendo as células foram equitativamente divididos para receberem um dos seguintes tratamentos. **Grupo Controle:** meio BEND constituído de 40% HAM F-12 (Sigma N6760); 40% de Minimal Essential Médium (MEM; Sigma M0643); 200UI de insulina/L (Sigma I5500) e 1% v/v de solução antibiótica e antimicótica (Sigma



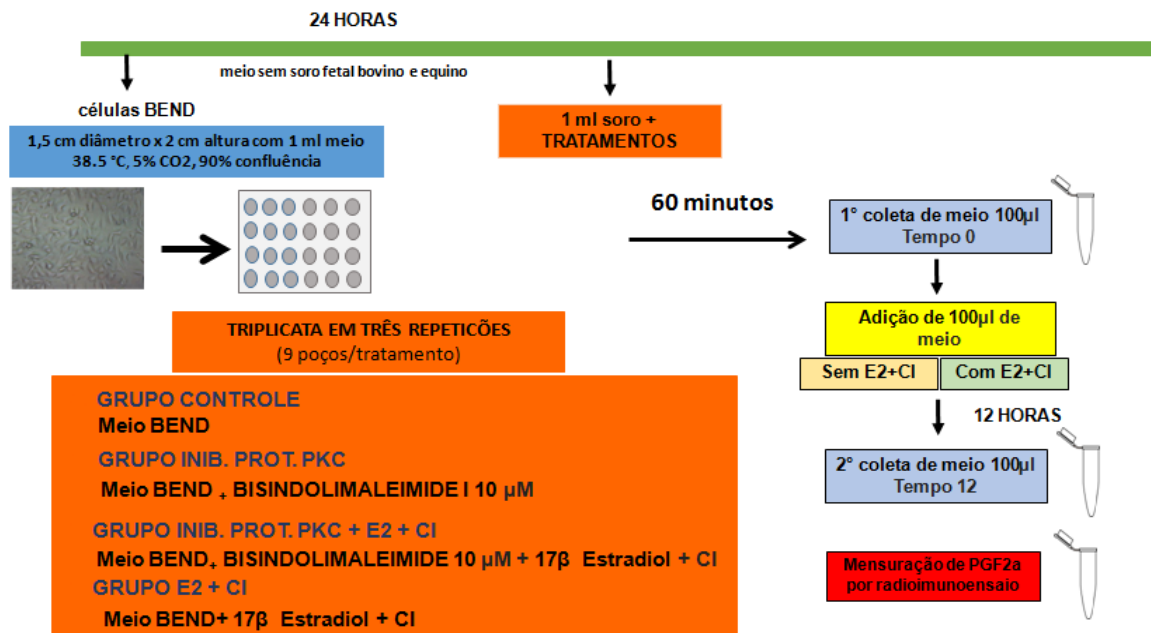
A7292); **Grupo inibidor da proteína G**: meio BEND adicionado de 10µM de Guanosine 5'- {B-thio} difosfato trilitium sal (Sigma G 7637); **Grupo inibidor da proteína G + E<sub>2</sub> + CI**: meio BEND adicionado de 10µM de Guanosine 5'- [ B-thio} difosfato trilitium sal (Sigma G 7637), 10<sup>-6</sup>M de cálcio ionóforo (A23187) e 10<sup>-13</sup>M de 17β-estradiol (Sigma E-8875); e **Grupo E<sub>2</sub> + CI**: meio BEND adicionado de 10<sup>-6</sup>M de cálcio ionóforo (A23187) e 10<sup>-13</sup>M de 17β-estradiol (Sigma E-8875). O inibidor da Proteína G utilizado foi a Guanosine 5'- [ B-thio} difosfato trilitium sal, inicialmente diluído em meio KHB na concentração inicial de 6,5mg/mL (**Figura 6**)



**Figura 6:** Experimento 1A, ilustração do delineamento experimental do cultivo celular, administração dos tratamentos nos diferentes grupos, coletas de amostras e mensuração de PGF2.

### 5.1.2.2 Experimento 1B - Efeito do inibidor da PKC na síntese de PGF2 $\alpha$ induzida pelo estradiol e cálcio ionóforo

Os poços contendo as células foram equitativamente divididos para receberem um dos seguintes tratamentos: **Grupo Controle:** meio BEND constituído de 40% HAM F-12 (Sigma N6760); 40% de Minimal Essential Medium (MEM; Sigma M0643); 200UI de insulina/L (Sigma I5500) e 1% v/v de solução antibiótica e antimicótica (Sigma A7292); **Grupo inibidor da PKC:** meio BEND suplementado com 10 $\mu$ M de C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> – Bisindolimaleimide I (Calbiochem 203290); **Grupo inibidor da PKC + E<sub>2</sub> + CI:** meio BEND suplementado com 10 $\mu$ M de C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> – Bisindolimaleimide I (Calbiochem 203290), 10<sup>-6</sup>M de cálcio ionóforo (A23187) e 10<sup>-13</sup>M de 17 $\beta$ -estradiol (Sigma E-8875); e **Grupo E<sub>2</sub> + CI:** meio BEND adicionado de 10<sup>-6</sup>M de cálcio ionóforo (A23187) e 10<sup>-13</sup>M de 17 $\beta$ -estradiol (Sigma E-8875). O inibidor de PKC utilizado foi C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> – Bisindolimaleimide I (BIS I) inicialmente diluído em DMSO na concentração inicial de 4,125mg/mL (**Figura 7**).

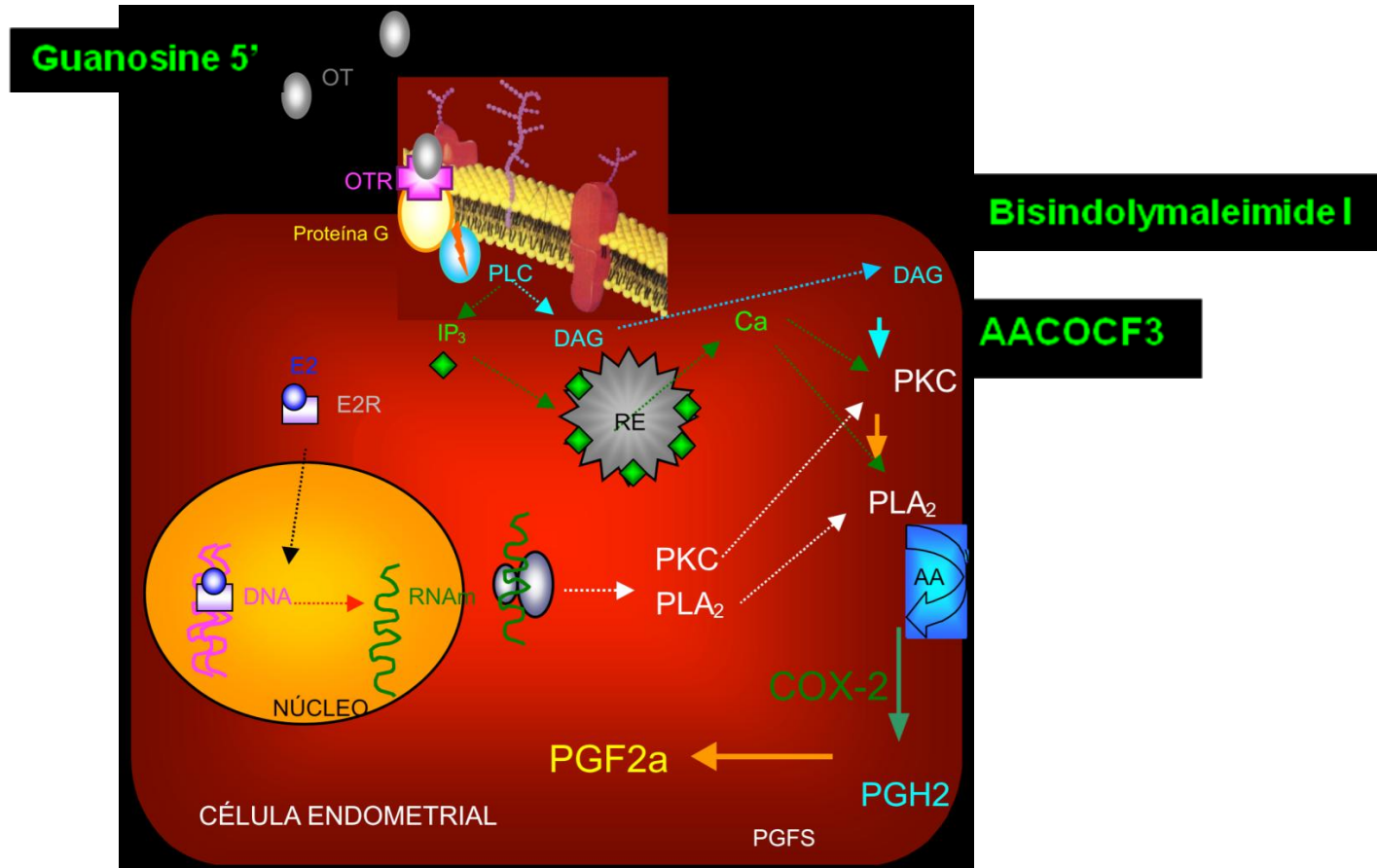


**Figura 7:** Experimento 1B, ilustração do delineamento experimental do cultivo celular, administração dos tratamentos, coletas de amostras e mensuração de PGF<sub>2</sub>α.

