

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA
VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**ESTUDO COMPARATIVO DA COMPOSIÇÃO
PROTÉICA DE EXPLANTES ENDOMETRIAIS DE
FÊMEAS BOVINAS TRATADAS OU NÃO COM
17 β -ESTRADIOL NO 17º DIA DO CICLO ESTRAL**

Sergio Silva Alves Junior
Médico Veterinário

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**ESTUDO COMPARATIVO DA COMPOSIÇÃO
PROTÉICA DE EXPLANTES ENDOMETRIAIS DE
FÊMEAS BOVINAS TRATADAS OU NÃO COM
17 β -ESTRADIOL NO 17º DIA DO CICLO ESTRAL**

Sergio Silva Alves Junior
Orientadora: Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive

Dissertação apresentada à
Faculdade de Odontologia e
Curso de Medicina Veterinária -
UNESP, Campus de Araçatuba,
como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal (Medicina
Veterinária Preventiva e Produção
Animal).

ARAÇATUBA - SP
2009



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Estudo comparativo da composição proteica de explantes endometriais de fêmeas bovinas tratadas ou não com 17beta- estradiol no 17º dia do ciclo estral.

AUTOR: SÉRGIO SILVA ALVES JUNIOR

ORIENTADOR: Dr.ª CLÁUDIA MARIA BERTAN MEMBRIVE

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL (MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E PRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora.

Dr.ª FLÁVIA SIMONE MUNIN

Dr. FÁBIO ERMINIO MINGATTO

Dr.ª CLÁUDIA MARIA BERTAN MEMBRIVE

DATA DA REALIZAÇÃO: 21 de dezembro de 2009.

Presidente da Comissão Examinadora
Dr.ª CLÁUDIA MARIA BERTAN MEMBRIVE
- Orientadora -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Sergio Silva Alves Junior – Nascido no dia 26 de junho de 1985, no município de Atibaia - SP. Coursou até a oitava série na rede pública de ensino. No ensino médio obteve a concessão de duas bolsas de estudos em colégios particulares, Colégio Seletivo e Colégio Carlos Drummont de Andrade (COC), ambos na cidade de São João da Boa Vista - SP. Coursou o ensino médio no COC com bolsa integral de estudos. Em 2003, ingressou no Curso de Medicina Veterinária no Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos (UNIFEOB), sediada na cidade de São João da Boa Vista - SP, com uma bolsa integral de estudos concedida pela UNIFEOB. A partir do segundo ano de graduação, realizou monitoria na disciplina de “Anatomia Animal” durante quatro anos consecutivos, período em que integrou o “Grupo de Estudos de Morfologia” liderado pelo Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, Profa. Dra. Ana Flávia de Carvalho e Prof. Dr. João Flavio Panattoni Martins. No quarto ano de graduação, assumiu a monitoria da disciplina de “Genética” durante o período de um ano, quando integrou o “Grupo de Estudos de Reprodução Animal”, liderado pelo Prof. Dr. Carlos Henrique Cabral Vianna e Prof. Dr. João Flávio Panattoni Martins, participando como monitor e ouvinte em cursos na área de Reprodução Animal realizados no Campus da UNIFEOB. No último ano de graduação, realizou o estágio obrigatório na Universidade de São Paulo, na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, junto ao Departamento de Reprodução Animal, sob orientação da Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D’Avila Assumpção. A graduação foi concluída em 2007. Em março de 2008, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, na Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, Campus de Araçatuba. Durante o Mestrado cursou e foi aprovado em um conjunto de dez disciplinas e obteve uma bolsa de auxílio financeiro concedida pela CAPES. A dissertação de mestrado refere-se a um estudo realizado na área de Fisiologia da Luteólise em fêmeas bovinas, tema que integra a área de pesquisa da Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive, professora da UNESP de Dracena, vinculada a Pós-Graduação em Ciência Animal na UNESP de Araçatuba, responsável pela orientação da presente dissertação.

***“Sonho que se sonha só é sonho que se sonha só,
sonho que se sonha junto vira realidade”***

Raul Seixas

Dedico...

