

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO DE mRNA E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS
DAS VIAS DA ARGININA NO ENDOMÉTRIO, CONCEPTOS E
PLACENTOMAS EM OVELHAS**

Amanda Nonato
Zootecnista

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS JABOTICABAL

**EXPRESSÃO DE mRNA E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS
DAS VIAS DA ARGININA NO ENDOMÉTRIO, CONCEPTOS E
PLACENTOMAS EM OVELHAS**

Amanda Nonato

Orientadora: Profa. Dra. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima

Coorientadores: Profa. Dra. Lindsay Unno Gimenes e

Prof. Dr. Fuller Warren Bazer

**Tese apresentada à
Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias – Unesp, Campus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
a obtenção do título de Doutora
em Genética e Melhoramento Animal**

2017

	Nonato, Amanda
N812e	Expressão de mRNA e identificação de proteínas das vias da arginina no endométrio, conceptos e placentomas em ovelhas / Amanda Nonato. -- Jaboticabal, 2017
	x, 34 p. : il. ; 29 cm
	Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
	Orientadora: Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima Banca examinadora: Marcelo Emílio Beletti, Benner Geraldo Alves Prado, Maria Emília Franco Oliveira, Amélia Katiane de Almeida
	Bibliografia
	1. Poliaminas. 2. Peri-implantação. 3. Ovinos. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.
	CDU 636.3:636.082

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: EXPRESSÃO DE mRNA E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DAS VIAS DA ARGININA NO ENDOMÉTRIO, CONCEPTOS E PLACENTOMAS EM OVELHAS

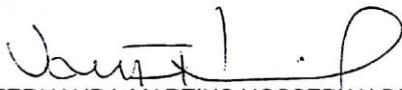
AUTORA: AMANDA NONATO

ORIENTADORA: VERA FERNANDA MARTINS HOSSEPIAN DE LIMA

COORIENTADOR: FULLER WARREN BAZER

COORIENTADORA: LINDSAY UNNO GIMENES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:



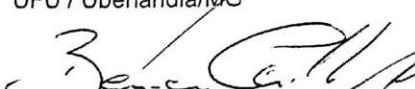
Profa. Dra. VERA FERNANDA MARTINS HOSSEPIAN DE LIMA
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. MARIA EMÍLIA FRANCO OLIVEIRA
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. MARCELO EMÍLIO BELETTI
UFU / Uberlândia/MG



Prof. Dr. BENNER GERALDO ALVES
UFU / Uberlândia/MG



Pós-doutoranda AMÉLIA KATIANE DE ALMEIDA
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 31 de março de 2017.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

AMANDA NONATO – Nascida na cidade de Araraquara, em 9 de Maio de 1988. Ingressou em Fevereiro de 2007 no curso de Zootecnia na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal. Foi bolsista de iniciação científica do CNPq no período de Agosto de 2009 a Julho de 2010 no setor de ovinocultura e foi bolsista de iniciação científica do CNPq no período de Agosto de 2010 a Julho de 2011 no Laboratório de Reprodução Animal. Gradudou-se em Zootecnia em Fevereiro de 2012 e, em Março de 2012 iniciou o curso de pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal, em nível de mestrado (bolsista CAPES) na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, concluindo em Fevereiro de 2014. Ingressou em Março de 2014, no curso de doutorado (Bolsista CAPES) nesta mesma instituição. No período de Março a Setembro de 2016, realizou estágio de doutorado sanduiche na Texas A&M University, College Station, Texas, Estados Unidos.

*Há quem diga quanto tempo eu perdi
Mas só eu sei das emoções que senti
Apostando em caminhos incertos
Nem mesmo eu sei se um dia acerto*

*Dos erros, eu esqueço o fracasso
E aprendo lições que eu mesmo faço
O destino, que as vezes passa rasteira
Já virou meu amigo, aquele livro preferido de cabeceira*

*Eu então eu escolho o talvez
Porque a certeza me traz insensatez
Eu vou vivendo sem pestanejar
No fundo eu sei que a felicidade vem me encontrar*

Amanda

Dedico

aos meus pais, Milton, Luci e a minha irmã Ariane

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Milton e Luci e a minha irmã Ariane, por todo amor, dedicação, e apoio em todos os momentos. A todos os familiares que sempre me incentivaram e torceram pelas minhas conquistas.

A minha orientadora Profa. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado nos últimos 7 anos, pela confiança, pelos ensinamentos, conselhos, amizade, por todo carinho e atenção em qualquer detalhe da minha vida. A minha eterna segunda chefe Aline Costa de Lucio Prado, que mesmo distante, participou da minha trajetória me aconselhando sempre.

Aos membros da banca examinadora: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti, Profa. Dra. Maria Emília Franco Oliveira, Dr. Benner Geraldo Alves e Dra. Amélia Katiane Almeida, por aceitarem o convite e pela contribuição no presente trabalho.

A minha coorientadora Dra Lindsay Unno Gimenes, pelos ensinamentos e contribuições no presente trabalho.

Ao meu orientador Dr. Fuller Warren Bazer, e demais professora da Texas A&M University (TAMU), Kathrine Dunlap e Carey Satterfield, por tornarem possível a realização desta pesquisa.

A todos novos amigos que conheci durante minha trajetória na TAMU: Yasser, Colin, Kitty, John, Elizabeth, Camila, Dhafer, Katie, Sarah, Wanjin e Alex.

Ao meus queridos roommates, José, Rui, Vinícius e Meaghan, que tornaram meus dias no Texas muito especiais.

As minhas amigas Duda e Amélia, por se tornarem minhas irmãs, e por todos os momentos vividos. Vocês tornaram a minha vivência no Texas incrível.

Ao Professor Danísio Munari, que como Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal, não mediu esforços para atender todas as necessidades que esse projeto impôs até que se tornasse minha Tese de Doutorado.

As Professoras, Dra. Sandra Aidar de Queiroz, Dra. Maria Emília Franco Oliveira, Dra. Maricy Apparicio e Dra. Eliandra Buttler, pelas sugestões que contribuíram muito para este trabalho no exame de qualificação.

Ao Ricardo Percin Nociti, que esteve sempre de prontidão para ajudar no que foi necessário, pela amizade e pela contribuição essencial nas análises estatísticas dessa pesquisa.

Aos docentes do departamento de Reprodução Animal, a Roberta Vantini, Isabel Natarelli, Ivo Almeida e Edson por estarem sempre dispostos a ajudarem no que preciso.

Aos amigos do laboratório de Reprodução Animal: Luísa, Raquel, Mariana, Cecília, Anelise, Aderson, Ludmilla, Guilherme e Natália.

A todos os funcionários da seção de pós-graduação pela prontidão em ajudar e atender, especialmente Branca e Diego.

As minhas queridas companheiras de asilo, Nomaiací (Noni), Maria Eulália (Írrah), Juliana Akamine, (July), e Luana (Si-acha) pela amizade, companheirismo e apoio durante os anos vividos.

A CAPES pela bolsa concedida

A Deus e a minha padroeira Nossa Senhora Aparecida.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Desenvolvimento peri-implantacional de conceptos ovinos	3
2.2. Vias metabólicas da arginina para produção de poliaminas	6
3. OBJETIVOS	10
3.1. Objetivo geral.....	10
3.2. Objetivos específicos	10
4. MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1 Local e Animais.....	11
4.2 Experimento 1: Avaliação da expressão dos genes <i>ARG1</i> , <i>ODC1</i> , <i>ADC</i> e <i>AGMAT</i> em conceptos durante o período de peri-implantação	12
4.3 Experimento 2: Avaliação da localização das proteínas <i>ARG1</i> , <i>ODC1</i> , <i>ADC</i> e <i>AGMAT</i> em conceptos e endométrio durante o período a peri-implantação.....	12
4.4 Experimento 3: Avaliação da expressão e da localização das proteínas <i>ARG1</i> , <i>ODC1</i> , <i>ADC</i> e <i>AGMAT</i> em placentomas no período pós-implantacional.....	13
4.5 Análise de Expressão Gênica por PCR quantitativo em Tempo Real.....	13
4.5.1 Extração de RNA total.....	13
4.5.2. Síntese de cDNA.....	14
4.5.3. Teste dos “primers”	15
4.5.4. Reações de PCR em tempo real.....	16
4.6 Análise Imunohistoquímica (IHQ).....	17
4.7 Análise Estatística.....	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
5.1 Experimento 1: Avaliação da expressão dos genes <i>ARG1</i> , <i>ODC1</i> , <i>ADC</i> e <i>AGMAT</i> em conceptos durante o período de peri-implantação.	20

5.2 Experimento 2: Avaliação da localização das proteínas ARG1, ODC1, ADC e AGMAT em conceptos e endométrio durante o período a peri-implantação.....	22
5.3 Experimento 3: Avaliação da expressão e da localização das proteínas ARG1, ODC1, ADC e AGMAT em placentomas no período pós-implantacional.....	26
6. CONCLUSÃO.....	29
7. REFERÊNCIAS.....	30

EXPRESSÃO DE mRNA E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DAS VIAS DA ARGININA NO ENDOMÉTRIO, CONCEPTOS E PLACENTOMAS EM OVELHAS

RESUMO – A arginina é um aminoácido nutricionalmente essencial, importante na gestação de mamíferos, pois aumenta a sobrevivência, crescimento e desenvolvimento de embriões, fetos e neonatos. A arginina pode ser utilizada na síntese de poliaminas por uma via metabólica clássica, porém estudos recentes revelaram uma importante via alternativa. Todavia, ambas foram pouco investigadas. Nesse contexto, estudos são necessários a fim de identificar a ocorrência das vias metabólicas da arginina nos tecidos reprodutivos durante a gestação de ovelhas. Assim o presente estudo teve como objetivos: a) avaliar a expressão de genes das vias metabólicas da arginina em conceptos durante o período de peri-implantação em ovelhas; b) identificar a localização das proteínas das vias metabólicas da arginina em conceptos e no endométrio durante o período de peri-implantação em ovelhas; e c) identificar a localização das proteínas das vias metabólicas da arginina em placentomas em ovelhas. Para tanto, ovelhas da raça Rambouillet (n=72) foram sincronizadas e após detecção do estro por machos vasectomizados, foram cobertas por machos da raça Suffolk com fertilidade comprovada. No experimento 1, as ovelhas (n=20) foram hysterectomizadas aos 13, 14, 15 ou 16 dias de gestação, e os fragmentos de conceptos coletados foram congelados em nitrogênio líquido a fim de se estudar a expressão gênica. No experimento 2, ovelhas (n=28) também foram hysterectomizadas aos 13, 14, 15 ou 16 dias de gestação e, seções de conceptos e de endométrio, foram fixados a fim de avaliar a localização de proteínas por imunohistoquímica. No experimento 3, ovelhas (n=24) foram hysterectomizadas aos 40, 60, 80, 100, 120 ou 140 dias de gestação e placentomas foram coletados e fixados para posterior análise imunohistoquímica. Os dados de expressão gênica foram analisados utilizando o procedimento GLM do SAS e as diferenças na intensidade da imunomarcagem foram avaliadas com o software R, foi realizada a análise de variância (ANOVA). O nível de significância considerado foi $<0,05$. A expressão dos genes *ADC* e *AGMAT* (via alternativa), não foi alterada ao longo dos dias de gestação, e o mesmo ocorreu para o gene *ARG1* (via clássica). O gene *ODC1* (via clássica) apresentou maior expressão aos 13 dias de gestação ($P=0,06$). A análise imunohistoquímica identificou as proteínas ARG1, ODC1, ADC e AGMAT nos diferentes tecidos e dias de gestação, evidenciando a importância da ambas vias durante a gestação. A presença das proteínas no epitélio luminal do endométrio aumentou ($p=0,038$) após os 13 dias de gestação e foi significativamente maior aos 16 dias, sugerindo que essas proteínas são requeridas em maiores concentrações para o processo de alongamento do conceito e implantação. No epitélio glandular, a presença das proteínas não foi alterada ($p=0,64$) ao longo dos dias estudados. Não foi observada diferença ($p=0,472$) entre a identificação das proteínas no trofotoderma dos conceptos ao longo dos dias. Nos placentomas, a presença das proteínas foi menor ($p<0,01$) aos 40 dias de gestação, quando comparadas com os dias 60, 120 e 140. Os resultados do presente estudo evidenciam a importância de ambas vias metabólicas da arginina, para produção de poliaminas, durante o período gestacional de ovelhas.

Palavras chave: poliaminas, peri-implantação, ovinos, qPCR.

mRNA EXPRESSION AND PROTEINS IDENTIFICATION FROM ARGININE PATHWAYS ON ENDOMETRIUM, CONCEPTUSES AND PLACENTOMES IN EWES.