### 5.1.2.3 Experimento 1C - Efeito do inibidor da PLA2 na síntese de PGF<sub>2</sub>α induzida pelo estradiol e cálcio ionóforo

Os poços contendo as células foram equitativamente divididos para receberem um dos seguintes tratamentos: **Grupo Controle:** meio BEND constituído de 40% HAM F-12 (Sigma N6760); 40% de Minimal Essential Médium (MEM; Sigma M0643); 200UI de insulina/L (Sigma I5500) e 1% v/v de solução antibiótica e antimicótica (Sigma A7292); **Grupo inibidor da PLA2:** meio BEND suplementado com 20µM de AACOCF3 (Calbiochem 100109), inibidor de PLA2; **Grupo inibidor da PLA2 + E<sub>2</sub> + CI:** meio BEND suplementado com 20µM de AACOCF3 (Calbiochem 100109), 10<sup>-6</sup>M de cálcio ionóforo (A23187) e 10<sup>-13</sup>M de 17β-estradiol (Sigma E-8875); e **Grupo E<sub>2</sub> + CI:** meio BEND adicionado de 10<sup>-6</sup>M de cálcio ionóforo (A23187) e 10<sup>-13</sup>M de 17β-estradiol (Sig-





**Figura 9.** Modelo esquemático ilustrando os mecanismos de atuação dos antagonistas de proteínas envolvidas na síntese de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  na célula endometrial: a **GUANOSINE 5'** inibe a proteína G que promove a clivagem da fosfolipase C (PLC) em diacilglicerol (DAG) e fosfatidilinositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ); **Bisindolymaleimide I** inibe PKC e o **AACOCF3** inibe diretamente a proteína  $\text{PLA}_2$ .

### 5.1.3. Coleta das amostras de meio de cultivo

Os tratamentos foram realizados em triplicata e em um total de três repetições experimentais, totalizando nove poços tratados por grupo de tratamento. As células foram incubadas com os 1 mL de meio sem soro contendo inicialmente apenas os inibidores designados em cada tratamento, onde permaneceram durante 60 minutos. Após este período foi coletada uma amostra de meio no volume de 100uL (Tempo 0). Imediatamente após, foi adicionado 100uL de meio sem soro contendo ou não  $E_2 + Cl$ , que foi acrescentado aos 900uL restantes nos poços, em quantidade que determinasse uma concentração final de  $10^{-6}M$  de cálcio ionóforo e  $10^{-13}M$  de estradiol. Amostras de meio, no volume de 100uL, foram coletadas 12 horas após o tratamento ou não com  $Cl$ . As amostras foram armazenadas a  $-20^{\circ}C$  para posterior mensuração de  $PGF2\alpha$  por radioimunoensaio.

### 5.1.4 Radioimunoensaio para $PGF2\alpha$

A técnica de radioimunoensaio foi realizada segundo procedimentos descritos por Danet-Desnoyers *et al.* (1995). As concentrações de  $PGF2\alpha$  foram devidamente ajustadas para pg/mL/mg de tecido endometrial nos tempos 0 e 12 horas. Para mensuração de  $PGF2\alpha$  das amostras foram realizados três ensaios. O coeficiente de variação intra-ensaio para referência com 250pg/mL de  $PGF2\alpha$  foi de: 8,58% (ensaio 1); 6,93% (ensaio 2) e 8,67% (ensaio 3). O coeficiente de variação intra-ensaio para referência com 1000pg/mL de  $PGF2\alpha$  foi de 4,85% (ensaio1); 6,07% (ensaio 2) e 8,37% (ensaio 3). O coeficiente de variação intra-ensaio para referência com 3500pg/mL de  $PGF2\alpha$  foi de 7,86% (ensaio1); 19,27% (ensaio 2) e 7,52% (ensaio 3). O coeficiente de variação inter-ensaio para referência com 250pg/mL de  $PGF2\alpha$  foi de 8,52%. O coeficiente de variação inter-ensaio para referência com 1000pg/mL de  $PGF2\alpha$  foi de

5,24%. O coeficiente de variação inter-ensaio para referência com 3500pg/mL de PGF2 $\alpha$  foi de 13,25%.

### **5.1.5 Análise estatística**

As concentrações de PGF2 $\alpha$  produzidas nas primeiras 12 horas (DIF 12), obtida pela concentração de PGF2 $\alpha$  com 12 horas de tratamento subtraída da concentração de PGF2 $\alpha$  no tempo 0, foi a variável dependente. As variáveis independentes foram: repetição, tratamento e a interação repetição x tratamento. Demonstrou-se com uma análise preliminar que os dados de produção de PGF2 $\alpha$  (DIF 12) estavam adequados quanto a homogeneidade das variâncias (Teste F,  $p > 0,05$ ), os quais foram apresentados com LSmeans + EPM. Os dados foram analisados por ANOVA, utilizando-se o proc GLM do programa SAS (SAS Institute, 1988). Os tratamentos foram comparados por contrastes ortogonais.

## **5.2 Experimento 2**

### **5.2.1 Local do experimento**

Os tratamentos, abate das fêmeas e coleta dos tecidos para realização do experimento, foram realizados na Universidade de São Paulo, na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, na cidade de Pirassununga/SP, nas dependências do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal, no Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM). A realização das técnicas de Extração e Quantificação de Proteínas, técnica de Eletroforese Unidimensional e técnica de Western Blotting foram realizadas no Laboratório de no Laboratório de Investigação da Fisiologia do Endométrio e do Embrião - LIFE, sediado na Universidade Estadual

Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - FCAT, Campus de Dracena/SP.

### 5.2.2 Animais

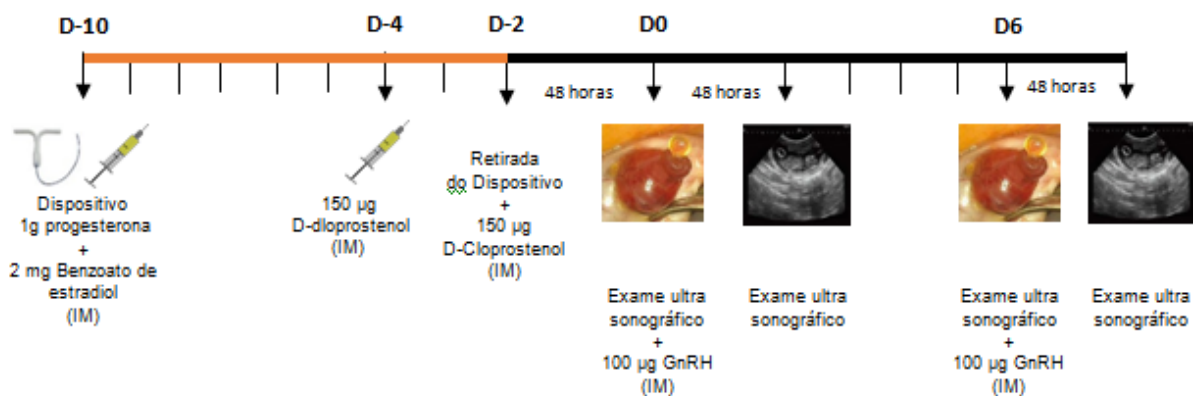
Foram utilizadas 11 novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*) não gestantes, de idade variável, cíclicas, com escore de condição corporal entre 5 e 6 (na escala de 1 a 9) e não lactantes. Os animais foram mantidos em piquetes, com água a disposição. A alimentação foi baseada no pastejo (*Brachiaria spp.*) complementada por suplementação mineral. Todos os animais foram vermifugados, vacinados e submetidos a exames para controle de tuberculose e Brucelose previamente ao estudo.

### 5.2.3 Sincronização das ovulações

Para a sincronização das ovulações, conforme ilustrado na **Figura 10**, as fêmeas receberam um dispositivo intravaginal contendo 1grama de progesterona (Cronipress®) associado a 2mg de Benzoato de Estradiol (Gonadiol®), via intramuscular (IM). O dispositivo intravaginal foi mantido por 8 dias. As novilhas receberam uma injeção via intramuscular de 150µg de D-cloprostenol, IM (N.C.Preloban® - Intervet) 48 horas antes da retirada do dispositivo intravaginal. Na retirada do dispositivo receberam novamente via intramuscular 150µg de D-cloprostenol, IM (N.C.Preloban® - Intervet). Após 48 horas da retirada dos dispositivos foi realizado um exame ultra-sonográfico (Aloka, modelo SSD500, transdutor linear de 7,5 MHz) e as fêmeas que apresentaram um folículo dominante  $\geq 7,5$ mm receberam uma injeção de 100µg de gonadorelina, um GnRH sintético via IM (Fertagil®-Intervet) com o objetivo de induzir a ovulação do folículo dominante. Novo exame foi realizado 48 horas após a injeção de GnRH para avali-