Aos meus pais, Sergio Silva Alves e Ivani Maria Conceição da Silva Alves,
pelo apoio concedido durante o Mestrado,
fundamental para a realização
deste sonho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, criador do Universo e de todas as coisas visíveis e invisíveis, que nos abençoa e protege, possibilitando paz, amor, fé e esperança, essenciais para a vida e elaboração de um trabalho.

Aos meus pais e as minhas irmãs, Débora e Luciana, pelo carinho, confiança e um imenso amor. Como sempre digo: “Família é a base de tudo”.

Aos meus tios e tias, meu avô, minhas avós, primos e primas, que sempre estiveram comigo dando apoio para a realização deste meu sonho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Meirelles, Coordenador da Pós-Graduação em Ciência Animal, pela oportunidade e confiança depositada.

A minha orientadora, Prof. Dra. Claudia Bertan Membrive, pela orientação no desenvolvimento do projeto.

Ao Prof. Dr. Mário Binelli, da USP de Pirassununga, pela contribuição científica.

Ao Prof. Dr. Marcelo de Cerqueira Cesar, da USP de Pirassununga, por possibilitar a interpretação dos géis de eletroforese.

Ao Prof. Dr. Júlio Cesar de Carvalho Balieiro, da USP de Pirassununga, pela amizade e auxílio nas análises estatísticas.

A Profa. Dra. Flávia Thomaz Verechia Pereira, da UNESP de Dracena, pela colaboração e imensa cordialidade no empréstimo dos equipamentos utilizados neste estudo.

Aos professores da UNESP de Dracena, em especial a Profa. Dra. Maria Luiza Poiatti, Prof. Dr. Fábio Ermínio Mingatto, Prof. Dr. Ricardo da Fonseca e Prof. Dr. Antônio Chaves Assis Neto, pela ajuda e amizade.

Aos professores da UNESP de Araçatuba e UNESP de Jaboticabal, pelos ensinamentos durante as disciplinas.

A Dra. Flávia Simone Munin, técnica da USP de Pirassununga, pela ajuda concedida na interpretação dos géis de eletroforese.

Aos alunos de graduação da UNESP de Dracena, em especial a Fernanda Cavallari de Castro e Natália de Oliveira, pela ajuda laboratorial na confecção dos géis de eletroforese.

Aos funcionários da UNESP de Dracena, em especial ao Sr. Clemente, Sra. Lúcia, Wanderson, Caio, Fábio e Letícia. Obrigado pela amizade, nunca vou esquecer de vocês.

Aos amigos das repúblicas por onde passei nas cidades de Araçatuba, Dracena, Pirassununga e em especial a República “Canekão” de Jaboticabal. Obrigado pela alegria, amizade e companheirismo.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de auxílio financeiro.

E a todos que direta ou indiretamente estiveram sempre do meu lado contribuindo na elaboração deste projeto, muito obrigado.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Introdução	24
2. Hipótese	29
3. Objetivo	
3.1 Objetivo Geral.....	30
3.2 Objetivos Específicos	30
4. Revisão de Literatura	
4.1 Mecanismos endócrinos e moleculares pelos quais a $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial atua na luteólise.....	31
4.2 Mecanismos envolvidos na síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial	34
4.3 Mecanismos envolvidos na liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelas células endometriais	35
4.4 Participação do estradiol na síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$	36
4.5 Técnica de Eletroforese Unidimensional.....	42
5. Referências Bibliográficas.....	44

CAPÍTULO 2 - ESTUDO COMPARATIVO DA COMPOSIÇÃO PROTÉICA DE EXPLANTES ENDOMETRIAIS DE FÊMEAS BOVINAS TRATADAS OU NÃO COM 17β -ESTRADIOL NO 17º DIA DO CICLO ESTRAL