ABSTRACT - Arginine is a nutritionally essential amino acid, important for pregnancy in mammalian, to increase the survival, growth and development of embryos, fetuses and neonates. Arginine can be used in the synthesis of polyamines by a classical metabolic pathway, though recent studies revealed an important alternative pathway, however, both have been poorly investigated. In this context, studies are necessary in order to identify an occurrence of arginine metabolic pathways in the reproductive tissues during a pregnancy in ewes. The present study had as objectives: a) evaluate the gene expression in the metabolic pathways of arginine, in concepts during the pre-implantation period of pregnancy in ewes; b) to identify the localization of proteins, from the metabolic pathways of arginine, in concepts and uterine endometrium during the pre-implantation period of pregnancy in ewes; and c) to identify the localization of proteins, from the metabolic pathway of arginine, in placentomes during the pre-implantation period of pregnancy in ewes. Rambouillet ewes (n=72) were synchronized and after estrus detection by vasectomized males, ewes were mated by Suffolk males with proven fertility. In experiment 1, ewes (n=20) were hysterectomized at days 13, 14, 15 or 16 of pregnancy, and the sections of concepts collected were frozen in liquid nitrogen in order to study gene expression. In the experiment 2, ewes (n=28) were also hysterectomized at days 13, 14, 15 or 16 of pregnancy, sections of conceptuses and uterine endometrium were fixed in order to identify the protein localization by immunohistochemical analysis. In experiment 3, ewes (n=24) were hysterectomized on days 40, 60, 80, 100, 120 or 140 days of pregnancy, placentomes were collected and fixed for immunohistochemical analysis. Data analysis of gene expression was analyzed using GLM procedure of SAS and differences in the intensity of the immunostaining were evaluated using software R, analysis of variance (ANOVA) was performed. Significance level was declared < 0.05 . The expression of ADC and AGMAT genes (alternative pathway) did not alter across days of pregnancy, and the same happened with *ARG1* gene (classic pathway). The *ODC1* gene (classic pathway) showed greater expression at 13 days of pregnancy ($P=0.06$). The immunohistochemical analysis identified ARG1, ODC1, ADC and AGMAT proteins in all tissues and days of pregnancy studied, evidencing the relevance of both pathways during pregnancy. The identification of proteins on lumen epithelia from endometrium improved ($p=0.038$) after Day 13 of pregnancy and it was significantly greater on Day 16, suggesting that these proteins are required in higher concentrations for conceptuses elongation and implantation. On glandular epithelia, the proteins identification did not change ($p=0.64$) across days of pregnancy. No difference was observed ($p=0.472$) between the proteins identification on trophoblast across days. On placentomes, the proteins identification was lower ($p<0.01$) on Day 40 of pregnancy compared with Days 60, 120 and 140. The results of the experiment indicate that relevance of both metabolic pathways of arginine to polyamines production during the pregnancy period in ewes.

Keywords: polyamines, perimplantation, ovine, qPCR.

LISTA DE ABREVIATURAS

µg - micrograma

µL - microLitro

µm – micrometro

D13 – 13 dias de gestação

D14 – 14 dias de gestação

D15 – 15 dias de gestação

D16 – 16 dias de gestação

ACTB – actin, beta

ADC – arginina descarboxilase

AGMAT – agmatinase

ARG1 – arginase 1

cAMP – adenosine 3',5'-monofosfato cíclico

CAR – tecido caruncular

cDNA – DNA complementar

CIDR – dispositivo intravaginal

CL – corpo lúteo

cm – centímetros

COT – tecido cotiledonário

Cq – cilos de quantificação

CT – “threshold cycle”

DAB – 3,3' diaminobenzidina tetrahidrocloreto,

EGs – epitélio glandular superficial

EL – epitélio luminal

GADPH – glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GL – grau de liberdade

GLM – general linear model – modelo linear geral

h - horas

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

IgG - imunoglobulina

M - molar

mg - miligrama

min - minutos

mL - mililitro

mm - milímetro

mRNA – RNA mensageiro

ng - nanograma

nM - nanomolar

NO – óxido nítrico

ODC1 – ornitina descarboxilase

PBS – tampão fosfato-salino

PCR – reação em cadeia da polimerase

pH – potencial hidrogeniônico

qPCR – PCR quantitativa em tempo real

RNA – ácido ribonucléico

rpm – rotações por minuto

SAS – Statistical Analysis System

siRNA – “small interfering RNA”, pequenos fragmentos de RNA

SLC7A1 – solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, Y+ system) member 1

Tris-HCl – cloridrato de trizma

g – força *g*

As abreviações utilizadas no estudos estão no idioma inglês.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Nomes, símbolos e sequências “forward” e “reverse” dos “primers” que foram utilizados na qPCR, para avaliação da expressão de genes das vias da arginina para produção de poliaminas em conceptos ovinos no período de peri-implantação.

Tabela 2. Isotipo, diluição e fornecedores dos anticorpos utilizados nas análises imunohistoquímicas de conceptos, endométrio uterino e placentomas de ovelhas, coletados no período pós-implantacional.

Tabela 3. Ciclos de quantificação (Cq) dos genes *ARG1* (arginase), *ODC1* (ornitina descarboxilase), *ADC* (arginina descarboxilase) e *AGMAT* (agmatinase) em conceptos ovinos durante o período de peri-implantação da gestação.

Tabela 4. Quantificação, de acordo com os escores, da imunomarcação de ARG1, ODC1, ADC1 e AGMAT no epitélios luminal, glandular e luminal + glandular do endométrio de ovelhas durante o período de peri-implantação.

Tabela 5. Quantificação, de acordo com os escores, da imunomarcação de ARG1, ODC1, ADC1 e AGMAT em conceptos ovinos durante o período de peri-implantação.

Tabela 6. Quantificação, de acordo com os escores, da imunocoloração de ARG1, ODC1, ADC1 e AGMAT em placentomas ovinos durante o período a gestação.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Conceptos ovinos passam por transição morfológica de tubulares (dia 13) a alongados e filamentosos entres os dias 14 a 16 de prenhez, régua=0,5 cm (Fonte: Adaptado de Wang et al., 2014a).

Figura 2. Eventos durante o início da gestação em ovinos. O esquema sumariza as mudanças ocorridas no desenvolvimento de embriões/blastocistos após a fertilização em relação à posição no trato reprodutivo feminino. A fertilização ocorre no oviduto, e no estágio de mórula, os embriões entram no útero nos dias 4-5. Blastocistos se formam no dia 6, eclodem a zona pelúcida no dia 8, e se transformam de esféricos para forma tubular no dia 11. Entre os dias 12 a 16 iniciam o alongamento, com o início da implantação envolvendo a aposição e ligação (dias 12-15) e firme adesão até o dia 16. No dia 17, o concepto filamentososo ocupa todo o corno uterino ipsilateral e também se alonga pelo corno uterino contralateral (Fonte: Adaptado de Spencer et al., 2007).

Figura 3. Via esquemática pela qual ADC e AGMAT participam da biossíntese compensatória *de novo* de poliaminas para suportar o crescimento e desenvolvimento de conceptos. A Biossíntese *de novo* de poliaminas em conceptos é principalmente por meio da via metabólica clássica ODC1-dependente (arginina-ornitina-putrescina). No entanto, a via metabólica alternativa ADC/AGMAT-dependente também existe em conceptos ovinos. Na ausência da proteína ODC1, a expressão do ADC e AGMAT aumentam para promover quantidades adequadas de poliaminas para suportar o desenvolvimento do concepto. Porém, parece haver uma considerável variação no grau de ativação da via alternativa ADC/AGMAT pelos conceptos. Alterações na abundância de agmatina no lúmen uterino podem refletir em papéis funcionais múltiplos no útero gestante. Tr (trofotoderma), En (endoderma), OCT (ornitina carbamoiltransferase), CP (fosfato de carbamoilo), SLC7A1 (solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, Y+ system) member 1), BH4 (tetra-hidrobiopterina), NOS3 (óxido nítrico sintase 3), Pi (fosfato), CP (carbamoil fosfato), NO (óxido nítrico). (Fonte: Adaptado de Wang et al., 2014a).

Figura 4. Secções do endométrio uterino de ovelhas aos 13, 14, 15 e 16 de gestação. ARG1, arginase; ODC1, ornitina descarboxilase; ADC, arginina descarboxilase; AGMAT, agmatinase; IgG, imunoglobulina; EL, epitélio luminal; EGs, epitélio glandular superficial; EG, epitélio glandular; barra de escala: 100µm, aumento 10X.

Figura 5. Secções dos conceptos ovinos aos 14, 15 e 16 dias de gestação. ARG1, arginase; ODC1, ornitina descarboxilase; ADC, arginina descarboxilase; AGMAT, agmatinase; IgG, imunoglobulina; Tr, trofotoderma, barra de escala: 50µm, aumento 40X.

Figura 6. Secções de placentomas ovinos aos 40, 60, 80, 100, 120 e 140 de gestação. ARG1, arginase; ODC1, ornitina descarboxilase; ADC, arginina descarboxilase; AGMAT, agmatinase; IgG, imunoglobulina. CAR: tecido caruncular, COT: tecido cotiledonário; barra de escala: 100 µm, aumento 40X.

1. INTRODUÇÃO

A arginina é um aminoácido classificado como nutricionalmente essencial em mamíferos, pois está presente na formulação de dietas para melhorar a eficiência do uso de nutrientes, crescimento, desenvolvimento, lactação e reprodução. A arginina aumenta significativamente no lúmen uterino durante o período de peri-implantação (WU, 2013a; WU et al., 2014).

O estabelecimento da gestação envolve o desenvolvimento do concepto (embrião e membranas extra-embrionárias), os processos fisiológicos em que o concepto sinaliza sua presença para o sistema materno e a implantação. A primeira nutrição, disponível para o concepto em desenvolvimento, é a nutrição histotrófica do endométrio que parece ser essencial para sobrevivência e crescimento deste durante a gestação de animais domésticos (SPENCER et al., 2004).

Em ovinos, os embriões entram no útero no dia três, e se desenvolvem para blastocistos esféricos. Em seguida se transformam em tubulares e filamentosos entre os dias 12 e 16 (BAZER et al., 2012b,c). Essas modificações na morfologia do concepto são dependentes da composição do histotrofo, que inclui secreções do epitélio uterino luminal (EL), glandular superficial (EGs) e glandular (EG), assim como transporte seletivo de nutrientes dentro do lúmen uterino, incluindo enzimas, fatores de crescimento, proteínas de adesão, citocinas, hormônios, proteínas de transporte, aminoácidos e glicose (WU et al., 2004).

Dentre as funções da arginina, podemos citar a síntese de proteínas, a atividade precursora para síntese de moléculas como o óxido nítrico (NO), ornitina, poliaminas (putrescina, espermidina e espermina), creatina, agmatina (WU; MORRIS, 1998). O papel das poliaminas na gestação pode estar relacionado à regulação da síntese de hormônios esteroides, bem como ao crescimento e desenvolvimento embrionário, placentário e fetal (BASTIDA et al., 2002).

Na via clássica, o metabolismo da arginina é iniciado pela arginase (ARG1) para produzir ornitina que é, subsequentemente, convertida em poliaminas pela ornitina descarboxilase (ODC1) (MORRIS, 2009). Na via alternativa, nas mitocôndrias placentárias, a arginina pode ser descarboxilada para formar agmatina, pela arginina

descarboxilase (ADC), e a agmatina é convertida para putrescina pela agmatinase (AGMAT) (WU et al., 2013b).

Ambas vias foram estudadas por Wang et al. (2014a) aos 16 dias de gestação em estudos de “knockdown” de genes *in vivo*. Os autores relataram que o bloqueio da tradução do mRNA ODC1, que é enzima chave para biossíntese clássica de putrescina, resulta em conceptos com morfologia diferentes com base na capacidade de ativar a via alternativa ADC/AGMAT para síntese de poliaminas.

Até o presente momento, a via metabólica alternativa da arginina (ADC/AGMAT) foi investigada por Wang et al. (2014ab), em ovinos, quando foi realizado o bloqueio da tradução de mRNA ODC1 e também em amostras fisiológicas do endométrio uterino. Porém, as vias da arginina para a produção de poliaminas, ainda não foram estudadas em conceptos e placentomas fisiologicamente normais. Placentomas são locais de comunicação entre o feto e sistema materno durante todo o período gestacional, envolvendo a troca de moléculas importantes para a manutenção da gestação, incluindo aminoácidos.