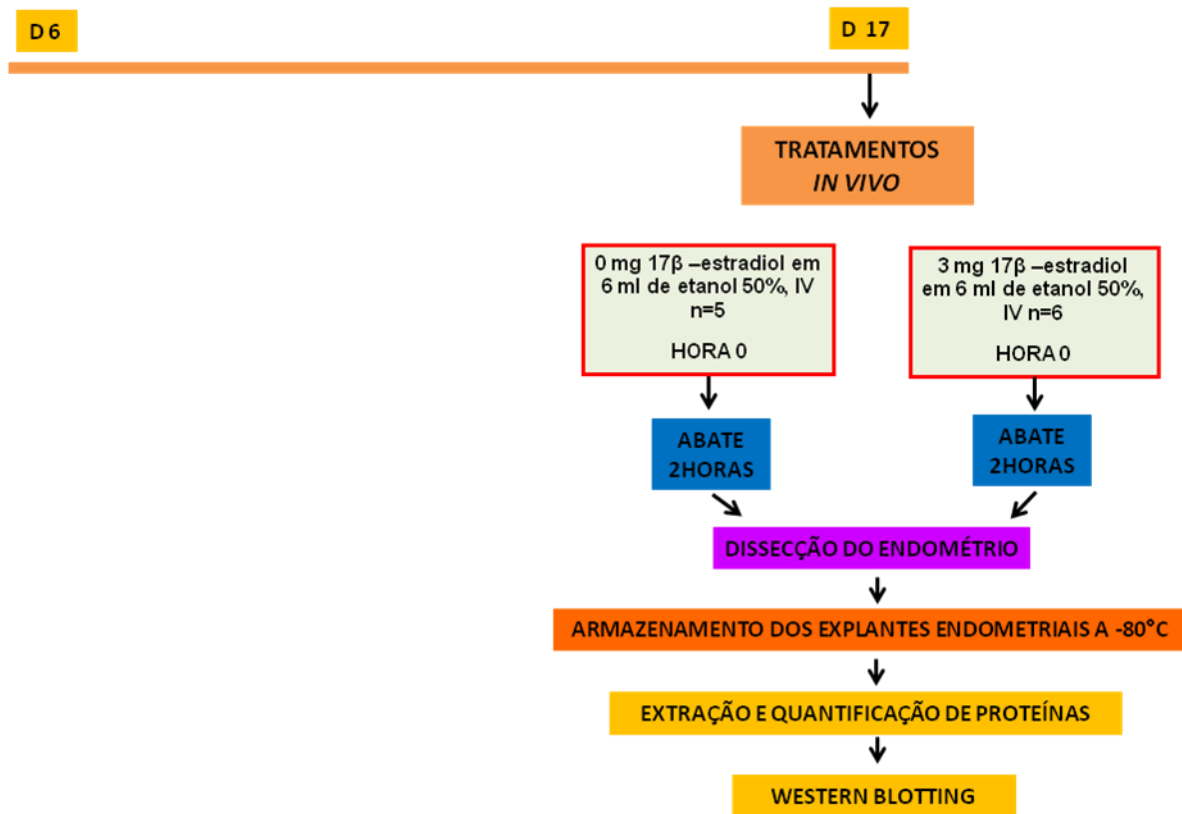
ar as fêmeas que ovularam. O dia do estro foi considerado o dia da aplicação do GnRH (D0). No presente estudo, foram utilizadas apenas as novilhas que ovularam no D0. No D6 foi realizado um exame ultra-sonográfico (Aloka, modelo SSD500, transdutor linear de 7,5 MHz) e as fêmeas que apresentaram um folículo dominante  $\geq 7,5$ mm receberam uma injeção de 100 $\mu$ g de gonadorelina, um GnRH sintético via IM (Fertagil®-Intervet) com o objetivo de induzir a ovulação do folículo dominante e promover a formação de um corpo lúteo acessório ao corpo lúteo original. Tal procedimento foi realizado com o objetivo de aumentar as concentrações plasmáticas de progesterona na tentativa de induzir um ciclo estral mais longo, de maneira que no D17 as novilhas não tivessem iniciado a luteólise fisiológica. Novo exame foi realizado 48 horas após a injeção de GnRH para avaliar as fêmeas que ovularam. No presente estudo, foram utilizadas apenas as novilhas que ovularam no D6 e formaram um corpo lúteo acessório.



**Figura 10.** Protocolo de sincronização das ovulações utilizado no Experimento 2.

#### 5.2.4 Tratamento *in vivo*

As novilhas pareadas de acordo com a data de apresentação do estro, foram no 17º dia do ciclo estral injetadas com 0mg (n=5) ou 3mg de 17β-estradiol (n=6) e abatidas duas horas após o tratamento. O abate foi realizado por concussão cerebral por pistola pneumática. Imediatamente após o abate, o sistema genital foi transportado ao laboratório a 4°C (**Figura 11**).



**Figura 11:** Experimento 2 - Ilustração da administração dos tratamentos *in vivo* e *in vitro* e coletas de amostras e mensuração de proteínas pela técnica de Western Blotting.

### 5.2.5 Isolamento e armazenamento dos explantes endometriais

O endométrio, do corno uterino ipsolateral ao corpo lúteo original (subentende-se não acessório), foi dissecado e fragmentos da região intercaruncular foram acondicionados em criotubos e imediatamente armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 5.2.6 Extração e quantificação de proteínas

Após o abate os explantes endometriais das novilhas tratadas *in vivo* com estradiol (Grupo Com  $\text{E}_2$ ) ou não tratadas com estradiol (Grupo Sem  $\text{E}_2$ ) foram removidos e pesados. Para cada 2 gramas de endométrio foram acrescidos 2,5mL de uma solução de extração de proteínas contendo 1mM EDTA (Fisher BP 120-500); 1mM EGTA (Sigma E8145); 1mM DTT (Fisher BP 172-5); 0,5mM PMSF (Sigma P-7626); 300mM NaCl; 0,5% NP-40; 50mM Tris pH 8.0; 10% Glicerol; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  Aprotinina (Sigma A-4529); 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  Leupeptina (Sigma L-2884) e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  Pepstatina (Sigma P-4265). Devido à baixa quantidade de proteínas nas amostras analisadas, tornou-se necessário concentrar os extratos para que fosse possível pipetar em cada poço do gel de eletroforese 30 $\mu\text{L}$  de amostra contendo 50 $\mu\text{g}$  de proteína. Portanto foi realizado o emprego de uma menor quantidade de solução de extração nos explantes endometriais.

### 5.2.7 Western blotting

Foram testados géis de separação com diferentes concentrações de Poliacrilamida (12 e 14%). A concentração de 12% de Poliacrilamida foi padronizada para todos os géis que foram analisados. Para a confecção dos géis, utilizou-se o Padrão de Peso Molecular (PPM) Kaleidoscope Prestained Standards (cat. 161-0324, BIO-RAD), que continha proteínas com os seguintes pesos moleculares: 193,890; 120,371; 88,955; 36,265; 31,041; 16,388 e 6,623 kDa. A quantidade de proteína total

administrada em cada um dos “poços” do gel de eletroforese foi de 50ug. O procedimento de Eletroforese foi realizado em duplicata para todas as proteínas de interesse do presente estudo (PKC, PLA<sub>2</sub> e ERK1/2) assim, de cada corrida eram obtidos dois géis idênticos, ao final do procedimento obtiveram-se quatro géis de duas corridas eletroforéticas com exatamente as mesmas amostras e sob as mesmas condições para cada uma das proteínas de interesse, a fim de garantir uma maior confiabilidade de comparação entre as categorias de animais. A corrida eletroforética foi ajustada para 220Volts e 100mA, por um período variável de 1 a 2 horas, quando observou-se a finalização total da corrida. Após o término da corrida eletroforética, os géis foram imersos em tampão de transferência contendo metanol durante 2 horas. Procedeu-se com a montagem do sistema de transferência horizontal, onde foram acomodados dois Blotting Papers, uma membrana de nitrocelulose, um gel de poliacrilamida e novamente dois Blotting Papers. As condições de transferência foram de 47V e 100mA, por um período de aproximadamente duas horas. Ao término da transferência, as membranas de nitrocelulose foram imersas em solução de bloqueio, onde permaneceram incubadas por um período médio de duas horas, sobre placa agitadora em temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas quatro vezes com solução de TBS durante 10 minutos sobre placa agitadora. Várias diluições distintas dos anticorpos primários ERK1/2, PKC e PLA<sub>2</sub> foram adequadamente validadas. As diluições eleitas para realizar a padronização foram: 1:100, 1:200, 1:600 e 1:1.000 para o anticorpo primário ERK1/2 (sc-16982, p-ERK1/2 (Thr 202/Tyr 204), goat polyclonal IgG, Lot. # L0209, Santa Cruz Biotechnology); 1:200, 1:600, 1:1.000 para o anticorpo primário PLA<sub>2</sub> (sc-55887, group V PLA<sub>2</sub> (T-20), goat polyclonal IgG, Lot. # A1508, Santa Cruz Biotechnology) e 1:500 e 1:1.000 para anticorpo primário PKC ( # 93775, phopho-PKC theta (T538), rabbit Ab, Cell Signaling). Após a validação concluiu-se que a diluição mais adequada do anticorpo primário, ou seja, a que proporcionou melhor visualização de bandas foi: 1:100 para ERK1/2 1:600 para PLA<sub>2</sub> e 1:500 para

PKC. O anticorpo primário foi diluído apenas em Solução Tampão de TBS. Após a quarta lavagem das membranas em Solução Tampão de TBS, posteriormente ao período de bloqueio em solução de leite desnatado, as mesmas eram incubadas com exatamente 1mL da solução descrita acima, sob placa agitadora, em temperatura de 4°C, onde permaneceram por um período médio de doze horas. Após a retirada do anticorpo as membranas foram lavadas por três vezes de dez minutos com Solução Tampão de T-TBS sob plataforma agitadora e uma vez de dez minutos com Solução Tampão de TBS também sob placa agitadora. A mesma validação também foi realizada para o anticorpo secundário. As diluições eleitas para se realizar o procedimento de padronização do anticorpo secundário foram: 1:1.000, 1:5.000, 1:10.000 e 1:25.000 para o anticorpo secundário anti-ERK1/2 (sc-2020, donkey anti-goat IgG-HRP, Lot. #B2709, Santa Cruz Biotechnology); 1:1.000, 1:5.000, 1:10.000 e 1:15.000 para o anticorpo secundário anti-PLA2 (sc-2020, donkey anti-goat IgG-HRP, Lot. #B2709, Santa Cruz Biotechnology) e 1:1.000, 1:2.000 e 1:3.000 para o anticorpo secundário anti-PKC (# 7074, anti-rabbit IgG-HRP linked antibody, Cell Signaling). Após a validação concluiu-se que a diluição mais adequada do anticorpo secundário foi a de 1:10.000 para o anti-ERK1/2 e anti-PLA2 e 1:3.000 para o anti-PKC. O anticorpo secundário foi preparado da mesma forma que o anticorpo primário, ou seja, foi diluído apenas em Solução Tampão de TBS. Após a quarta lavagem das membranas em Solução Tampão de TBS, posteriormente ao período de incubação em anticorpo primário, as mesmas eram incubadas com, aproximadamente, 20mL da solução contendo o anticorpo secundário, previamente preparada, sob placa agitadora em temperatura ambiente, por um período de uma hora. Posteriormente ao período de incubação das membranas em solução contendo o anticorpo secundário (anti-ERK1/2, anti-PLA2 e anti-PKC), as mesmas foram então lavadas por três vezes de dez minutos com Solução Tampão de T-TBS sob plataforma agitadora e uma vez de dez minutos com Solução Tampão de TBS também sob placa agitadora. Após a devida realização das lavagens das

membranas, as mesmas foram mantidas em Solução Tampão de TBS para sua posterior revelação. Para a revelação utilizou-se a Solução Super Signal West Pico Lumina e Super Signal West Stable Peroxide Sotution. Incubou-se as membranas nesta solução de quimiluminescência por um período de 1 minuto para PLA2, 3 minutos para PKC e 5 minutos para ERK1/2, tempos estipulados após um prévia validação.