RESUMO	58
1. Introdução	60
2. Material e Método	

2.1 Animais.....	62
2.2 Local do Experimento	62
2.3 Sincronização dos Estros.....	63
2.4 Tratamento <i>in vivo</i>	63
2.5 Isolamento e Conservação dos Explantes Endometriais	64
2.6 Extração de Proteínas do Tecido Endometrial.....	64
2.7 Quantificação das Proteínas	65
2.8 Delineamento Experimental	66
2.9 Eletroforese Unidimensional	67
2.10 Coloração por Coomassie Blue	68
2.11 Coloração por Nitrato de Prata	68
2.12 Avaliação da densitometria.....	69
2.13 Análise Estatística.....	69
3. Resultados e Discussão	
3.1 Quantidade de proteína total em explantes endometriais entre os tratamentos	72
3.2 Efeito do estradiol na modificação da composição protéica de explantes endometriais	73
3.2.1 Caracterização do peso molecular das proteínas contidas nas amostras e da porcentagem representativa de cada proteína em relação à proteína total.....	73

4. Conclusão	77
5. Referências Bibliográficas	78
ANEXOS	81

ABREVIATURAS

1D-EF	eletroforese unidimensional
A	absorvância
AA	ácido araquidônico
AIF ⁻⁴	estimulador inespecífico da proteína G
BEND	células endometriais bovinas (American Type Culture Collection - ATCC n° CRL-2398)
BSA	albumina sérica bovina
°C	graus Celsius
Ca ²⁺	cálcio
CAP-527	antagonista dos receptores de ocitocina
CI	ionóforo de cálcio
CL	corpo lúteo
CLG	células luteais grandes
CLP	células luteais pequenas
COX	ciclooxigenase
COX-1	ciclooxigenase 1
COX-2	ciclooxigenase 2
D	dia do ciclo estral
DAG	diacilglicerol
DNA	ácido desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
E ₂	estradiol
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético

EGTA	ácido etilenoglicol tetra-acético
ER α	receptor de estrógeno alfa
ER β	receptor de estrógeno beta
ERK1/2	quinases reguladas por sinais extracelulares 1 e 2
ET-1	endotelina 1
g	grama
<i>g</i>	força gravitacional
GDP β S	guanosina-5'-O-(2-tiodifosfato)
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofinas
GTP	trifosfato de guanosina
IA	inseminação artificial
IP ₃	inositol trifosfato
kDa	quilodaltons
LH	hormônio luteinizante
M	molar
mA	miliampere
mg	miligrama
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MHz	megahertz
mL	mililitro
mM	milimolar
MPC-1	proteína monoquimioatrativa tipo 1
n	número de elementos
nm	nanômetros
NaCl	cloreto de sódio

NaHCO ₃	bicarbonato de sódio
NaH ₂ PO ₄	fosfato diácido de sódio
OT	ocitocina
p	nível de significância
P ₄	progesterona
PDBu	forbol Ester
pg	picograma
PGD ₂	prostaglandina D ₂
PGF _{2α}	prostaglandina F _{2α}
PGFM	13, 14-dihidro-15-ceto-prostaglandina F _{2α}
PGH ₂	prostaglandina H ₂
PGHS	prostaglandina endoperoxidase H sintase
PGI ₂	prostaglandina I ₂
PGT	proteína transportadora da prostaglandina F _{2α}
pH	potencial hidrogeniônico
PIB	produto interno bruto
PIP ₂	fosfatidilinositol bifosfato
PKC	proteína quinase C
PKC _α	proteína quinase C alfa
PKC _ε	proteína quinase C epsilon
PLA ₂	fosfolipase A ₂
PLA ₂ c	fosfolipase A ₂ citosólica
PLA ₂ G ₄ A	fosfolipase A ₂ grupo IV A
PLA ₂ G ₄ C	fosfolipase A ₂ grupo IV C
PLA ₂ G ₆	fosfolipase A ₂ grupo VI

PLC	fosfolipase C
PMSF	fenilmetilsulfonil fluoride
RNA _m	ácido ribonucléico mensageiro
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
TNF α	fator de necrose tumoral α
W	watts
μ g	micrograma
μ L	microlitro
%	porcentagem
<	menor
$\leq$	menor ou igual
>	maior
$\geq$	maior ou igual
=	igual