Informações sobre a síntese de poliaminas são cruciais para a compreensão da regulação molecular do crescimento placentário e fetal, além da elucidação dos mecanismos responsáveis pelo retardo do crescimento intra-uterino e origem fetal de doenças iniciais em adultos (KWON et al., 2003a). A investigação dessa via alternativa (ADC/AGMAT) no modelo experimental ovino possibilitará uma base científica sólida para o uso de arginina como suplemento para mulheres grávidas, a fim de melhorar a sobrevivência e o desenvolvimento embrionário e fetal (WU et al., 2013b) já que perdas gestacionais ocorrem em cerca de 25% das gestações de mulheres (HUTTI, ARMSTRONG, MYERS, 2013).

Essas informações também podem contribuir zootecnicamente em sistemas produtivos de animais domésticos a fim de aumentar as taxas de nascimentos, nascimento de progênes mais saudáveis e conseqüentemente melhor desempenho produtivo e reprodutivo, pois essas informações podem fornecer alternativas para diminuir a reabsorção embrionária e perdas gestacionais, que ocorrem em até 30% até os 30 dias de gestação em ovinos (O’CONNELL et al., 2016) e ocorrem de 35 a 40% no início do desenvolvimento embrionário em bovinos (WHITLOCK, MAXWELL, 2008).

Futuros estudos poderão focar no papel fisiológico da agmatina nas funções reprodutivas e no desenvolvimento do conceito, bem como o mecanismo subjacente para indução da via ADC/AGMAT para aumentar a abundância de agmatina e poliaminas vitais para a sobrevivência, crescimento e desenvolvimento de conceitos mamíferos (WANG et al., 2014a).

Nesse contexto, estudos são necessários para avaliar a expressão de genes e a identificação de proteínas das vias metabólicas (clássica e alternativa) da arginina, em conceitos, endométrio uterino e placentomas durante a gestação em ovelhas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Desenvolvimento peri-implantacional de conceitos ovinos

Embriões ovinos entram no útero no terceiro dia após a fecundação e se desenvolvem até blastocistos esféricos (dia 10, 0,4 mm). Transformam-se então em conceitos tubulares e filamentosos entre os dias 12 (1 mm X 33 mm), 14 (1mm x 68 mm) e 15 (1 mm X 150-190 mm) de gestação (Figura 1), com membranas extra-embrionárias se estendendo dentro do corno uterino contralateral (Figura 2) entre os dias 16 a 20 de gestação (BAZER et al., 2012b).

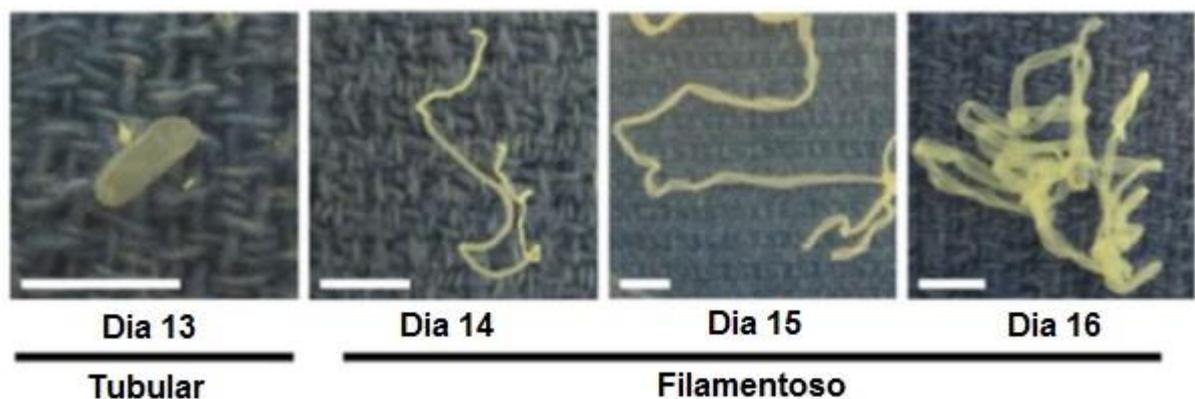


Figura 1. Conceitos ovinos passam por transição morfológica de tubulares (dia 13) a alongados e filamentosos entres os dias 14 a 16 de prenhez, régua=0,5 cm (Fonte: Adaptado de Wang et al., 2014a).

Após o dia 16, o conceito alongado, começa o processo de implantação e placentação. O alongamento do conceito envolve aumento exponencial em

comprimento e peso do trofotoderma (Figura 2) e o início da diferenciação da membrana extra-embriônica, incluindo gastrulação do embrião e formação do saco vitelino e alantoide, que são vitais para sobrevivência embrionária e formação de uma placenta funcional (FILANT; SPENCER, 2014).



Figura 2. Eventos durante o início da gestação em ovinos. O esquema sumariza as mudanças ocorridas no desenvolvimento de embriões/blastocistos após a fertilização em relação à posição no trato reprodutivo feminino. A fertilização ocorre no oviduto, e no estágio de mórula, os embriões entram no útero nos dias 4-5. Blastocistos se formam no dia 6, eclodem a zona pelúcida no dia 8, e se transformam de esféricos para forma tubular no dia 11. Entre os dias 12 a 16 iniciam o alongamento, com o início da implantação envolvendo a aposição e ligação (dias 12-15) e firme adesão até o dia 16. No dia 17, o conceito filamentosso ocupa todo o corno uterino ipsilateral e também se alonga pelo corno uterino contralateral (Fonte: Adaptado de Spencer et. al, 2007).

O alongamento do conceito ovino é um pré-requisito para a implantação, que envolve a aposição e adesão entre o trofotoderma, epitélio uterino luminal e epitélio glandular superficial. Durante esse processo, ocorre perda transitória do epitélio luminal, a fim de permitir contato íntimo entre o trofotoderma e a lâmina basal uterina adjacente às células do estroma uterino. Isso ocorre até cerca do dia 25 de gestação, quando o epitélio uterino começa a se recompor e a placentação continua até os 75 dias de gestação. Todos os mamíferos possuem glândulas uterinas que produzem ou transportam para dentro do útero, seletivamente, um complexo conjunto de proteínas

e outras moléculas, que é conhecido como histotrofo (BAZER et al., 2012b).

O histotrofo inclui secreções do epitélio luminal, glandular e glandular superficial, assim como o transporte seletivo de nutrientes dentro do lúmen uterino, incluindo enzimas, fatores de crescimento, proteínas de adesão, citocinas, hormônios, proteínas de transporte, aminoácidos e glicose (WANG et al., 2014a). A morfogênese das glândulas uterinas, durante a gestação, permite que o endométrio aumente as proteínas secretoras que são transportadas para o feto para áreas especializadas da placenta, denominadas aréolas, as quais fornecem nutrição histotrófica para o feto durante a gestação (BURTON et al., 2011).

O desenvolvimento de aréolas funcionais permite o transporte de secreções das glândulas uterinas através da placenta para liberação na circulação fetal. As secreções das glândulas uterinas contém uma série de proteínas e enzimas, moléculas reguladoras, fatores de crescimento, citocinas, linfocinas e nutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento do feto (BAZER et al., 2012b).

A placentação sinepiteliocorial em ovinos envolve o desenvolvimento e a fusão de cotilédones placentários com carúnculas endometriais para formar placentomas. A placenta de ovelhas tem por volta de 70 carúnculas funcionais, que são locais de intercâmbio de micronutrientes, aminoácidos, glicose e gases, entre o sistema vascular do concepto e da mãe. Embora o número de placentomas funcionais seja variável entre as ovelhas, se o animal tiver um número considerável de placentomas, sempre haverá crescimento compensatório daqueles presentes. Assim, o peso do feto não é necessariamente afetado (BAZER et al., 2012b).

O comprimento da placenta é influenciado pela extensão que o trofocotoderma atinge entre os dias 12 e 25 de gestação. Ocorre também o aumento da vasodilatação dos vasos sanguíneos e o crescimento de novos vasos (angiogênese) em placentomas, a fim de aumentar o crescimento fetal com o decorrer da gestação (BAZER et al., 2012b). Para apoiar o aumento do fluxo sanguíneo uterino e placentário, a angiogênese placentária aumenta acentuadamente do primeiro para o segundo e terceiro trimestres de gestação (até 147 dias) e continua a aumentar nos últimos dias. A absorção de nutrientes pelo útero ou pelo feto é determinada pela taxa de fluxo sanguíneo e pelas concentrações de nutrientes no sangue arterial e venoso (REYNOLDS et al., 2006).

2.2. Vias metabólicas da arginina para produção de poliaminas

A arginina é considerada um aminoácido nutricionalmente essencial, ou seja, apesar de ser sintetizada em quantidades adequadas pelo organismo, deve ser fornecida na dieta para satisfazer necessidades ótimas em condições nas quais as taxas de utilização são superiores às taxas de síntese (WU et al., 2014). Também é considerada um aminoácido funcional, pois é aminoácido chave para regular vias metabólicas que são necessárias para manutenção, crescimento, reprodução e imunidade dos seres vivos (WU, 2009).

Existem múltiplas vias nas células para a utilização da arginina, a qual é precursora na síntese de muitas moléculas biológicas, incluindo ornitina, poliaminas (putrescina, espermina e espermidina), prolina, glutamina, creatinina, agmatina, óxido nítrico e proteínas (WU; MORRIS, 1998). O óxido nítrico e as poliaminas estimulam a proliferação e migração celular, remodelação celular, angiogênese e dilatação do vasos sanguíneos para aumentar o fluxo sanguíneo (WU, 2009). Estudos realizados em roedores, suínos e ovinos sugerem que alguns aminoácidos tais como arginina, glutamina, leucina e prolina podem apresentar um papel importante no desenvolvimento embrionário, placentário e fetal, durante a gestação (MARTIN et al. 2003; WU et. al. 2004).

O transporte de arginina é o primeiro passo para sua utilização pelas células, uma vez que este nutriente pode ser absorvido por difusão simples numa quantidade significativa de fluido extracelular. Contudo, transportadores específicos são necessários para o transporte de arginina através da membrana celular (MORRIS, 2009). A via clássica da arginina (Figura. 4), para produção de poliaminas, é iniciada pela arginase para produzir ornitina (MORRIS, 2009). Existem dois tipos de isoenzimas arginase em mamíferos, a arginase tipo 1 é uma enzima citosólica expressa, principalmente, no fígado, e a arginase tipo 2 é expressa em mitocôndrias de tecidos extra hepáticos incluindo rim, cérebro, intestino delgado, glândula mamária e macrófagos, bem como placentas humanas e ovinas (WU et al., 2009). A ornitina descarboxilase (ODC1), enzima considerada limitadora de velocidade na biossíntese de poliaminas, catalisa a descarboxilação de ornitina para produzir putrescina que,

posteriormente, combinada com descarboxilado S-adenosilmetionina é transformada nas poliaminas espermidina, pela espermidina sintetase, e espermina pela espermina sintase (WALLACE, 1987, citado por LEFRÈVE; PALIN; MURPHY, 2011).

Na via alternativa (Figura. 3) de metabolismo da arginina, ocorre a síntese da agmatina. Em ratos, a arginina descarboxilase (ADC) descarboxila a arginina para produzir agmatina de forma específica na célula e a degradação da agmatina pela agmatinase (enzima mitocondrial) produz putrescina (WU, 2009). A enzima ADC tem 48% de homologia de sequência de aminoácidos com ODC1, também estando presente no fígado, rim, glândula adrenal e macrófagos (MORRIS 2009). De acordo com Wu et al. (2013b), a expressão do gene ADC em células de mamíferos foi confirmada por clonagem e caracterização de ADC humano (ZHU et al., 2004), porém a sua expressão em conceitos de animais zootécnicos, até então, era desconhecida.