### 5.2.8 Análise estatística

Após a revelação, a densidade óptica da banda específica foi correlacionada positivamente a sua concentração. A densidade digital das bandas detectadas foi analisada por ANOVA, utilizando-se o Proc GLM do programa SAS (SAS Institute, 1988). No modelo, a variável dependente foi a densidade de cada uma das bandas e as variáveis independentes foram vaca e tratamento (Com Estradiol *in vivo* ou Sem Estradiol *in vivo*) para as proteínas PKC, ERK 1/2 e PLA2. A significância imposta foi de 95%.

## 6. RESULTADOS

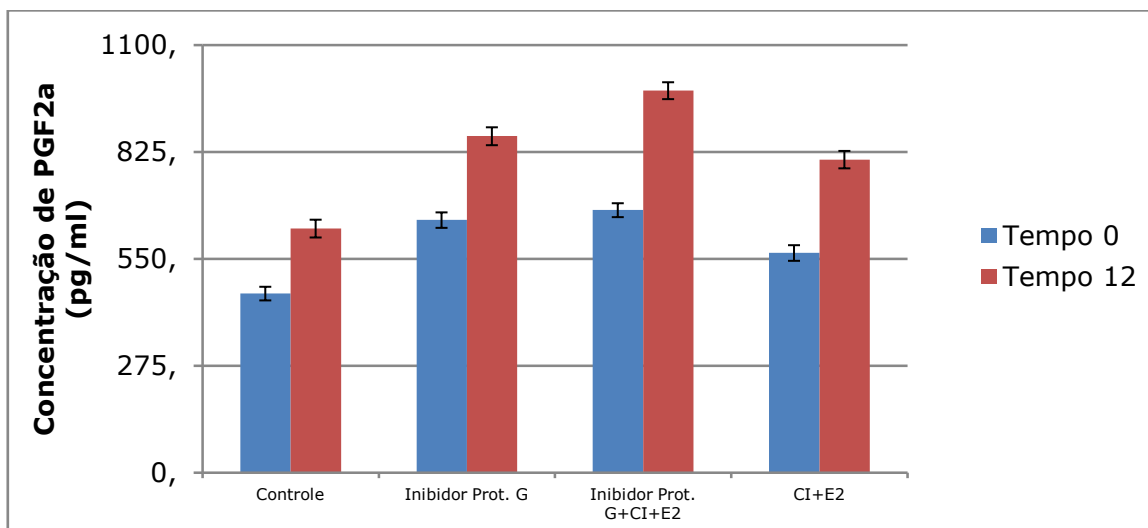
### 6.1 Experimento 1

#### 6.1.1 Experimento 1a

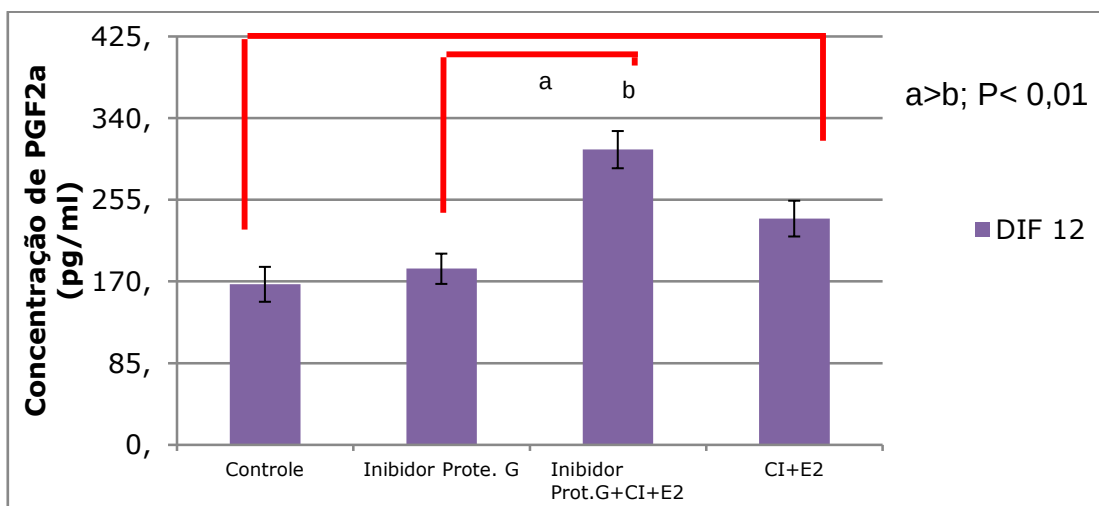
As concentrações médias de PGF2 $\alpha$  no tempo 0 e 12 horas, para os diferentes grupos de tratamento estão representadas na **Figura 12**. As médias no tempo 0 foram de  $460,96 \pm 17,54$ pg/mL (grupo controle);  $649,88 \pm 19,88$ pg/mL (Inibidor de Proteína G);  $675,41 \pm 17,87$ pg/mL (Inibidor de Proteína G + CI + E<sub>2</sub>) e  $565,31 \pm 20,12$ pg/mL (CI e E<sub>2</sub>). As médias no tempo 12 horas foram de  $628,1 \pm 22,86$ pg/mL (grupo controle);

$865,56 \pm 22,99\text{pg/mL}$  ((Inibidor de Proteína G);  $982,7 \pm 21,7\text{pg/mL}$  ((Inibidor de Proteína G + CI + E<sub>2</sub>) e  $805,4 \pm 22,41\text{pg/mL}$  (CI e E<sub>2</sub>).

A DIF 12, representada pela concentração de PGF2 $\alpha$  com 12 horas de tratamento subtraída da concentração de PGF2 $\alpha$ , para os diferentes grupos de tratamento está representada na **Figura 13**. A DIF 12 foi de  $167,16 \pm 18,17\text{pg/mL}$  (grupo controle);  $183,33 \pm 15,75\text{pg/mL}$  (Inibidor de Proteína G);  $307,29 \pm 19,35\text{pg/mL}$  (Inibidor de Proteína G + CI + E<sub>2</sub>) e  $235,54 \pm 18,61\text{pg/mL}$  (CI e E<sub>2</sub>).



**Figura 12.** Experimento 1A: Concentrações de PGF2 $\alpha$  (pg/mL), nos tempos 0 e 12 horas, para as células endometriais bovinas (BEND) tratadas com meio controle, inibidor proteína G, inibidor de proteína G + CI + E<sub>2</sub> e CI + E<sub>2</sub>



**Figura 13.** Experimento 1A: Concentrações de PGF2α (pg/mL), em relação à DIF entre os tempos 0 e 12 horas (DIF 12), para as células endometriais bovinas (BEND) tratadas com meio controle, inibidor de proteína G, inibidor de proteína G + CI + E<sub>2</sub> e CI + E<sub>2</sub>

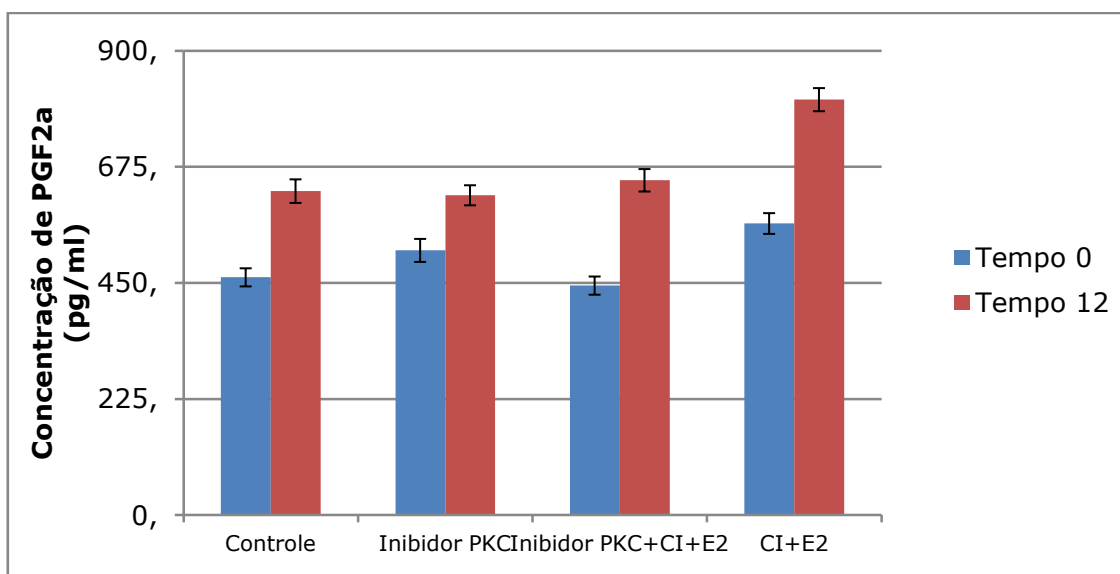
Neste estudo foi verificado efeito de reptição ( $P < 0,001$ ) e efeito de inibidor ( $P < 0,01$ ). As células tratadas com o inibidor de Proteína G (grupo inibidor de proteína G e Inibidor de Proteína G + CI + E<sub>2</sub>) apresentaram uma DIF 12 menor ( $P < 0,01$ ) que os grupos não tratados com o inibidor de Proteína G (controle e CI + E<sub>2</sub>).