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Curva com diferentes concentrações de BSA (0, 200, 400, 600, 800 e 1000µg/mL) estimadas pelo Método de Bradford a uma absorvância de 595nm, ilustrando o r^2 e a equação da reta utilizada para a mensuração das concentrações de proteínas totais contidas nas amostras de extratos obtidos de explantes endometriais de novilhas tratadas via intravenosa com 0mg (Grupo Controle; n=6) ou 3mg de E₂ (Grupo E₂; n=6) no 17º dia do ciclo estral83
- Figura 2.** Média e erro padrão da média da quantidade de proteína total mensurada em extratos obtidos de explantes endometriais de novilhas tratadas via intravenosa com 0mg (Grupo Controle; n=6) ou 3mg de E₂ (Grupo E₂; n=6) no 17º dia do ciclo estral84
- Figura 3. Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida 10% SDS-PAGE corado com Coomassie Blue. GEL 1A:** Padrão de Peso Molecular (PPM) onde os pontos vermelhos referem-se respectivamente aos pesos: 225, 150, 102, 76, 52, 38, 31kDa, estando ausentes os pesos 24, 17 e 12 kDa (**Linha 1**); Animal C1 (**Linha 2**); Animal E1 (**Linha 3**); Animal C2 (**Linha 4**); Animal E2 (**Linha 5**); Animal C3 (**Linha 6**) e Animal E3 (**Linha 7**). Foram aplicados 40µg de proteínas totais extraídas de explantes endometriais obtidos de novilhas mestiças não tratadas (Animal C1, C2 e C3; Grupo Controle) e tratadas com 17β-estradiol (Animal E1, E2 e E3; Grupo E₂) no 17º dia do ciclo estral. **GEL 2A:** PPM no qual os pontos vermelhos referem-se respectivamente aos pesos: 225, 150, 102, 76, 52, 38, 31kDa, estando ausentes os pesos 24, 17 e 12 kDa (**Linha 1**); Animal C4 (**Linha 2**); Animal E4 (**Linha 3**); Animal C5 (**Linha 4**); Animal E5 (**Linha 5**); Animal C6 (**Linha 6**) e Animal E6 (**Linha 7**). Foram aplicados 40µg de proteínas totais extraídas de explantes endometriais obtidos de novilhas mestiças não tratadas (Animal C4, C5 e C6; Grupo Controle) e tratadas com 17β-estradiol (Animal E4, E5 e E6; Grupo E₂) no 17º dia do ciclo estral - representativo de 4 (quatro) repetições.....85

Figura 4. Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida 10% SDS-PAGE corado com Nitrato de Prata. GEL 1B: Padrão de Peso Molecular (PPM) onde os pontos vermelhos referem-se respectivamente aos pesos: 225, 150, 102, 76, 52, 38, 31kDa, estando ausentes os pesos 24, 17 e 12 kDa (**Linha 1**); Animal C1 (**Linha 2**); Animal E1 (**Linha 3**); Animal C2 (**Linha 4**); Animal E2 (**Linha 5**); Animal C3 (**Linha 6**) e Animal E3 (**Linha 7**). Foram aplicados 10µg de proteínas totais extraídas de explantes endometriais obtidos de novilhas mestiças não tratadas (Animal C1, C2 e C3; Grupo Controle) e tratadas com 17β-estradiol (Animal E1, E2 e E3; Grupo E₂) no 17º dia do ciclo estral. **GEL 2B:** PPM no qual os pontos vermelhos referem-se respectivamente aos pesos: 225, 150, 102, 76, 52, 38, 31kDa, estando ausentes os pesos 24, 17 e 12 kDa (**Linha 1**); Animal C4 (**Linha 2**); Animal E4 (**Linha 3**); Animal C5 (**Linha 4**); Animal E5 (**Linha 5**); Animal C6 (**Linha 6**) e Animal E6 (**Linha 7**). Foram aplicados 10µg de proteínas totais extraídas de explantes endometriais obtidos de novilhas mestiças não tratadas (Animal C4, C5 e C6; Grupo Controle) e tratadas com 17β-estradiol (Animal E4, E5 e E6; Grupo E₂) no 17º dia do ciclo estral – representativo de 3 (três) repetições.....86