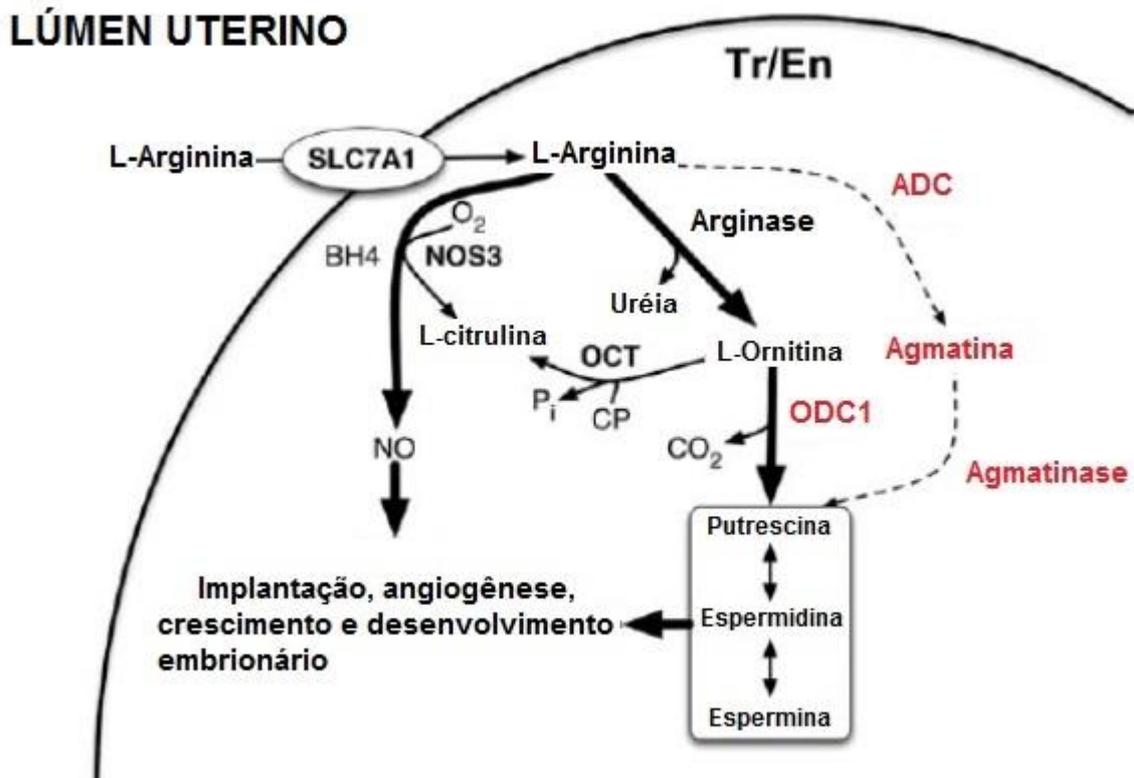


Figura 3. Via esquemática pela qual ADC e AGMAT participam da biossíntese compensatória *de novo* de poliaminas para suportar o crescimento e desenvolvimento de conceitos. A Biossíntese *de novo* de poliaminas em conceitos é principalmente por meio da via metabólica clássica ODC1-dependente (arginina-ornitina-putrescina). No entanto, a via metabólica alternativa ADC/AGMAT-dependente também existe em conceitos ovinos. Na ausência da proteína ODC1, a expressão do ADC e AGMAT aumentam para promover quantidades adequadas de poliaminas para suportar o desenvolvimento do conceito. Porém, parece haver uma considerável variação no grau de ativação da via alternativa ADC/AGMAT pelos conceitos. Alterações na abundância de agmatina no lúmen uterino podem refletir em papéis funcionais múltiplos no útero gestante. Tr (trofotoderma), En (endoderma), OCT (ornitina carbamoiltransferase), CP (fosfato de carbamoilo), SLC7A1 (solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, Y+ system) member 1), BH4 (tetra-hidrobiopterina), NOS3 (óxido nítrico sintase 3), P_i (fosfato), CP (carbamoil fosfato), NO (óxido nítrico). (Fonte: Adaptado de Wang et al., 2014a).

Horyn et al. (2005), a fim de verificar se as mitocôndrias dos mamíferos metabolizam arginina em agmatina pela reação da ADC, utilizaram arginina marcada com ¹⁵N como um precursor, a fim de determinar o fluxo da reação da ADC em mitocôndrias obtidas de fígado de rato. Os resultados deste estudo evidenciam provas convincentes de que a ADC mitocondrial está presente no fígado de rato e sugerem que o cAMP pode regular o fluxo pela reação de ADC. Além disso, o estudo sugere

baixa afinidade de ADC para arginina, o que sugere um fluxo relativamente baixo mesmo quando a concentração de arginina é 15-20 vezes maior que o nível fisiológico (HORYN et al., 2005).

A expressão de ADC também foi analisada em regiões cerebrais de ratos. Foram estudadas regiões de atividade, níveis de proteína e mRNA e a regulação da expressão em células neuronais por RNA de interferência. ADC foi amplamente expressa na maioria das regiões do cérebro, com quantidade substancial no hipotálamo, seguido do córtex e com mínimas quantidades na medula e no *locus coeruleus*. Em suma, o estudo demonstrou expressão da ADC nas células neurais em cérebro de rato e atividade de “down-regulation” da ADC por siRNA (pequenos fragmentos de RNA) específicos, que acarreta em menor produção de agmatina (IYO et al., 2006).

Wang et al. (2014a) estudaram a hipótese de que a via ADC/AGMAT é ativada para compensar a deficiência na proteína ODC1 e garantir a síntese de poliaminas para a sobrevivência embrionária e desenvolvimento, em modelo ovino. Os autores encontraram resultados em que o “knockdown” *in vivo* da tradução de *ODC1*, em conceito ovino, resultou em dois fenótipos distintos de conceito: fenótipo morfológica e funcionalmente normal e fenótipo morfológica e funcionalmente anormal. Foi observado aumento compensatório na abundância da proteína AGMAT em conceitos com fenótipo normal, e a falta de tal compensação em conceitos com fenótipo anormal. Especificamente, alguns conceitos mantiveram-se a termo pelo aumento compensatório da síntese *de novo* de poliamina pelo metabolismo da arginina em agmatina e putrescina após perda de função de ODC1 devido ao “knockdown”. Além disso, os autores notificaram pela primeira vez o metabolismo da arginina para agmatina pela via ADC/AGMAT no endométrio durante o período da gestação correspondente a peri-implantação do conceito em ovinos.

Níveis fisiológicos de arginina extracelular são essenciais para sobrevivência, crescimento e desenvolvimento de conceitos. O “knockdown” *in vivo* de SLC7A1 (solute carrier family 7, cationic amino acid transporter, Y+ system, member 1), o transportador de arginina em conceitos, resultou em conceitos com desenvolvimento retardado, morfológica e funcionalmente, devido à deficiência de arginina (WANG et al., 2014b).

Nas regiões intercotiledonárias da placenta e no endométrio intercaruncular de ovinos, Kwon et al. (2003b) indicaram coordenação metabólica entre diversas vias integradas para suportar altas taxas de síntese de poliaminas durante a gestação. Estudos são necessários a fim de se avançar na compreensão das mudanças biológicas na água, eletrólitos, transporte de açúcares, proteínas e esteroides sexuais, além da formação e crescimento de placentomas, durante a gestação de ovelhas, já que esses processos fisiológicos sustentam o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência do conceito e asseguram resultados bem-sucedidos da gestação (BAZER et al., 2015).

Nesse contexto, o presente estudo tem a seguinte hipótese: Durante o período de peri-implantação na gestação de ovelhas, ocorre a expressão de genes das vias clássica e alternativa da arginina para produção de poliaminas em conceitos, sendo as proteínas destas vias identificadas em conceitos, endométrio uterino e placentomas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a expressão de genes e a identificação de proteínas das vias clássica e alternativa (da arginina para a produção de poliaminas) em conceitos e endométrio uterino durante o período de peri-implantação, e em placentomas na fase pós-implantacional da gestação de ovelhas.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar:

- a) a expressão dos genes *ARG1*, *ODC1*, *ADC* e *AGMAT* em conceitos durante o período de peri-implantação (13 aos 16 dias) em ovelhas;
- b) a localização das proteínas das vias da arginina em conceitos e no endométrio uterino durante o período de peri-implantação (13 aos 16 dias) em ovelhas;

c) a localização das proteínas das vias da arginina em placentomas no período pós-implantacional (40 aos 140 dias) e ovelhas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local e Animais

O presente estudo foi realizado na Texas A&M University”, College Station, Texas, Estados Unidos. As análises laboratoriais foram realizados no “Laboratory of Physiology of Reproduction” do “Departament of Animal Science - Kleberg Animal & Food Science Center” e os animais utilizados nesse estudo estavam alojados no Physiology Field Laboratory”

Ovelhas (n=72) da raça Rambouillet (*Ovis aries*) com idade entre 4 a 6 anos foram avaliadas e, somente ovelhas consideradas híginas após avaliações clínicas, foram selecionadas para compor o experimento. Todas as ovelhas receberam alimentação *ad libitum* durante todo o período experimental. Ademais, foram escolhidas fêmeas que apresentaram, no mínimo, dois ciclos estrais de duração normal (16-18 dias), confirmando assim a ciclicidade das fêmeas. Todos os procedimentos experimentais e cirúrgicos foram conduzidos de acordo com o “Guide for the Care and Use of Agriculture Animals in Research and Teaching”, e aprovado pelo “Institutional Animal Care and Use Committee” da “Texas A&M University”. Os procedimentos cirúrgicos deste estudo foram realizados no “O. D. Butler, Jr. Animal Science Complex” da “Texas A&M University”.

As ovelhas foram submetidas a protocolo de sincronização de estro. No primeiro dia do protocolo, foi inserido um dispositivo intravaginal de liberação controlada de progesterona (Eazi-Breed CIDR Sheep Insert, Zoetis, Parsippany, Nova Jersey, EUA). Após 12 dias, o dispositivo foi retirado e foi realizada a aplicação, via intramuscular, de 20 mg de dinoprost trometamina (Lutalyse®, Zoetis, Parsippany, Nova Jersey, EUA).

Após 48 horas da remoção dos dispositivos, as ovelhas foram observadas durante 4 horas, na presença de machos vasectomizados, a fim de detectar o estro. As ovelhas detectadas em estro foram encaminhadas para baias individuais e acasaladas, por monta natural controlada, por três reprodutores diferentes da raça

Suffolk. Os reprodutores tiveram a fertilidade comprovada previamente por espermograma (motilidade, vigor, morfologia e concentração espermática).

4.2 Experimento 1: Avaliação da expressão dos genes *ARG1*, *ODC1*, *ADC* e *AGMAT* em conceptos durante o período de peri-implantação

O experimento 1 foi composto de quatro grupos experimentais, de acordo com o dia de gestação (13, 14, 15 e 16). Em cada dia de gestação, ovelhas (n = 5 por grupo) foram hysterectomizadas e os dois cornos uterinos foram lavados com 20 mL de PBS (tampão fosfato-salino) estéril e pH 7,2, como descrito previamente por Spencer et al. (1999). A gestação foi confirmada com a detecção da presença de um concepto morfolologicamente normal e de um corpo lúteo funcional, e todas as ovelhas tiveram gestação única. Os conceptos encontrados foram seccionados, utilizando lâminas, em porções iguais e transferidos para microtubos, congelados em nitrogênio a -196°C, e armazenados a -80°C.

4.3 Experimento 2: Avaliação da localização das proteínas *ARG1*, *ODC1*, *ADC* e *AGMAT* em conceptos e endométrio durante o período a peri-implantação

O experimento 2 também foi composto de quatro grupos experimentais, um grupo para cada dia de gestação (13, 14, 15 e 16). Em cada dia de gestação, as ovelhas (n = 4 por grupo) foram hysterectomizadas e os dois cornos uterinos foram lavados com 20 mL de PBS estéril e pH 7,2, assim como descrito previamente por Spencer et al. (1999). A gestação foi confirmada com a presença de um concepto morfolologicamente normal e de um corpo lúteo funcional, e todas as ovelhas tiveram gestação única. Secções de conceptos (~0,5 cm) e secções da porção média do corno uterino ipsilateral ao CL (~0,5 cm) foram feitas sem auxílio de estereomicroscópio, utilizando lâminas, e os fragmentos fixados em paraformaldeído 4% em PBS (peso/volume) por 24 h e, posteriormente, em etanol 70% por 24 h. Os tecidos fixados foram desidratados por uma série graduada de álcoois, clarificados em Citrosolv e incluídos em Paraplast-Plus (Oxford Labware, St. Louis, Missouri, EUA).

As amostras de conceptos foram coletadas em animais diferentes dos utilizados para a coleta de amostras no endométrio. Não foi possível coletar conceptos aos 13 dias de gestação.

4.4 Experimento 3: Avaliação da expressão e da localização das proteínas ARG1, ODC1, ADC e AGMAT em placentomas no período pós-implantacional.

O experimento 3 foi composto por seis grupos experimentais de acordo com os dias de gestação. Vinte e quatro ovelhas (n = 4 por grupo) foram histerectomizadas nos dias 40, 60, 80, 100, 120 ou 140 de gestação. Todas as ovelhas tiveram gestação única. Várias secções (com dimensões entre 1,0 - 1,5 cm) de placentomas removidos do corno uterino gestante foram feitas sem auxílio de estereomicroscópio, utilizando lâminas, fixadas em paraformaldeído 4% em PBS por 24 h, desidratados por uma série graduada de álcoois, clarificados em Citrosolv e então foram incluídos em Paraplast Plus (Oxford Labware, St. Louis, Missouri, EUA).