### 6.1.2 Experimento 1B

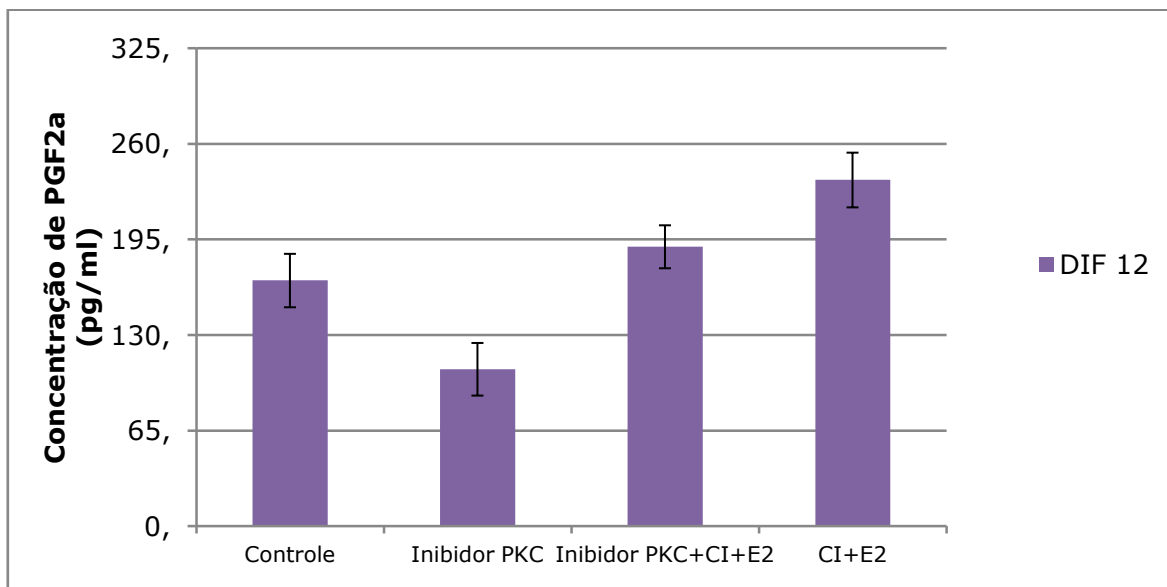
As concentrações médias de PGF2α no tempo 0 e 12 horas, para os diferentes grupos de tratamento estão representadas na **Figura 14**. As médias no tempo 0 hora foram de  $460,96 \pm 17,54$ pg/mL (meio controle);  $513,18 \pm 22,32$ pg/mL (Inibidor de PKC);  $444,93 \pm 17,63$ pg/mL (Inibidor de PKC + CI + E<sub>2</sub>) e  $565,31 \pm 20,12$ pg/mL (CI e E<sub>2</sub>). As médias no tempo 12 horas foram de  $628,1 \pm 22,86$ pg/mL (meio controle);  $620,01 \pm 19,45$ pg/mL (Inibidor de PKC);  $649,08 \pm 21,74$ pg/mL (Inibidor de PKC + CI + E<sub>2</sub>) e  $805,4 \pm 22,41$ pg/mL (CI e E<sub>2</sub>).



A DIF 12, representada pela concentração de PGF2 $\alpha$  com 12 horas de tratamento subtraída da concentração de PGF2 $\alpha$ , para os diferentes grupos de tratamento está representada na **Figura 15**. A DIF 12 foi de  $167,16 \pm 18,17$ pg/mL(meio controle) ;  $106,82 \pm 17,9$ pg/mL (Inibidor de PKC);  $190,12 \pm 14,61$ pg/mL (Inibidor de PKC + CI + E2) e  $235,54 \pm 18,61$ pg/mL (CI e E<sub>2</sub>).



**Figura 14.** Experimento 1B: Concentrações de PGF2 $\alpha$  (pg/mL), nos tempos 0 e 12 horas, para as células endometriais bovinas (BEND) tratadas com meio controle, inibidor de PKC, inibidor de PKC + CI + E<sub>2</sub> e CI + E<sub>2</sub>



**Figura 15.** Experimento 1B: Concentrações de PGF2α (pg/mL), em relação à DIF entre os tempos 0 e 12 horas, para as células endometriais bovinas (BEND) tratadas com meio controle, inibidor de PKC, inibidor de PKC + CI + E<sub>2</sub> e CI + E<sub>2</sub>.

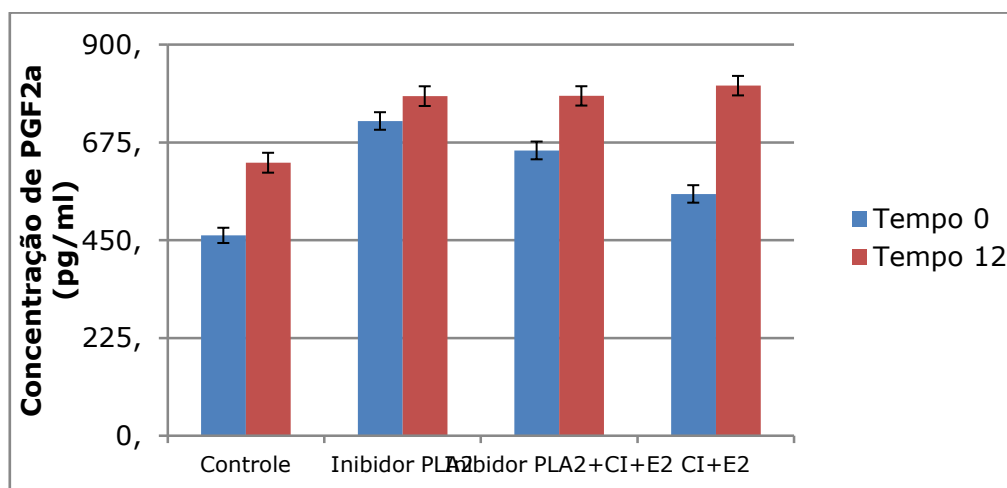
Neste estudo foi verificado efeito de repetição ( $P < 0,001$ ) e não houve efeito de inibidor ( $P = 0,2709$ ). As células tratadas com o inibidor de PKC (grupo inibidor de PKC e Inibidor de PKC + CI + E<sub>2</sub>) não diferiram quanto a DIF 12 dos grupos não tratados com o inibidor de PKC (controle e CI + E<sub>2</sub>). Desta forma o inibidor de PKC não inibiu a síntese de PGF2α induzida pelo estradiol. No presente estudo a inibição da proteína PKC não inibiu a síntese de PGF2α em células tratadas com CI + E<sub>2</sub>.

### 6.1.3 Experimento 1c

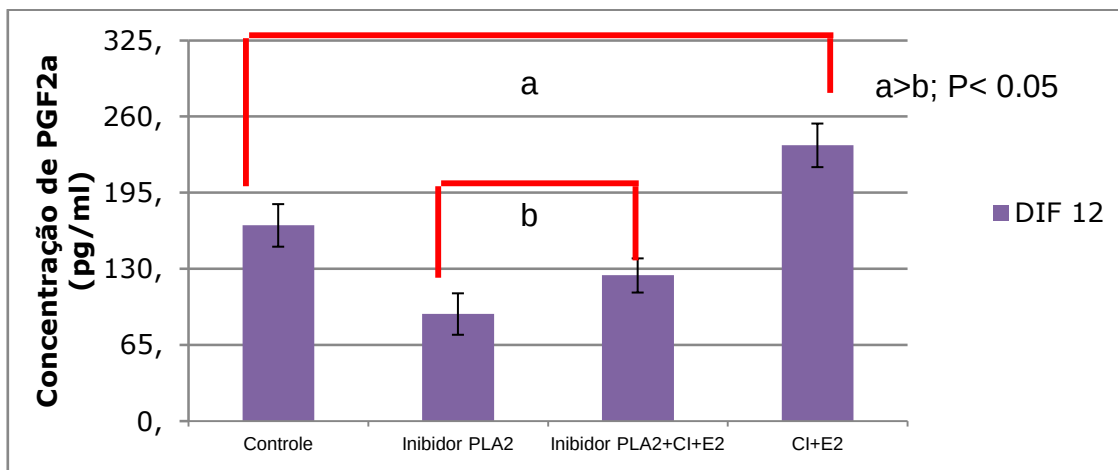
As concentrações médias de PGF2α no tempo 0 e 12 horas, para os diferentes grupos de tratamento estão representadas na **Figura 16**. As médias no tempo 0 hora foram de  $460,96 \pm 17,54$  pg/ml (grupo controle);  $724,13 \pm 20,21$  pg/ml (Inibidor de PLA<sub>2</sub>);  $656,39 \pm 20,41$  pg/ml (Inibidor de PLA<sub>2</sub> + CI + E<sub>2</sub>) e  $565,31 \pm 20,12$  pg/ml (CI e

$E_2$ ). As médias no tempo 12 horas foram de  $628,1 \pm 22,86$ pg/mL(grupo controle);  $781,28 \pm 22,67$ pg/mL(Inibidor de PLA2);  $781,81 \pm 22,23$ pg/mL (Inibidor de PLA2 + CI +  $E_2$ )e  $805,4 \pm 22,41$ pg/mL(CI e  $E_2$ ).

A DIF 12, representada pela concentração de PGF2 $\alpha$  com 12 horas de tratamento subtraída da concentração de PGF2 $\alpha$ , para os diferentes grupos de tratamento está representada na **Figura 17**. A DIF 12 foi de  $167,16 \pm 18,17$ pg/mL(grupo controle);  $91,47 \pm 17,69$ pg/mL(Inibidor de PLA2);  $125,42 \pm 14,59$ pg/mL (Inibidor de PLA2 + CI +  $E_2$ ) e  $235,54 \pm 18,61$ pg/mL(CI e  $E_2$ ).



**Figura 16.** Experimento 1C: Concentração de PGF2 $\alpha$  (pg/mL), nos tempos 0 e 12 horas, para as células tratadas com meio controle, inibidor de PLA2, inibidor de PLA2 + CI +  $E_2$  e CI +  $E_2$ .



**Figura 17.** Experimento 1C: Concentração de PGF2α (pg/mL), em relação a DIF entre os tempos 0 e 12 horas, para as células tratadas com meio controle, inibidor de PLA2, inibidor de PLA2 + CI + E<sub>2</sub> e CI + E<sub>2</sub>.

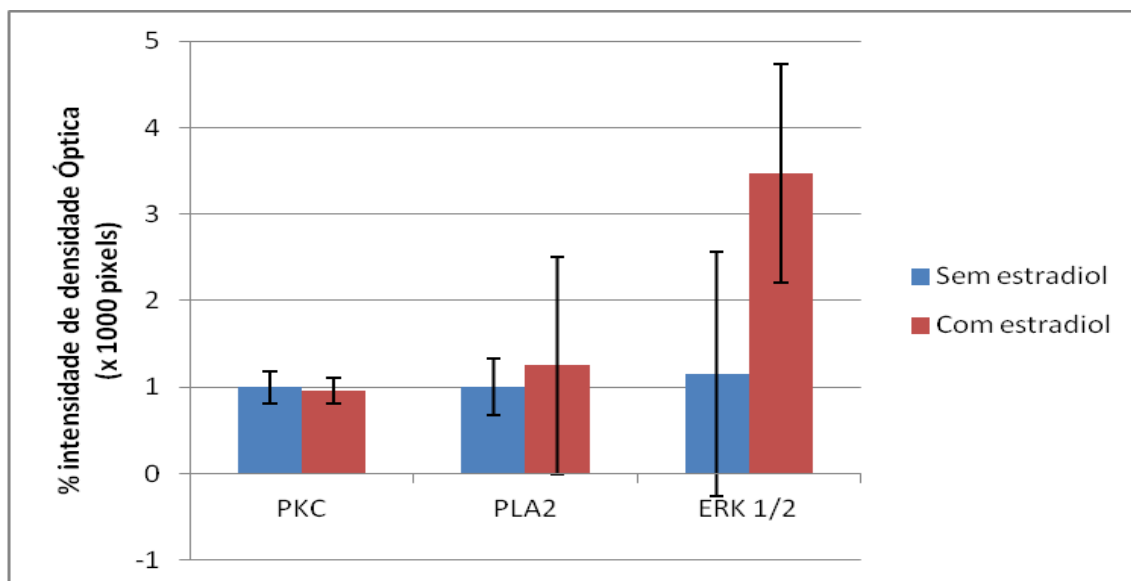
Neste estudo foi verificado efeito de repetição ( $P < 0,001$ ) e houve efeito de inibidor ( $P < 0,05$ ). As células tratadas com o inibidor de PLA<sub>2</sub> (grupo inibidor de PLA2 e Inibidor de PLA2 + CI + E<sub>2</sub>) apresentaram uma DIF 12 menor ( $P < 0,05$ ) que os grupos não tratados com o inibidor de PLA2 (controle e CI + E<sub>2</sub>). Desta forma o inibidor da proteína PLA<sub>2</sub> não inibiu a síntese de PGF2α independente da adição ou não de CI + E<sub>2</sub>. No presente estudo a inibição da proteína PLA2 não inibiu a síntese de PGF2α em células tratadas com CI + E<sub>2</sub>.

## 6.2 Experimento 2

Todos os animais utilizados no Experimento 2, apresentaram concentrações plasmáticas de progesterona  $> 1\text{ng/mL}$ , entretanto as análises foram feitas com animais que no momento do abate não haviam iniciado a luteólise fisiológica.

As médias da densidade óptica para as proteínas PKC, PLA2 e ERK1/2, estão representadas na **Figura 18**. Para a PKC, as médias foram de  $1,0001 \pm 0,1869$  (sem

estradiol) e  $0,9631 \pm 0,1447$  (com estradiol). Não houve efeito significativo do estradiol ( $P=0,88$ ) no aumento da proteína PKC endometrial. Para a PLA<sub>2</sub>, as médias foram de  $1,0007 \pm 0,3253$  e  $1,2521 \pm 0,2520$  para o grupo sem estradiol e com estradiol, respectivamente. Não houve efeito significativo do estradiol ( $P=0,56$ ) no aumento da proteína PLA<sub>2</sub> endometrial. Para a ERK1/2, as médias foram de  $1,1558 \pm 1,4118$  e  $3,4748 \pm 1,2628$  para o grupo sem estradiol e com estradiol, respectivamente. Não houve efeito significativo do estradiol ( $P=0,26$ ) no aumento da proteína ERK1/2 endometrial.



**Figura 18.** Médias  $\pm$  erro padrão da porcentagem de intensidade de densidade óptica (X 1000 pixels) em explantes endometriais de fêmeas bovinas não tratadas (Controle) ou tratadas com 3mg de 17B-estradiol (Grupo E<sub>2</sub>), via intramuscular, no 17º dia do ciclo estral, avaliados para as proteínas PKC, PLA2 e ERK1/2 pela técnica de Western Blotting.

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1 Experimento 1

No presente estudo esperava-se que o tratamento *in vitro* com E<sub>2</sub> e CI estimulasse a síntese de PGF2 $\alpha$  em células BEND, considerando que Membrive et al. (2014) realizou tratamento idêntico com E<sub>2</sub> e CI e verificou que o CI utilizado separadamente foi responsável por um incremento de 179% na produção de PGF2 $\alpha$  comparado ao grupo controle, contudo, quando o CI foi associado ao E<sub>2</sub> o incremento foi de 340% comparado ao grupo controle e de 58% comparado ao grupo tratado exclusivamente com CI. Neste estudo de Membrive et al. (2014), notavelmente o E<sub>2</sub> aumentou a sensibilidade das células endometriais à ação do CI (P<0,01). No presente estudo, o CI e E<sub>2</sub> quando utilizados separadamente ou associados não promoveram aumento na síntese de PGF2 $\alpha$  em células BEND.

A ação do cálcio no interior da célula e sua quantidade quando a célula é encontrada em fase de repouso ou ativação foi investigada por Alberts *et al* (1997). Os mesmos relatam que a concentração celular de cálcio livre no citosol é <10<sup>-7</sup>M. Entretanto, para que o aumento de cálcio possibilite sua atuação como segundo mensageiro a concentração basal de cálcio no citosol deve ser mantida ao redor de 10<sup>-7</sup>M. Quando a célula está sem utilizar o cálcio como segundo mensageiro, a bomba cálcio ATPase presente na membrana da célula e do retículo endoplasmático utiliza a energia proveniente da hidrólise do ATP para bombear cálcio do citosol para o retículo endoplasmático, condição que favorece a manutenção da concentração de <10<sup>-7</sup>M no citosol quando a célula está sob tal condição. Quando a célula é ativada por um sinal extracelular o influxo de cálcio do líquido extracelular e do retículo endoplasmático para o citosol, estabelece uma concentração de cálcio de 5 x 10<sup>-6</sup>M, possibilitando nesta circunstância que o cálcio promova sua ação de segundo mensageiro. Os ionóforos, inclusive o CI, são pequenas moléculas hidrofóbicas que se dissolvem na bicamada

lipídica da membrana plasmática aumentando sua permeabilidade e facilitando sua entrada na célula. O CI, utilizado no presente experimento, é um carreador iônico transportador de cálcio, que atua transportando dois íons  $H^+$  para fora da célula para cada íon cálcio transportado para dentro das células. Quando as células são expostas ao CI, o cálcio presente no líquido extracelular entra no citosol a favor de um forte gradiente eletroquímico, possibilitando um aumento de cálcio livre no citosol. No presente estudo, a utilização do CI provavelmente tenha possibilitado a maior entrada de cálcio nas células endometriais, entretanto sua função como segundo mensageiro possivelmente não tenha sido evidenciada, pela limitada presença das enzimas PKC e PLA<sub>2</sub>, que sabidamente são dependentes de cálcio para a ativação, possivelmente pelo fato do  $E_2$  não ter estimulado a síntese de ambas as enzimas, contradizendo a hipótese inicial.

Considerando que nos experimento 1A, 1B e 1C foi observado efeito de repetição ( $P < 0,001$ ), onde evidenciou-se que a cada repetição os resultados diferiram quanto aos tratamentos, assim neste estudo especificamente, o modelo de celular não conferiu repetibilidade. Diante da ausência de estimulação do CI associado ao  $E_2$  a busca de verificar efeitos dos inibidores utilizados ficou bastante limitada.

No experimento 1A, as células tratadas com o inibidor de Proteína G (grupo inibidor de proteína G e Inibidor de Proteína G + CI +  $E_2$ ) apresentaram uma DIF 12 maior ( $P < 0,01$ ) que os grupos não tratados com o inibidor de Proteína G (controle e CI +  $E_2$ ). Este efeito foi o contrário do esperado, desta forma não houve efeito do inibidor.

No experimento 1B, as células tratadas com o inibidor de PKC (grupo inibidor de PKC e Inibidor de PKC + CI +  $E_2$ ) não diferiram quanto a DIF 12 dos grupos não tratados com o inibidor de PKC (controle e CI +  $E_2$ ). No presente estudo a inibição da proteína PKC não limitou a síntese de PGF<sub>2</sub> $\alpha$  em células BEND.

No experimento 1C, as células tratadas com o inibidor de PLA<sub>2</sub> (grupo inibidor de PLA<sub>2</sub> e Inibidor de PLA<sub>2</sub> + CI +  $E_2$ ) apresentaram uma DIF 12 menor ( $P < 0,05$ ) que os

grupos não tratados com o inibidor de PLA2 (controle e CI + E<sub>2</sub>). Desta forma evidencia-se que o bloqueio da ação da PLA2 limita a síntese de PGF2 $\alpha$  em células BEND. Burns et al. (1997) ao tratar explantes endometriais com estimuladores de PLA2 verificou um grande aumento na síntese de PGF2 $\alpha$ . Também relata-se que implantes uterinos de estradiol em ratas promoveram um aumento da atividade de PLA2 167 vezes maior quando comparado ao placebo, reforçando a idéia de que o estradiol potencializa a ação da PLA2, assim esperávamos que o estradiol promovesse um aumento dos transcritos de PLA2 potencializando a síntese de PGF2 $\alpha$  em células BEND, ação que não foi evidenciada.