4.5 Análise de Expressão Gênica por PCR quantitativo em Tempo Real

4.5.1 Extração de RNA total

A extração de RNA total dos fragmentos de conceptos ovinos colhidos nos dias 13, 14, 15 e 16 de gestação foi realizada utilizando “RNeasy Mini Kit” (Qiagen, Cat.no. 74104, Valencia, Califórnia, EUA), seguindo as recomendações do fabricante, como descrito abaixo.

As amostras foram retiradas da temperatura de -80°C, mantidas em gelo, e posteriormente foram pesadas a fim de definir o volume da solução a ser utilizada para homogeneização das amostras. O peso das amostras variou de 10 a 25 mg. Seguindo as recomendações do protocolo, em cada tubo de amostra foi adicionado 600 µL do tampão RLT Plus acrescido de 1% de β-mercaptoetanol (2-Mercaptoethanol M6250, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), previamente preparado (5 mL de tampão RLT Plus e 50 µl de β-mercaptoetanol).

Todo o conteúdo do tubo foi transferido para microtubos de 2 mL e as amostras foram homogeneizadas por 40 segundos a 12 rpm utilizando um homogeneizador. Em seguida, foi realizada a centrifugação por 3 min a 9000 g. O sobrenadante foi transferido para microtubo e contendo 600 µL de etanol 70%. Após homogeneização por pipetagens sucessivas, foram transferidos no máximo 700 µL do homogeneizado para cada coluna “RNeasy spin column”, acoplada a microtubo de 2 mL, ambos fornecidos no kit. As colunas foram centrifugadas por 15 segundos a 8000 g e o líquido resultante foi descartado.

Posteriormente à obtenção do RNA, foi realizado o tratamento com DNase utilizando “RNase-Free DNase” (Qiagen, Cat.no.79254, Valencia, Califórnia, EUA). Para tanto, a coluna foi lavada com adição de 350 µL do tampão RWI e centrifugada por 15 segundos a 8000 g. Foram adicionados na membrada da coluna o “mix” previamente preparado contendo 10 µL de DNase I (15000 “Kunitz units”, previamente diluída) e 70 µL do tampão RDD, ambos fornecidos pelo kit. As amostras foram incubadas por 15 min a temperatura ambiente.

Após incubação, foram adicionados 350 µL do tampão RW1 e centrifugou-se, novamente, por 15 segundos a 8000 g. As colunas foram lavadas por duas vezes com 500 µL do tampão RPE por centrifugação a 8000 g por 15 segundos e 2 min, respectivamente. As colunas foram colocadas sob novos microtubos de 1,5 mL, foram adicionados 50 µL de água livre de RNase e foi feita a centrifugação por 1 min a 8000 g a fim de eluir o RNA. A concentração de RNA total extraído foi determinada usando “NanoDrop 1000 Spectrophotometer” (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EUA) utilizando-se 1 µL de cada amostra. A qualidade do RNA foi medida utilizando o “Agilent 2100 Bioanalyzer” (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA) para avaliar a integridade do RNA. As amostras de RNA total extraídas foram armazenadas a -80°C.

4.5.2. Síntese de cDNA

O cDNA foi obtido utilizando “SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR” (Cat no.11904-018, Invitrogen, Carls, Califórnia, EUA). Foi feita uma reação com 2 µg do RNA extraído, um “mix” contendo 1 µL de “10mM dNTP mix, 1 µL de

“oligo (dT) Primers” e água livre de RNase, para completar o volume final de 10 µL. A quantidade de água variou de acordo com a amostra, visto que cada amostra tinha uma concentração diferente de RNA. Os tubos foram aquecidos a 65°C por 5 min, em seguida foram inseridos no gelo. Adicionou-se o segundo “mix”, contendo 2 µL de “10X RT Buffer”, 4 µL de 25mM MgCl₂, 2 µL de 0,1 M DTT e 1 µL de “RNaseOUT™”. Os tubos foram incubados a 42°C por 2 min e, em seguida, 1 µL de “SuperScript II RT” foi adicionado em cada tubo, que posteriormente foram incubados por 50 min a 42°C. A reação foi terminada com a incubação das amostras por 15 min a 70°C. Os tubos foram colocados no gelo e, após a adição de 1 µL de RNase H, as amostras foram incubadas por 20 min a 37°C. O cDNA produzido foi armazenado a -20°C.

4.5.3. Teste dos “primers”

A eficiência e especificidade de todos os “primers” foram determinadas por reação de PCR com a adição de um passo na curva de dissociação, a fim de gerar uma curva padrão. Para tanto, foram feitas diluições do cDNA em concentrações decrescentes (12,5 ng; 6,25 ng; 3,125 ng; 1,5625 ng; 0,7812 ng; 0,391 ng), assim cada diluição é um ponto da curva.

As reações de amplificação foram realizadas em triplicatas com volume final de 10 µL, contendo 1 µL de cDNA, 3 µL de água livre de RNase, 0,5 µL (1pmol) de cada “primer” e 5 µL de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), usando o ABI prism 7900HT system (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). As amostras foram analisadas em triplicata usando as seguintes condições: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min, como descrito por Wang et al.(2014a). Foi gerada uma curva de dissociação para determinar a amplificação de um único produto. A linha “threshold” foi ajustada na região linear dos “plots” acima do “baseline noise”. Os valores de C_q (ciclos de quantificação) foram determinados com o número de ciclos em que a linha “threshold” cruzou a curva de amplificação.

A eficiência dos “primers” foi estimada considerando os valores obtidos para a inclinação da curva padrão (“slope”), uma vez que o coeficiente angular da curva padrão de -3,32 indica que a reação de PCR tem eficiência de 100%. Apenas os

“primers” amplificando um único produto, e com “slope” entre 3,2 a 3,4 foram considerados eficientes para uso na qPCR.

Ainda para a estimativa da eficiência dos “primers” também foram considerados os valores obtidos do coeficiente de correlação (r^2) que deve ser de, no mínimo, 0,97, o que garante menor variação entre as repetições (triplicatas).

4.5.4. Reações de PCR em tempo real

A expressão de mRNA dos genes *ARG1*, *ODC1*, *ADC* e *AGMAT* em conceptos ovinos foram determinados pela Reação em Cadeia de Polimerase Quantitativa em Tempo Real. A sequência dos “primers” e o número de acesso ao “GeneBank”, de todos os “primers”, estão na Tabela 1.

Tabela 1. Nomes, símbolos e sequências “forward” e “reverse” dos “primers” que foram utilizados na qPCR, para avaliação da expressão de genes das vias da arginina para produção de poliaminas em conceptos ovinos no período de peri-implantação.

Gene	Símbolo do Gene	Sequência Referência	Sequência do “Primer” (5’-3’)	Referência
Actin beta	<i>ACTB</i>	NM_001009784.1	F: CTGTCCCTGTACGCCTCT R: GTGGTGGTGAAGCTGTAG	“PrimerQuest”
Antizyme inhibitor 2	<i>ADC</i>	XM_015092740.1	F: TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT R: AGTGGTAACCCATCACTTCTAAC	“PrimerQuest”
Agmatinase	<i>AGMAT</i>	XM_004013796.3	F: AGACTGCTGGCTGAAGCTAC R: GTAAGCAGGGTCCAAGCCAT	LENIS et al. (2016)
Arginase 1	<i>ARG1</i>	XM_012182909	F: ACCTGTCCTTTGCCGATAAC R: CCTCCAGTCTTCTTGACTTCC	“PrimerQuest”
Ornithine decarboxylase 1	<i>ODC1</i>	XM_015094220.1	F: GCACATCCAAAGGCCAAGTT R: GGCGACAGACTGCTTTGGAA	LENIS et al. (2016)

As reações de amplificação foram realizadas como descrito anteriormente no item teste dos “primers”. A abundância de mRNAs *ARG1*, *ODC1*, *ADC* e *AGMAT* foram calculadas usando o método comparativo do Ct.

O gene beta actina (*ACTB*) foi utilizado como gene referência, após a realização de teste a fim de definir um gene referência ideal. O outro gene testado foi

o *GAPDH*. Para tanto, foi realizada uma reação, assim como a descrita anteriormente, utilizando todas as amostras do estudo, para os dois genes candidatos a referência. Posteriormente foi avaliado qual gene apresentou expressão similar ao longo dos dias de gestação. Ou seja, o gene referência ideal é aquele que não muda a sua expressão independente do tratamento, no caso, dias de gestação. No presente estudo o gene ideal foi o *ACTB* (beta actina).

4.6 Análise Imunohistoquímica (IHQ)

A localização imunohistoquímica das proteínas ARG1, ODC1, ADC e AGMAT em conceptos, útero e placentomas de ovinos, foi realizada como descrito previamente por Spencer et al. (1999). Foi utilizado o Kit “Vectastain ABC kit” (catalogo no. PK-6101 para IgG de coelho, Vector Laboratories Inc., Burlingame, Califórnia, EUA) que consiste na técnica de Avidina-Biotina-Peroxidase, técnica de imunohistoquímica indireta.

Para a preparação das lâminas, os blocos de parafina foram colocados em placas de gelo por 30 min. Em seguida, secções de tecidos foram cortados (10 µm) com micrótomo e colocadas em lâminas microscópicas Superfrost/Plus (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Duas secções de tecidos foram colocados em cada lâmina, assim cada lâmina conteve uma secção para controle negativo. As lâminas foram incubadas por doze horas a 37°C e em seguida armazenadas a 4°C. Foram utilizados secções de 4 animais diferentes para cada grupo experimental (dia da gestação).

As secções foram desparafinadas com três banhos de duração de 3 min em CitriSolv Fisherbrand, em seguida foram reidratadas com série alcóolica decrescente (100%, 95% e 70%) com 2 banhos de 1 minuto em cada passo. Para a recuperação antigênica, as lâminas foram imersas na solução tampão de citrato de sódio (0,01M e pH 6,0) e ácido cítrico (0,1M) em fervura por 10 min e após o resfriamento de 20 min em temperatura ambiente, foram lavadas em 1X PBS por 5 min.

Para a inibição da atividade da peroxidase endógena, as lâminas foram imersas em solução de metanol e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30% durante 15 min em temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram lavadas por 3 vezes com água destilada deionizada e lavadas por duas vezes em 1X PBS por 5 min.

Foi removido o excesso de líquido das lâminas e foram feitos círculos em volta dos tecidos utilizando a caneta Liquid Blocker Super PAP Pen (Technical Data Sheet, EMS, Hatfield, Pensilvânia, EUA). A fim de bloquear as possíveis ligações inespecíficas (“*background*”) do anticorpo primário, as secções foram incubadas com soro normal de cabra fornecido pelo kit “Vectastain ABC” (catalog no. PK-6101 para IgG de coelho, Vector Laboratories Inc., Burlingame, Califórnia, EUA). Essa solução foi preparada adicionando-se 3 gotas do soro normal de cabra, em 10 mL de 1X PBS. Foram adicionadas de 3 a 4 gotas dessa solução em cada secção de tecido, as lâminas foram incubadas por 5 min em temperatura ambiente e finalmente lavadas por 5 min em 1X PBS.

Uma das secções de cada lâmina foi tratada com 60 µL do anticorpo primário (Tabela 2) previamente diluído em solução PBS-BSA (1XPBS, 1% BSA) e a outra secção designada para controle negativo, foi tratada com 60 µL de IgG não específica de coelho na mesma concentração do anticorpo primário, também diluída em solução PBS-BSA. As lâminas foram incubadas “overnight” a 4°C em câmara úmida.

Tabela 2. Isotipo, diluição e fornecedores dos anticorpos utilizados nas análises imunohistoquímicas de conceptos, endométrio uterino e placentomas de ovelhas, coletados no período pós-implantacional.

Anticorpo	Isotipo	Diluição	Fornecedor
ADC	IgG policlonal Coelho	1:100	HPA028045; Sigma*
AGMAT	IgG policlonal Coelho	1:500	ab85172; Abcam**
ODC1	IgG policlonal Coelho	1:500	ab97395; Abcam**
ARG1	IgG policlonal Coelho	1:500	ab96183; Abcam**

ADC, arginine descarboxilase; AGMAT, agmatinase; ODC1, ornitina descarboxilase; ARG1, arginase; *Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA; **Abcam Cambridge, Massachusetts, EUA.