## 7.2 Experimento 2

Neste experimento, esperava-se evidenciar um aumento nas proteínas PKC e PLA2 em explantes endometriais provenientes de vacas tratadas com E2 no 17<sup>o</sup> dia do ciclo estral. Entretanto não houve efeito significativo do estradiol no aumento da proteína PKC (P=0,88), PLA2 (P=0,56) e ERK1/2 (P=0,26). Em estudo recente Oliveira (2017), tratou fêmeas bovinas de corte com 3mg de 17B-estradiol no 15<sup>o</sup> dia do ciclo estral e avaliou, pela técnica de PCR em tempo real, as proteínas PKC alfa, PKC beta e a PLA2G4 em biópsias uterinas realizadas 4 e 7 horas após a injeção de 17B-estradiol. Na biópsias realizadas 4 e 7 horas após o tratamento observou-se inclusive um menor expressão das enzimas avaliadas, resultado totalmente oposto ao esperado. Neste estudo de Oliveira (2017), a hipótese de que o 17B-estradiol estimularia também foi negada corroborando com os resultados evidenciados neste estudo, tanto no experimento 1 quanto no 2.

Alves Júnior et al. (2011) demonstraram que o tratamento *in vivo* com 17B-estradiol não modulou a quantidade de proteína total em explantes de endométrio coletados duas horas após o abate das fêmeas. Também não houve modulação na



abundância em proteínas de peso molecular compatível das PKCs, aproximadamente 80 kDa. No entanto, o mesmo observou um aumento de proteínas com pesos moleculares entre 108-110 kDa e 75-76 kDa. Desta forma, sugere-se que outras proteínas que não foram avaliadas no presente estudo podem assumir o papel de modular a síntese de PGF2 $\alpha$  pelo estímulo do 17 $\beta$ -estradiol. Em complemento Oliveira (2017) utilizando a técnica de imunohistoquímica, verificou que o 17 $\beta$ -estradiol modulou de maneira oposta os isotipos de PKCs, aumentando PKC  $\gamma$  no epitélio luminal e ao mesmo tempo diminuindo a abundância de transcritos e da proteína PKC  $\alpha$ . A mesma autora sugere que os diferentes subtipos de PKCs podem regular a síntese de PGF2 $\alpha$  de forma específica.

Considerando tais resultados sugere-se outros possíveis mecanismos de atuação do E2. Os receptores de E2 também estão presentes na membrana celular e uma vez ativados também desencadeiam respostas celulares por mecanismos não genômicos (HO E LIAO,2002). Razandi et al (1999), observaram que o receptor de E2 ativado é capaz de ativar a atividade da c-Jun quinase (JNK). A c-Jun ativada por JNK atuaria na transcrição gênica. Considerando tais observações, o E2 poderia exercer indiretamente um efeito genômico na célula, não atuando como o próprio elemento de resposta na transcrição gênica, mas favorecendo a atuação de outros elementos de resposta. Outra possibilidade de atuação do E<sub>2</sub> seria pela participação estimulando as vias ERK1/2, JNK/SAPK e p38 MAPK, pelo estímulo na síntese dessas proteínas ou na ativação de tais proteínas, que associadas ao CI ativariam PKC e PLA2 estimulando a síntese de PGF2 $\alpha$  no endométrio bovino. Ainda seria possível a interação destes mecanismos. Mais estudos tornam-se necessários para a elucidação dos mecanismos de ação pelos quais o estradiol estimula a síntese de PGF2 $\alpha$  em células endometriais bovinas.

## 8. CONCLUSÃO

No presente estudo a hipótese de que o estradiol estimula a síntese das proteínas PKC e PLA2 não foi confirmada.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMANN, E. J.; DENNIS, E. A. Mammalian calcium-independent phospholipase A2. **Biochim Biophys Acta**, .n. 1259, p. 125-136, 1995.

ACCONCIA, F.; MARINO, M. Synergism between genomic and non genomic estrogen action mechanism. **IUBMB Life**, v. 55, n. 3, p. 145-50, 2003.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia molecular da célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 1294 p.

ASSELIN, E.; GOFF, K. A.; BERGERON, H.; FORTIER, M. A. Influence of sex steroids on the production of prostaglandin F<sub>2a</sub> and E<sub>2</sub> and response to oxytocin in cultured epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 371-379, 1996.

BATE, C.; SALMONA, M.; DIOMEDE, L.; WILLIAMS, A. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 14983–14990, 2004.

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-2 from bovine endometrial cells. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 417-424, 2000.

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

BURLANDO, B.; MARCHI, B.; PANFOLI, I.; VIARENGO, A. Essential role of Ca<sup>2+</sup>-dependent phospholipase A2 in estradiol-induced lysosome activation. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 283, n. 5, p. C1461-1468, 2002.

BURNS, P. D.; GRAF, G. A.; HAYES, S.; SILVIA, W. J. Cellular mechanisms by which oxytocin stimulates uterine prostaglandin F<sub>2a</sub> synthesis in bovine endometrium: roles of phospholipases C and A2. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 14, n. 3, p. 181-191. 1997.

BURNS, P. D.; MENDES JR, J. O. B.; YEMM, R. S.; CLAY, C. M.; NELSON, S. E.; CARAM-BULA, S. F.; MAITIKAINEM, T.; AITIKAINNEM, T. Caspase-3 is a pivotal mediator of a-

apoptosis during regression of ovarian corpus luteum. **Endocrinology**, v. 143, p. 1495-1501, 2002.

CASTRO E PAULA, L. A. **As funções do estradiol no processo da luteólise em bovinos: o papel da ocitocina na produção de PGF2 $\alpha$** . 2003. 202 f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

CHAKRABORTI, S. Phospholipase A(2) isoforms: a perspective. **Cell. Signal.**, v. 15, p. 637–665, 2003.

CHEN, D.; BIRD, I. M.; ZHENG, J.; MAGNESS, R. S. Membrane estrogen receptor-dependent extracellular signal-regulated kinase pathway mediates acute activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen in uterine artery endothelial cells. **Endocrinology**, v. 145, n. 1, p. 113-125, 2004.

CHEN, D.; WESTFALL, S. D.; FONG, H. W.; ROBERSON, M. S.; DAVIS, J. S. Prostaglandin F $_{2\alpha}$  stimulates the Raf/MEK1/Mitogen-activated protein kinase signaling cascade in bovine luteal cells. **Endocrinology**, v. 139, n. 9, p. 3876-3885, 1998.

CLARK, J. D.; LIN, L. L.; KRIZ, R. W.; RAMESH, C. S.; SULTZMAN, L. A.; LIN, A. Y.; MILONA, N.; KNOPE, J. L. A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains Ca $^{2+}$ -dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. **Cell**, v. 65, p. 1043-1051, 1991.

CUMMINGS, B. S.; MCHOWAT, J.G.; SCHNELLMANN, R.G. Phospholipase A2s in cell injury and death. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 294, p. 793–799, 2000.

DA CUNHA, P. M. **O estímulo do estradiol na produção de PGF2 $\alpha$  endometrial é dependente da síntese de proteínas?** 2004. 146 f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

DANET-DESNOYERS, G.; MEYER, M.D.; GROSS, T. S.; JOHNSON, J. W.; THATCHER, W. W. Regulation of endometrial prostaglandin synthesis during early pregnancy in cattle: effects of phospholipase and calcium in vitro. **Prostaglandins**, v. 50, p. 313-330, 1995.

DAVIS, S. R.; COLLIER, R. J.; MCNAMARA, J. P. Effects of thyroxine and growth hormone treatment of dairy cows on mammary uptake of glucose, oxygen and other milk fat precursors. **Journal of Animal Science**, v. 66, p. 80- 89, 1988.

DIOUF, M.N.; SAYASITH, K.; LEFEBVRE, R.; SILVERSIDES, D.W.; SIROIS, J.; LUSSIER, J.G. Expression of phospholipase A2 group IVA (PLA2G4A) is upregulated by human chorionic gonadotropin in bovine granulosa cells of ovulatory follicles. **Biol. Reprod.**, v. 74, p. 1096-1103, 2006.

FAROOQUI, A. A.; HORROCKS, L. A. Involvement of glutamate receptors, lipases, and phospholipases in long-term potentiation and neurodegeneration. **J. Neurosci Res.**, v. 36, p. 267-323, 1994.

FAROOQUI, A.A.; YANG, H.C.; HORROCKS, L.A. Involvement of phospholipase A2 in neurodegeneration. **Neurochem Int.**, v. 30, p. 517-522, 1997.

FITZPATRICK, F. A.; SOBERMAN, R.. Regulated formation of eicosanoids. **Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 11, p. 1347-1351, 2001.

FUENTES, L.; HERNANDEZ, M.; FERNANDEZ-AVILES, F. J.; CRESPO M. S.; NIETO M. L. Cooperation between secretory phospholipase A2 and TNF-receptor superfamily signaling: implications for the inflammatory response in atherogenesis. **Circ Res**, v. 91, p. 681-688, 2002.

FUENTES, L.; PÉREZ, R.; NIETO, M.L.; BALSINDE, J.; BALBOA, M.A. Bromoenol lactone promotes cell death by a mechanism involving phosphatidate phosphohydrolase-1 rather than calcium-independent phospholipase A2. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 44683-44690, 2003.

FORTIER, M. A.; KRISHNASWAMY, K; DANYOD, G.; BOUCHER-KOVALIK, S.; CHAPDELAINE, P. J. A. A postgenomic integrated view of prostaglandins in reproduction: implications for other body systems. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 59, Suppl. 1, p. 65-89, 2008.

GIJON, M. A.; LESLIE, C. C. Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A2 activation. **Journal of Leukocytes Biology**, v. 65, p. 330-336, 1999.

GRONICH, J.; KONIECZKOWSKI, M.; GELB, M. H.; NEMENOFF, R. A. Sedor JR Interleukin-1 causes rapid activation of cytosolic phospholipase A2 by phosphorylation in rat mesangial cells. **J. Clin. Investig.**, v. 93, p. 1224-1233, 1994.

GUZELOGLU, A.; BINELLI, M.; BADINGA, L.; HANSEN, T.R.; THATCHER, W.W. Inhibition of phorbol ester-induced PGF2 $\alpha$  secretion by IFN- $\tau$  is not through regulation of protein kinase C. **Prostaglandins Other Lipid Mediators**, v. 74, n.1-4, p. 87-99, 2004.

HUGHES, T. L.; VILLA-GODOY, A.; KESNER, J.S.; FOGWELL, R.L. Destruction of bovine ovarian follicles: effects on the pulsatile release of luteinizing hormone and prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ -induced luteal regression. **Biology of Reproduction**, v. 36, n. 3, p. 523-529, 1987.

HO, K. J.; LIAO, J. K. Non-nuclear actions of estrogen: new targets for prevention and treatment cardiovascular disease. **Molecular Interventions**, v. 2, n. 4, p. 219-228, 2002.

ALVES JUNIOR, S.; CASTRO, F.; SOARES, N.; PEREIRA, F.; BALIEIRO, J.; MUNIN, F.; CESAR, M.; BINELLI, M.; MEMBRIVE, C. Estradiol-17 $\beta$  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. 1, p. 27-37, 1 fev. 2011

KNICKERBOCKER, J. J.; THATCHER, J. J.; FOSTER, D. B.; WOLFENSON, D.; BARTOL, F. F.; CATON, D. Uterine production of PGF<sub>2</sub> $\alpha$  in response to estradiol-17 $\alpha$  in cyclic cattle. **Annual Meeting of ASAS and CSAS**, At University of Guelph, Ontario, v. 8-11, p. 364, 1986.

KIM, J. J.; FORTIER, M. A. A cell type specificity and protein kinase C dependency on the stimulation of prostaglandin E<sub>2</sub> and prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  production by oxytocin and platelet-activating factor in bovine endometrial cells. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 103, p. 239-247, 1995.

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 $\alpha$  in cyclic cattle. **Prostaglandins**, v. 31, p. 757-767, 1986.

McCRACKEN, J. A.; BARCIKOWSKI, B.; CARLSON, J. C. The physiological role of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  in corpus luteum regression. **Advanced Bioscience**, v. 9, p. 599-624, 1973.

MEIDAN, R.; MILVAE, R. A.; WEISS, S. Intraovarian regulation of luteolysis. **Journal of Reproduction and Fertility Suppl**, v. 54, p. 217-228, 1999.

MEMBRIVE, C.M. ; CUNHA, PAULINE M.D ; MEIRELLES, F.V. ; BINELLI, M. Calcium potentiates the effect of estradiol on PGF<sub>2</sub> $\alpha$  production in the bovine endometrium. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 5, p. 25, 2014.

MICHIE, A. M. e NAKAGAWA, R. "The link between PKC  $\alpha$  regulation and cellular transformation." **Immunol. Lett.**, n. 96, v. 2, p. 155-62. 2005.

MURAKAMI, M.; KUDO, I. Cellular arachidonate-releasing functions of various phospholipase A2s. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 525, p. 87–92, 2003.

MOURA, P.R.; VIDAL, P.A.F. Transdução de sinais: uma revisão sobre proteína G. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 21, n.1, p. 31-36, 2011.

NALEFSKI, E.A.; SULTZMAN, L.A.; MARTIN, D.M.; KRIZ, R.W.; TOWLER, P.S.; KNOFF, J.L.; CLARK, J.D. Delineation of two functionally distinct domains of cytosolic phospholipase A2, a regulatory  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent lipid-binding domain and a  $\text{Ca}^{2+}$ -independent catalytic domain. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 27, p. 18239-18249, 1994.

PIPER, P.J.; VANE, J.R.; WYLLIE, J.H. Inactivation of prostaglandins by the lungs. **Nature**, v. 225, p. 600-604, 1970.

PRINTCHARD, J. Y.; SCHRICK, F.N.; INSKEEP, E.K. Relationship of pregnancy rate to peripheral concentrations of progesterone and estradiol in beef cows. **Theriogenology**, v. 42, n. 2, p. 247-259, 1994.

PUBCHEM. **Guanosine-5'-diphosphate**. 2015. Disponível em: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/guanosine\\_diphosphate](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/guanosine_diphosphate). Acesso em: 18 de janeiro de 2019.

PUGLIESI, G.; NISHIMURA, T. K; MELO, G. D; MEMBRIVE, C. M. B; NAVES, J. R.; CARVALHO, G. R. Regressão espontânea do corpo lúteo em bovinos. **ARS Veterinaria**, Jaboticabal, v. 33, n. 1, p. 001-012, 2017

RAZANDI, M.; PEDRAN, A.; GREENE, G. L.; LEVIN, E. R. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ER $\alpha$  and ER $\beta$  expressed in Chinese Hamster ovary cells. **Molecular Endocrinology**, v. 13, n. 2, p. 307-319, 1999.

RIENDEAU, D.; GUAY, J.; WEECH, P.K.; LALIBERTE, F.; YERGEY, J.; LI, C.; DESMARAIS, S.; PERRIER, H.; LIU, S. NICOLL-GRIFFITH, D. Arachidonyl trifluoromethyl ketone, a potent inhibitor of 85-kDa phospholipase A2, blocks production of arachidonate and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid by calcium ionophore-challenged platelets. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 22, p. 15619-15624, jun. 1994

ROSENFELD, C.S.; YUAN, X.; MANIKKAM, M.; CALDER, M.D.; GARVERICK, H.Á. Sequencing, cloning and localization of bovine estrogen receptor-beta (ER $\beta$ ) in reproductive tract of the cow. **Biology of Reproduction**, v. 58, suppl. 1, p. 120, 1998.

SCHWARTZ, Z.; SYLVIA, D.L.; GUINEE, T.; DEAN, D.D.; BOYAN, B.D. Tamoxifen elicits it is 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.

SHANKER, G.; ASCHNER, M. Methylmercury-induced reactive oxygen species formation in neonatal cerebral astrocytic cultures is attenuated by antioxidants. *Mol. Brain Res.*, v. 110, p. 85-91, 2003.

SINGER, H. A. **“Protein kinase C” biochemistry of smooth muscle contraction.** [S.l.: s.n.] 1996. , cap. 12, p. 155-165.

SKARZYNSKI, D.; BOGACKI, M.; KOTWICA, J. Involvement of ovarian steroids in basal and oxytocin-stimulated prostaglandin F2a secretion from bovine endometrium *in vitro*. **Therigenology**, v. 52, p. 385-397, 1999.

SMALHEISER, N.R.; DISSANAYAKE, S.; KAPIL, A. Rapid regulation of neurite out-growth and retraction by phospholipase A2-derived arachidonic acid and its metabolites. **Brain Res.**, v. 721, n.1-2, p. 39-48, 1996.

SMITH, W. L.; DEWITT, D. L. Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. In: DIXON, F. J. (Ed.) **Advances in Immunology**. v. 62. [S.l.] : Academic Press, 1996. p. 167-215.

STREET, I.P.; LIN, H.K.; LALIBERTE, F.; GHOMASHCHI, F.; WANG, Z.; PERRIER, H.; TREMBLAY, N.M.; HUANG, Z.; WEECH, P.K.; GELB, M.H. Slow and tight-binding inhibitors of the 85-kDa human phospholipase A2. **Biochemistry**, v. 32, p. 5935-5940, 1993.

TANG, J.; KRIZ, R. W.; WOLFMAN N, S. M.; SEEHRA, J.; JONES, S. S. A novel cytosolic calcium-independent phospholipase A2 contains eight ankyrin motifs. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 8567–8575, 1997.

THATCHER, W. W.; DRIANCOURT, M.A.; TERQUI, M.; BADINGA, L. Dynamics of ovarian follicular development in cattle following hysterectomy and during early pregnancy. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 8, n. 2, p. 223- 234, 1991.

THATCHER, W. W.; TERQUI, M.; THIMONIER, J.; MAULEON, P. Effects of estradiol-17â on peripheral plasma concentration of 15-keto-13,14-dihydro PGF<sub>2â</sub> and luteolysis in cyclic cattle. **Prostaglandins**, v. 31, n. 4, p. 745-756. 1986.



THOMAS, W.; COEN, N.; FAHERTY, S.; FLATHARTA, C. O.; HARVEY, B. J. Estrogen induces phospholipase A2 activation through ERK1/2 mobilize intracellular calcium in MCF-7 cells. **Steroids**, v. 71, p. 256-265, 2006.

TRIMBLE, L. A.; STREET, I. P.; PERRIER, H.; TREMBLAY, N. M.; WEECH, P. K.; BERNSTEIN MA. NMR structural studies of the tight complex between a trifluoromethyl ketone inhibitor and the 85-kDa human phospholipase A<sub>2</sub>. **Biochemistry**, 1993, v. 32, p. 12560–12565, 1993.

TITHOF, P. K.; ROBERTS, M. P.; GUAN, W.; ELGAYYAR, M.; GODKIN, J. D. Distinct phospholipase A2 enzymes regulate prostaglandin E2 and F2alpha production by bovine endometrial epithelial cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 5, p. 16, 2007.

TOKER, A. Signaling through protein kinase C. **Frontiers in Bioscience**, v. 3, p. 1134-114, 1998.

TOULLEC, D. ; PIANETT, P. I; COSTE, H.; BELLEVERGUE; BELLEVERGUE, P.; GRAND-PERRET, T.; AJAKANE, M.; BAUDET, V.; BOISSIN, P.; BOURSIER, E.; LORIOLE, F. The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase. **C. J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 15771-15781, 1991.

TRIMBLE, L. A.; STREET, I. P.; PERRIER, H.; TREMBLAY, N. M.; WEECH, P. K.; BERNSTEIN, M.A. NMR structural studies of the tight complex between a trifluoromethyl ketone inhibitor and the 85-kDa human phospholipase A2. **Biochemistry**, v. 32, p. 12560-12565, 1993.