Após a incubação as lâminas foram lavadas duas vezes com 1XPBS por 5 min, e então foram adicionadas de três a quatro gotas da solução do anticorpo secundário biotilnado fornecido pelo kit "Vectastain ABC" (catalog no. PK-6101 para IgG de coelho, Vector Laboratories Inc., Burlingame, Califórnia, EUA). A solução do anticorpo secundário foi preparada adicionando-se três gotas do soro normal de cabra, uma gota de anticorpo secundário biotinilado anti IgG de coelho produzida em cabra e 10 mL de 1XPBS. As lâminas foram incubadas durante 60 min a 37°C em câmara úmida. Duas lavagens de 5 min com 1X PBS foram realizadas posteriormente.

A atividade da peroxidase foi visualizada utilizando-se o cromógeno DAB (3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloro, catalog no. D5637; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), pois na presença da enzima peroxidase, o DAB produz um precipitado marrom. A solução foi preparada com 100 mg DAB e 200 mL da solução 0,05 M Tris-HCl, e então foram adicionados 50 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30%. As lâminas foram imersas na solução imediatamente após o preparo e foram incubadas por 2 min em temperatura ambiente. Posteriormente, foi feita a avaliação no microscópio para avaliar a coloração e então as lâminas foram lavadas em água corrente a fim de interromper a reação. A contracoloração foi feita com hematoxilina, que foi filtrada anteriormente. As lâminas foram imersas em hematoxilina por 10 segundos e, em seguida, foram lavadas com água destilada deionizada por três vezes. Após avaliação em microscópio, quando necessário, foi realizado novamente o procedimento de contracoloração com hematoxilina.

As secções histológicas foram desidratadas em série alcóolica crescente de 70%, 95% e 100% por duas vezes em cada passo, clarificadas em Citrosolv, por fim, foram montadas com lamínulas utilizando-se resina sintética Permount (Cat no. UN1294e, Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). As lâminas foram armazenadas em caixas escuras em temperatura ambiente e fotografadas utilizando microscópio eletrônico Nikon, utilizando objetivas de aumento de 10X e 40X, com câmara aclopada e software NIS-Elements Viewer 4.20.

Para avaliar a intensidade da reação positiva, em cada tecido estudado, foram analisadas por um único observador quatro imagens de cada dia de gestação, e, considerando três campos, foram classificadas como ausente (1), fraca (2), moderada (3), forte (4) e muito forte (5) de acordo com a intensidade da coloração marrom,

assim como descrito por Fátima et al. (2013), com modificações. Foram realizadas as médias dos três campos, e também a média dos quatro animais para cada dia de gestação.

4.7 Análise Estatística

Os dados de expressão gênica foram analisados utilizando o procedimento GLM do SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, versão 8.1). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, incluindo o efeito de dias ($gl=3$) e o efeito aleatório do erro residual ($gl = 17; N(0, \sigma_e^2)$). As médias foram comparadas utilizando o método dos quadrados mínimos de Fisher, e o nível de significância considerado foi $< 0,05$.

Diferenças nas médias de intensidade da imunocoloração foram avaliadas com o software R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Áustria, versão 3.2.3) utilizando o delineamento inteiramente casualizado com os efeitos de proteína e dias, considerando o animal como efeito aleatório. Após as análises de homocedasticidade de variância Bartlett e normalidade Shapiro Wilk, foi realizada a análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey, e o nível de significância considerado foi $<0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Experimento 1: Avaliação da expressão dos genes *ARG1*, *ODC1*, *ADC* e *AGMAT* em conceptos durante o período de peri-implantação.

Foram quantificadas a expressão de genes das duas vias metabólicas da arginina (*ARG1*, *ODC1*, *ADC* e *AGMAT*). Como resultados das reações de PCR em tempo real, foram obtidos os valores de Cq (ciclos de quantificação), que indicam o número de ciclos PCR no qual foi detectado o aumento da fluorescência acima do sinal considerado como base, sendo assim, quanto menor o valor de Cq, maior é a expressão do gene (Tabela 3).

Tabela 3. Ciclos de quantificação (Cq) dos genes *ARG1* (arginase), *ODC1* (ornitina descarboxilase), *ADC* (arginina descarboxilase) e *AGMAT* (agmatinase) em conceptos ovinos durante o período de peri-implantação da gestação.

Vias da Arginina	Gene	Dias de Gestação	Cq médio	Erro Padrão	Valor de P
Clássica	<i>ARG1</i>	13	25,97	0,18	0,1333
		14	27,11	0,18	
		15	28,18	0,20	
		16	27,37	0,20	
	<i>ODC1</i>	13	24,51 a	0,13	0,006*
		14	26,21 b	0,13	
		15	26,66 b	0,15	
		16	27,12 b	0,15	
Alternativa	<i>ADC</i>	13	25,40	0,30	0,6265
		14	26,12	0,30	
		15	26,92	0,34	
		16	26,28	0,34	
	<i>AGMAT</i>	13	26,57	0,21	0,2608
		14	27,77	0,21	
		15	28,85	0,23	
		16	27,88	0,23	

*significativo a 5% de significância

O presente estudo foi o primeiro relato na literatura sobre a expressão dos genes *ARG1*, *ODC1*, *ADC* e *AGMAT* em conceptos ovinos, fisiologicamente normais, no período de peri-implantação. Não houve diferença ($P > 0,05$), entre os dias do período de peri-implantação para a expressão dos genes *ARG1*, *ADC* e *AGMAT*.

Contudo, foi observada maior expressão do gene *ODC1* aos 13 dias de gestação em comparação ao período entre 14 a 16 dias.

O gene *ODC1* já foi investigado no endométrio de bovinos (RAMOS et al., 2014) ao utilizarem um modelo experimental baseado na modulação do crescimento folicular, porém não foram encontradas diferenças na expressão do gene *ODC1* entre os grupos estudados (folículos de tamanhos diferentes). Todavia, os autores observaram forte associação negativa ($R^2:0,73$, $P=0,004$) entre a abundância relativa de *ODC1* e os transcritos espermidina e espermina N1 acetiltransferase 1 (*SAT1*). A expressão do *ODC1* também foi estudada em ovinos por Wang et al. (2014a) que, ao bloquearem a tradução do mRNA *ODC1* aos 8 dias de gestação, obtiveram fenótipos de conceptos diferentes, sugerindo que, de acordo com a habilidade do concepto, pode ocorrer a ativação da via alternativa da arginina (*ADC/AGMAT*) para produção de poliaminas.

O gene *AGMAT* foi identificado em mamíferos, primeiramente em humanos, quando clonaram o gene *AGMAT* a partir de células do hepatocarcinoma (IYER et al., 2002). Lenis et al. (2016) observaram a expressão do gene *AGMAT* em ovinos, porém em células do trofotoderma cultivadas *in vitro* sob o efeito da arginina e agmatina, foi observado aumento da expressão do gene *AGMAT*, que pode aumentar a capacidade das células do trofotoderma a produzir poliaminas.

A expressão de *ADC* em conceptos foi relatada em humanos (ZHU et al., 2004). Em ratos, identificaram a expressão do *ADC* mitocondrial no fígado (HORYN et al., 2005) e no cérebro, com maiores níveis de expressão notados no hipotálamo, seguido do corpo estriado, córtex frontal e hipocampo (IYO et al., 2006).

5.2 Experimento 2: Avaliação da localização das proteínas ARG1, ODC1, ADC e AGMAT em conceptos e endométrio durante o período a peri-implantação.

No presente estudo, todas as proteínas estudadas foram identificadas no endométrio uterino (Figura 4) e nos conceptos (Figura 5) em todos os momentos investigados no período de peri-implantação, evidenciando a relevância de ambas vias da arginina para produção de poliaminas.

Ainda no epitélio luminal, todas as proteínas foram identificadas em menor intensidade aos 13 dias de gestação. Aos 14 e 15 dias, a identificação foi de intensidade intermediária, e, aos 16 dias, todas as proteínas foram identificadas em maior intensidade em relação ao dia 13. A intensidade de todas as proteínas no epitélio glandular não foi alterada ao longo dos dias estudados.

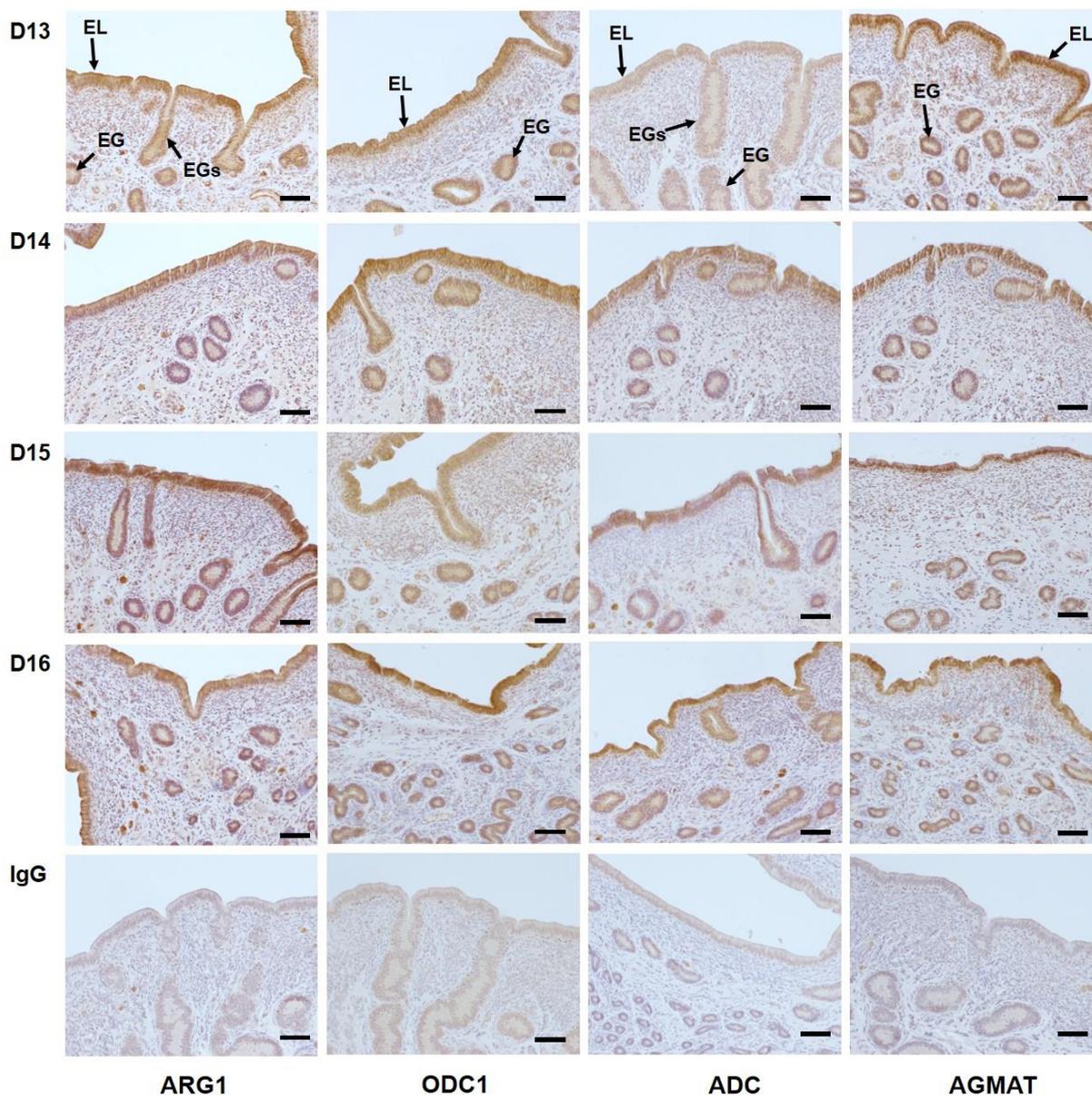


Figura 4. Secções do endométrio uterino de ovelhas aos 13, 14, 15 e 16 de gestação. ARG1, arginase; ODC1, ornitina descarboxilase; ADC, arginina descarboxilase; AGMAT, agmatinase; IgG, imunoglobulina; EL, epitélio luminal; EGs, epitélio glandular superficial; EG, epitélio glandular; barra de escala: 100μm, aumento 10X.

Tabela 4. Quantificação, de acordo com os escores, da imunomarcagem de ARG1, ODC1, ADC1 e AGMAT no epitélios luminal, glandular e luminal + glandular do endométrio de ovelhas durante o período de peri-implantação.

Epitélio	Dia	ARG1	ODC1	ADC	AGMAT	Média	Valor de P
Luminal	13	2,92 ± 0,42	3,58 ± 0,60	1,83 ± 0,17	2,5 ± 0,48	2,70 ± 0,26 ^b	0,038*
	14	3,25 ± 0,60	4,33 ± 0,24	3,33 ± 0,69	3,08 ± 0,21	3,50 ± 0,24 ^{ab}	
	15	3,42 ± 0,67	3,50 ± 0,40	2,42 ± 0,88	3,33 ± 0,36	3,16 ± 0,26 ^{ab}	
	16	4,50 ± 0,17	3,67 ± 0,41	3,41 ± 0,67	3,17 ± 0,32	3,68 ± 0,23 ^a	
Glandular	13	2,58 ± 0,39	4,08 ± 0,46	2,42 ± 0,42	2,50 ± 0,32	2,89 ± 0,25	0,64
	14	2,33 ± 0,14	4,50 ± 0,4	3,17 ± 0,57	2,83 ± 0,32	3,21 ± 0,27	
	15	2,92 ± 0,83	2,58 ± 0,48	3,67 ± 0,45	3,33 ± 0,33	3,12 ± 0,20	
	16	3,50 ± 0,10	3,00 ± 0,41	3,17 ± 0,57	3,17 ± 0,42	3,21 ± 0,19	
Lúmen + Glandular	13	2,75 ± 0,40	3,83 ± 0,53	2,13 ± 0,25	2,50 ± 0,39	2,8 ± 0,24	0,100
	14	2,79 ± 0,32	4,42 ± 0,22	3,25 ± 0,53	2,96 ± 0,11	3,35 ± 0,22	
	15	3,17 ± 0,37	3,58 ± 0,34	2,50 ± 0,67	3,33 ± 0,25	3,15 ± 0,22	
	16	4,00 ± 0,12	3,33 ± 0,29	3,29 ± 0,55	3,17 ± 0,36	3,45 ± 0,18	

Abreviações: ARG1, arginase; ODC1, ornitina descarboxilase; ADC, arginina descarboxilase; AGMAT, agmatinase; *significativo a 5% de significância; a,b médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem entre si.

Os resultados do presente estudo são semelhantes com o único relato encontrado na literatura (WANG et al., 2014a), quando identificaram as proteínas ADC e AGMAT em secções do endométrio uterinos de ovelhas prenhes ou ciclando aos 10, 12, 14 e 16 dias (de prenhez ou do ciclo estral). Ambos achados evidenciam a importância da via alternativa para produção de poliaminas durante o período de peri-implantação.

No presente estudo, a intensidade da identificação das proteínas no lúmen uterino aumentou após os 13 dias de gestação e foi significativamente maior aos 16 dias, (Tabela 4) sugerindo que essas proteínas são requeridas em maiores concentrações para o processo de alongamento do concepto e implantação.

Não foi observado diferença ($p=0,472$) entre os valores de intensidade de identificação no trofotoderma dos conceptos ao longo dos dias estudados (Tabela 5). Não foram encontrados na literatura, relatos sobre a identificação das proteínas ARG1, ODC1, ADC e AGMAT em conceptos fisiologicamente normais.

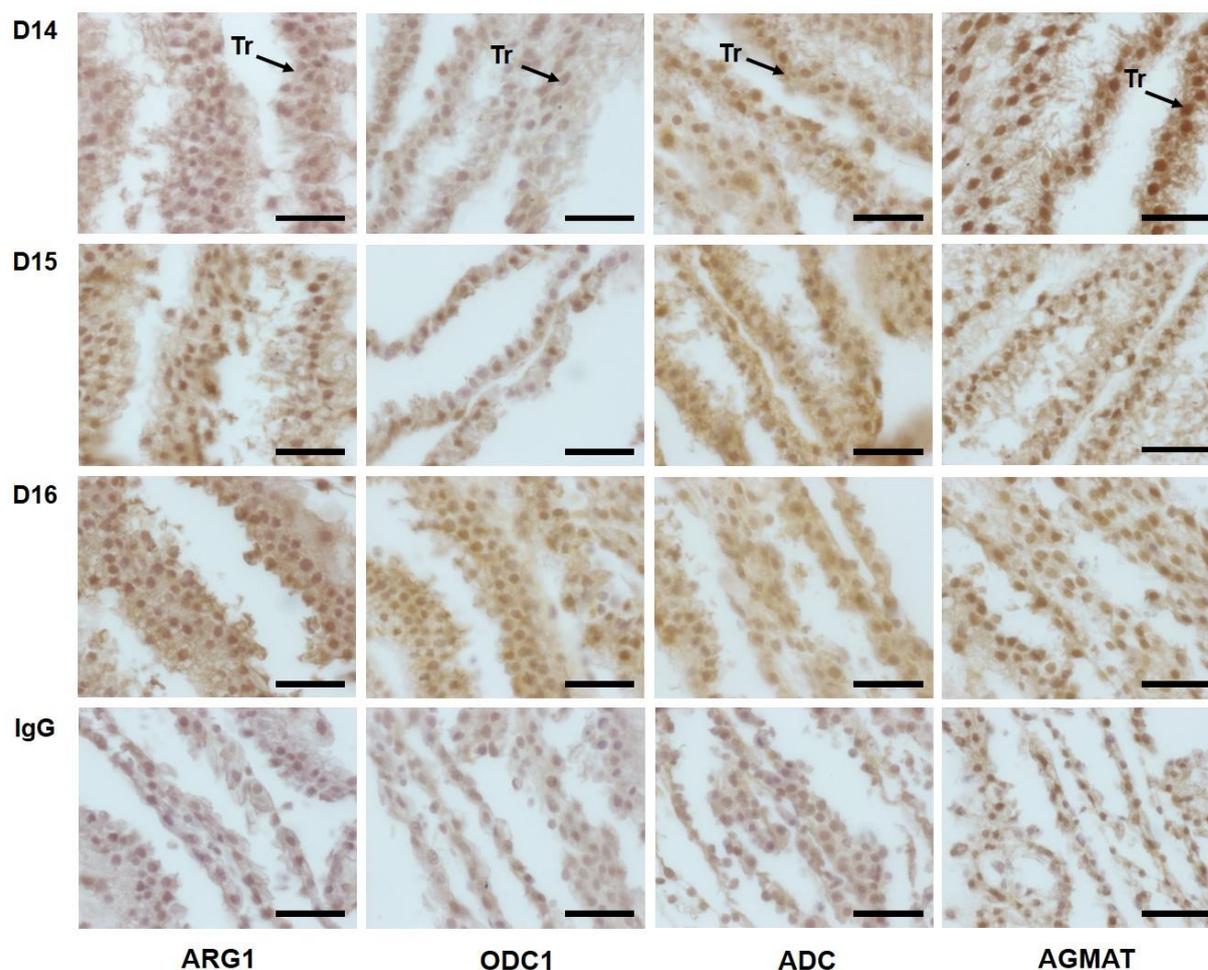


Figura 5. Secções dos conceitos ovinos aos 14, 15 e 16 dias de gestação. ARG1, arginase; ODC1, ornitina descarboxilase; ADC, arginina descarboxilase; AGMAT, agmatinase; IgG, imunoglobulina; Tr, trofoblasto, barra de escala: 50 μ m, aumento 40X.

Tabela 5. Quantificação, de acordo com os escores, da imunomarcagem de ARG1, ODC1, ADC1 e AGMAT em conceitos ovinos durante o período de peri-implantação.

Dia	ARG1	ODC1	ADC	AGMAT	Média	Valor de P
14	4,83 \pm 0,17	2,00 \pm 0,00	4,33 \pm 0,33	3,00 \pm 0,00	3,89 \pm 0,48	
15	4,44 \pm 0,55	3,44 \pm 0,77	3,67 \pm 1,02	3,67 \pm 0,33	3,82 \pm 0,35	0,472
16	4,92 \pm 0,08	3,67 \pm 0,30	3,56 \pm 0,80	4,67 \pm 0,14	4,24 \pm 0,22	

Abreviações: ARG1, arginase; ODC1, ornitina descarboxilase; ADC, arginina descarboxilase; AGMAT, agmatinase.

5.3 Experimento 3: Avaliação da expressão e da localização das proteínas ARG1, ODC1, ADC e AGMAT em placentomas no período pós-implantacional.

A relevância das vias da arginina, para produção de poliaminas, também foi confirmada com a identificação de todas as proteínas estudadas em placentomas coletados nos dias 40, 60, 80, 100, 120 e 140 de gestação (Figura 6). Ao longo dos dias estudados, foi observada menor intensidade ($p < 0,01$) de identificação de todas as proteínas aos 40 dias de gestação, quando comparadas com os dias 60, 120 e 140 (Tabela 6). Secções utilizadas como controle negativo não apresentaram coloração. Esses resultados sugerem que a demanda dessas proteínas pode aumentar ao longo da gestação.

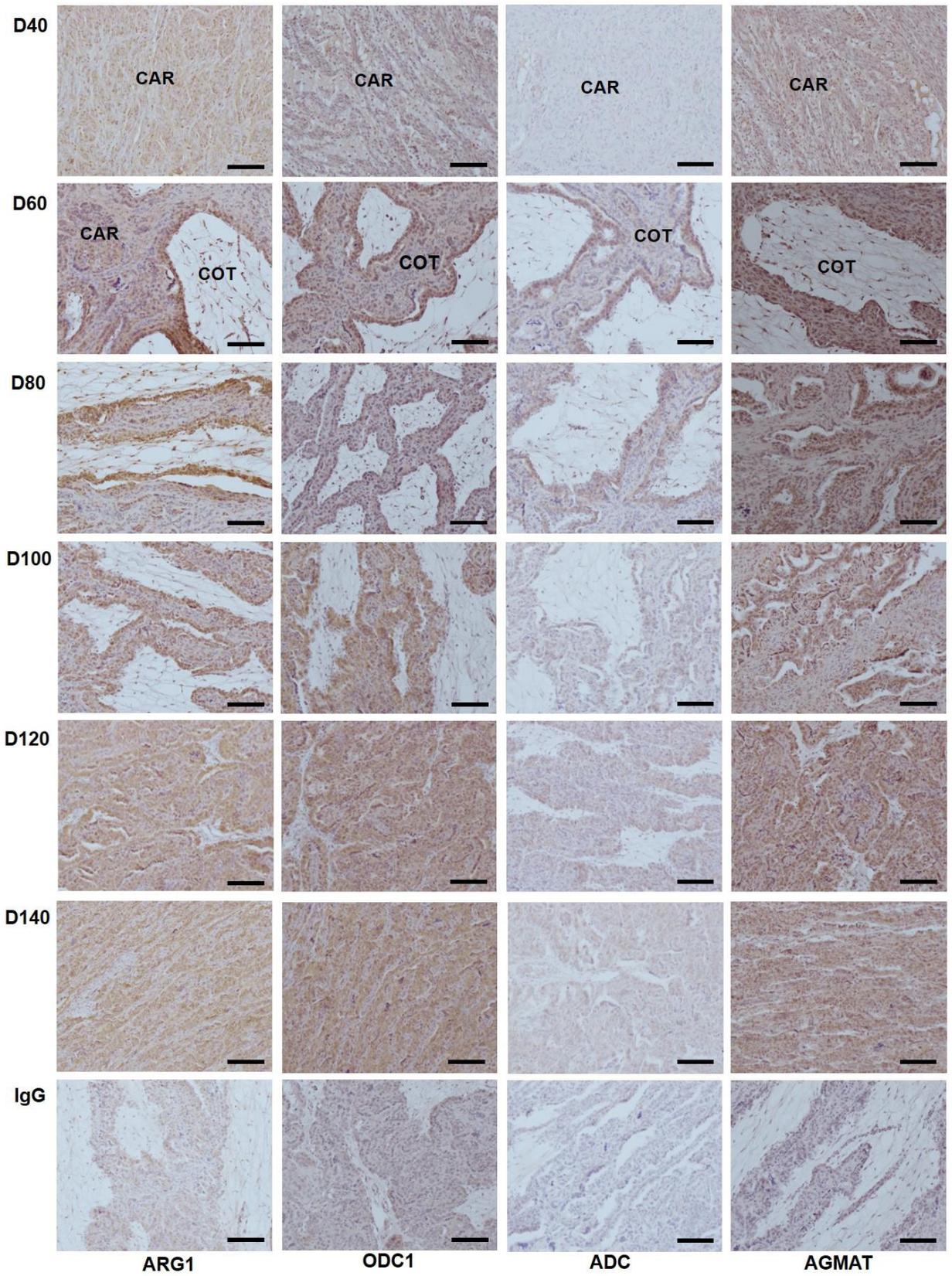


Figura 6. Secções de placentomas ovinos aos 40, 60, 80, 100, 120 e 140 de gestação. ARG1, arginase; ODC1, ornitina descarboxilase; ADC, arginina descarboxilase; AGMAT, agmatinase; IgG, imunoglobulina. CAR: tecido caruncular, COT: tecido cotiledonário; barra de escala: 100 μ m, aumento 40X.

Tabela 6. Quantificação, de acordo com os escores, da imunocoloração de ARG1, ODC1, ADC1 e AGMAT em placentomas ovinos durante o período a gestação.

Dia	ARG1	ODC1	ADC	AGMAT	Média	Valor de P
40	3,08 \pm 0,21	3,58 \pm 0,67	1,75 \pm 0,16	3,50 \pm 0,50	2,98 \pm 0,27 ^b	0,002*
60	4,17 \pm 0,32	3,92 \pm 0,08	3,00 \pm 0,49	4,66 \pm 0,24	3,94 \pm 0,21 ^a	
80	4,50 \pm 0,29	3,33 \pm 0,24	2,42 \pm 0,16	3,92 \pm 0,48	3,54 \pm 0,24 ^{ab}	
100	4,50 \pm 0,29	3,58 \pm 0,57	1,83 \pm 0,22	4,25 \pm 0,34	3,54 \pm 0,32 ^{ab}	
120	4,08 \pm 0,39	4,58 \pm 0,42	2,17 \pm 0,17	4,58 \pm 0,25	3,85 \pm 0,29 ^a	
140	4,75 \pm 0,16	4,25 \pm 0,34	1,75 \pm 0,25	4,58 \pm 0,25	3,83 \pm 0,33 ^a	

Abreviações: ARG1, arginase; ODC1, ornitina descarboxilase; ADC, arginina descarboxilase; AGMAT, agmatinase; *significativo a 5% de significância; a,b médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem entre si.

Não existem relatos na literatura sobre a identificação da localização das proteínas ARG1, ODC1, ADC e AGMAT em placentomas durante a gestação de ovelhas. Todavia, estudos realizados por Kwon et al. (2003b) aos 30, 40, 60, 80, 100, 120 e 140 dias de gestação em ovelhas, não estão de acordo com os achados do presente estudo, pois os autores identificaram atividade máxima de ODC1 e arginase, aos 40 dias de gestação em placentomas, nas regiões intercotiledonárias da placenta e no endométrio intercaruncular. No presente estudo, todas as proteínas foram identificadas em menor intensidade aos 40 dias da gestação.

Os resultados do presente estudo contrastam com os achados de Wang et al. (2014). Os autores relataram que, a via clássica da arginina (ODC1-dependente) é a via dominante para a síntese de poliaminas, enquanto que a via alternativa (ADC-AGMAT-dependente) é uma via secundária para produção de poliaminas durante o desenvolvimento embrionário no período de peri-implantação.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que a via alternativa parece ser tão importante quanto a via clássica, pois as proteínas da via clássica também estão presentes nos conceptos, endométrio e placentomas, evidenciando que a presença das proteínas de ambas vias da arginina parecem ser importantes para o

desenvolvimento fetal. Todavia, no presente estudo, as amostras de endométrio uterino, placentomas e conceptos não foram coletadas da mesma ovelha, assim novos estudos, avaliando amostras do mesmo animal, são interessantes a fim de confirmar a relevância de cada via metabólica.

Novos estudos são necessários para investigar a localização das proteínas de ambas vias da arginina para produção de poliaminas, bem como a concentração dessas proteínas durante a gestação de ovelhas, já que as poliaminas são importantes no período de peri-implantação, podendo estar relacionadas com perdas gestacionais causando prejuízos econômicos na produção de animais domésticos.

6. CONCLUSÃO

O gene *ODC1* é mais expresso aos 13 dias de gestação. As proteínas estudadas (*ARG1*, *ODC*, *ADC* e *AGMAT*) estão presentes em conceptos e endométrio uterino. O aumento da presença de todas as proteínas no lúmen uterino após os 13 dias de gestação, sugere que essas proteínas são requeridas em maiores quantidades para o processo de implantação.

Todas as proteínas estudadas são encontradas em placentomas e os resultados sugerem que a demanda dessas proteínas pode aumentar ao longo da gestação.

Os resultados do presente estudo evidenciam a importância de ambas vias metabólicas da arginina, para produção de poliaminas, durante o período gestacional de ovelhas. Novos estudos são necessários para investigar a expressão dos genes pertencentes a ambas vias da arginina para produção de poliaminas em conceptos ovinos.

7. REFERÊNCIAS

BASTIDA, C.M.; TEJADA, F.; CREMADES, A.; PEÑAFIEL, R. The preovulatory rise of ovarian ornithine decarboxylase is required for progesterone secretion by the corpus luteum. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.293, p.106–111, 2002.

BAZER, F.W.; SPENCER, T.E.; THATCHER, W.W. Growth and development of the ovine conceptus. *Journal of Animal Science*, v.90, p.159-170, 2012a.

BAZER, F.W.; SONG, G.W.; KIM, J.Y.; DUNLAP, K.A.; SATTERFIELD, M.C.; JOHNSON, G.A.; BURGHARDT, R.C.; WU, G. Uterine biology in sheep and pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v.3, p.23, 2012b.

BAZER, F.W.; SONG, G.H.; KIM, J.Y.; ERIKSON, D.W.; JOHNSON, G.A.; BURGHARDT, R.C.; GAO, H.; SATTERFIELD, M.C.; SPENCER, T.E.; WU, G. Mechanistic mammalian target of rapamycin (MTOR) cell signaling: effects of select nutrients and secreted phosphoprotein 1 on development of mammalian conceptuses. *Molecular and Cellular Endocrinology* 354:22–33, 2012c.

BURTON, G.J.; SCIOSCIA, M. RADEMACHER, T.W. Endometrial secretions: creating a stimulatory microenvironment within the human early placenta and implications for the aetiopathogenesis of preeclampsia. *Journal of Reproductive Immunology.*, v.89, p.118–125, 2011.

FÁTIMA, L.A.; EVANGELISTA, M.C.; SILVA, R.S.; CARDOSO, A.P.M.; BARUSELLI, P.S.; PAPA, P.C. FSH up-regulates angiogenic factors in luteal cells of buffaloes, *Domestic Animal Endocrinology*, v.45, p.224-237, 2013.

FILANT, J. e SPENCER, T.E. Uterine glands: biological roles in conceptus implantation, uterine receptivity, and decidualization. *The International Journal of Developmental Biology*, v.14, p. 107-116, 2014.

IYER, R.K.; KIM, H.K.; TSOA, R.W.; GRODY, W.W.; CEDERBAUM S.D. Cloning and Characterization of Human Agmatinase. *Molecular Genetics and Metabolism*, v.75, p.209-218, 2002.

HORYN, O.; LUHOVYY, B.; LAZAROW, A.; DAIKHIN, Y.; NISSIM, I.; YUDKOFF, M.; NISSIM, I. Biosynthesis of agmatine in isolated mitochondria and perfused rat liver: studies with ¹⁵N-labelled arginine. *Biochemical Society*, v. 388, p.419-425, 2005.

HUTTI, M.H.; POLIVKA, B.; WHITE, S.; HILL, J.; CLARK, P.; COOKE, C.; CLEMENS, S.; ABELL, H. Experiences of nurses who care for women after fetal loss. *Journal of Obstetric Gynecologic and Neonatal Nursing*, v.45, p.17-27, 2016.

IYO, A.H.; ZHU, M.Y.; ORDWAY, G.A.; REGUNATHAN, S. Expression of arginine decarboxylase in brain regions and neuronal cells. *Journal of Neurochemistry*, v.96, p.1042-1050, 2006.

KWON, H.; WU, G.; BAZER, F.W.; SPENCER, T.E. Developmental changes in polyamine levels and synthesis in the ovine conceptus. *Biology of Reproduction*, v.69, p.1626-1634, 2003b.

KWON, H.; SPENCER, T.E.; BAZER, F.W.; WU, G. Developmental changes of amino acids in ovine fetal fluids. *Biology of Reproduction*, v.68, p.1813-1820, 2003a.

LEFRÈVE, P.L.C.; PALIN, M.F.; MURPHY, B.D. Polyamines on the Reproductive Landscape, *Endocrine Reviews*, v.32, p.694-712, 2011.

LENIS, Y.Y.; WANG, X.; TANG, W.; WU, G.; BAZER, F.W. Effects of argmatine on secretion of interferon tau and catecholamines and expression of genes related to

production of polyamines by ovine trophoctoderm cells. *Animo Acids*, v.48, p.2389-2399, 2016.

MARTIN, P.M.; SUTHERLAND, A.E.; VAN WINKLE, L.J. Amino acid transport regulates blastocyst implantation. *Biology of Reproduction*, v.69, p.1101–1108, 2003

MORRIS JR, S.M. Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. *British Journal of Pharmacol*, v.157, p.922–930, 2009.

O'CONNELL, A.R.; DEMMERS, K.J.; SMAILL, B.; READER, K.L.; JUENGEL, J.L. Early embryo loss, morphology, and effect of previous immunization against androstenedione in the ewe. *Theriogenology*, v.86, p.1285-1293, 2016.

RAMOS, R.D.; MESQUITA, F, S.; D'ALEXANDRI, F.L.; GONELLA-DIAZA, A.M.; PAPA, P.C.; BINELLI, M. Regulation of the polyamine metabolic pathway in the endometrium of cows during elarly diestrus. *Molecular Reproduction and Development*, v. 81, p.584-594, 2014.

REYNOLDS, L.P.; CATON, J.S.; REDMER, D.A.; GRAZUL-BILSK, A.T. VONNAHME, K.A.; BOROWICZ, P.P.; LUTHER, J.S.; WALLACE, J.M.; WU, G.; SPENCER, T.E. Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies. *Journal of Physiology*, v. 572, p.51–58, 2006.

SPENCER, T.E.; BARTOL, F.F.; BAZER, F.W.; JOHNSON, G.A.; JOYCE, M.M. Identification and characterization of glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1- like protein expression in the ovine uterus. *Biology of Reproduction*, v. 60, p.241–250, 1999.

SPENCER, T.E.; BURGHARDT, R.C.; JOHNSON, G.A.; BAZER, F.W. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Animal Reproduction Science*, v.82-83, p. 537-550, 2004.

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

WANG, X.; YING, W.; DUNLAP, K.A.; LIN, G.; SATTERFIELD, M.C.; BURGHARDT, R.C.; WU, G.; BAZER, F.W. Arginine Decarboxylase and Agmatinase: An alternative pathway for de novo biosynthesis of polyamines for development of mammalian conceptuses. *Biology of Reproduction*, v.84, p. 1-15, 2014a.

WANG, X.; FRANK, J.W.; LITTLE D.R.; DUNLAP, K.A.; SATTERFIELD, M.C.; BURGHARDT, R.C.; HANSEN, T.R.; WU, G.; BAZER, F.W. Functional role of arginine during the peri-implantation period of pregnancy. I. Consequences of loss of function of arginine transporter SLC7A1 mRNA in ovine conceptus trophoctoderm. *The FASEB Journal, Research Communication*, v.28, p.2852-2863, 2014b.

WHITLOCK, B.K.; MAXWELL, H.S. Pregnancy-associated glycoproteins and pregnancy wastage in cattle. *Theriogenology*, v.70, p.550–559, 2008.

WU, G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition, *Amino Acids*, v. 37, p.1-17, 2009.

WU, G.; BAZER, F.W.; CUDD, T.A.; MEININGER, C.J.; SPENCER, T.E. Maternal nutrition and fetal development. *The Journal of Nutrition*, v. 134, p.2169–2172, 2004.

WU, G.; BAZER, F.W.; DAI, Z.; LI, D.; WANG, J.; WU, Z. Amino acid nutrition in animals: protein synthesis and beyond. *The Annual Review of Animal Biosciences*, v.2, p. 387-417, 2014.

WU, G.; BAZER, F.W.; SATTERFIELD, M.C.; LI, X.; WANG, X.; JOHNSON, G.A.; BURGHARDT, R.C. ZHAOLAI, D.; WANG, J.; WU, Z. Impacts of arginine nutrition on embryonic and fetal development in mammals. *Amino Acids*, v. 45, p.241-256, 2013b.

WU, G. Functional amino acids in nutrition and health. *Amino Acids*, v. 45, p. 407-4144, 2013a.

WU, G.; MORRIS, S.M Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *The Biochemical journal*, v.336, p.1–17, 1998.

ZHU, M.Y.; IYO, A.; PILETZ, J.E.; REGUNATHAN, S. Expression of human arginine decarboxylase, the biosynthetic enzyme for agmatine. *Biochimica et Biophysica*, v.1670, p.156-164, 2004.