Figura 5. Análise computacional dos géis de eletroforese unidimensional identificando cada pico como uma proteína (em peso molecular) e a espessura do pico como a quantidade de proteína (porcentagem de banda), **A1 e B1** – representativo do padrão de peso molecular do gel corado com Coomassie Blue, sendo **1** representativo do **Gel 1** e **2** representativo do **Gel 2**; **A2 e B2** – representativo de uma amostra controle do gel corado com Coomassie Blue; **A3 e B3** – representativo de uma amostra tratada com 17β-Estradiol corado com Coomassie Blue.....87

Figura 6. Análise computacional dos géis de eletroforese unidimensional identificando cada pico como uma proteína (em peso molecular) e a espessura do pico como a quantidade de proteína (porcentagem de banda), **C1 e D1** – representativo do padrão de peso molecular do gel corado com Nitrato de Prata, sendo **1** representativo do **Gel 1** e **2** representativo do **Gel 2**; **C2 e D2** – representativo de uma amostra controle do gel corado com Nitrato de Prata; **C3 e D3** – representativo de uma amostra tratada com 17β-Estradiol corado com Nitrato de Prata.....88

Figura 7. Representação gráfica das 18 bandas individuais identificadas no gel de poliacrilamida corado com Coomassie Blue, comparando a média das porcentagens (%) de cada banda em amostras de proteínas extraídas de explantes endometriais obtidos de novilhas mestiças não tratadas (n=6; Grupo Controle) e tratadas com 17 β -estradiol (n=6; Grupo E₂) no 17º dia do ciclo estral.....89

Figura 8. Representação gráfica das 12 bandas individuais identificadas no gel de poliacrilamida corado com Nitrato de Prata, comparando a média das porcentagens (%) de cada banda em amostras de proteínas extraídas de explantes endometriais obtidos de novilhas mestiças não tratadas (n=6; Grupo Controle) e tratadas com 17 β -estradiol (n=6; Grupo E₂) no 17º dia do ciclo estral. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste *t* de *Student*90

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Média e Erro Padrão da média da quantidade de proteína total de extratos obtidos de explantes endometriais obtidos de novilhas mestiças não tratadas (n= 6: Grupo Controle) e tratadas com 17 β -estradiol (n= 6: Grupo E₂) no 17º dia do ciclo estral92
- Tabela 2.** Número de bandas identificadas nas colunas contendo as amostras, pesos moleculares (kDa) e porcentagem relativa de proteínas referente a cada banda presente nas amostras protéicas e estimados das linhas equivalentes para ambos os grupos, referente as proteínas totais extraídas de explantes endometriais obtidos de novilhas mestiças não tratadas (n=6; Grupo Controle) e tratadas com 17 β -estradiol (n=6; Grupo E₂) no 17º dia do ciclo estral, submetidas à eletroforese unidimensional em Gel de Poliacrilamida a 10% SDS-PAGE corados por Coomassie Blue.....93
- Tabela 3.** Número de bandas identificadas nas colunas contendo as amostras, pesos moleculares (kDa) e porcentagem relativa de proteínas referente a cada banda presente nas amostras protéicas e estimados das linhas equivalentes para ambos os grupos, referente as proteínas totais extraídas de explantes endometriais obtidos de novilhas mestiças não tratadas (n=6; Grupo Controle) e tratadas com 17 β -estradiol (n=6; Grupo E₂) no 17º dia do ciclo estral, submetidas à eletroforese unidimensional em Gel de Poliacrilamida a 10% SDS-PAGE corados por Nitrato de Prata.....94

ESTUDO COMPARATIVO DA COMPOSIÇÃO PROTÉICA DE EXPLANTES ENDOMETRIAIS DE FÊMEAS BOVINAS TRATADAS OU NÃO COM 17 β -ESTRADIOL NO 17º DIA DO CICLO ESTRAL

RESUMO - Em fêmeas bovinas, a liberação de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) pode ser induzida *in vivo* pelo estradiol (E_2), entretanto, o papel do E_2 na síntese de $PGF_{2\alpha}$ ainda não foi esclarecido. Considerando que as concentrações plasmáticas de $PGF_{2\alpha}$ aumentam 3,5 horas após a aplicação de E_2 *in vivo*, acredita-se que o E_2 ative não somente enzimas, mas também estimule a síntese de proteínas essenciais para a produção de $PGF_{2\alpha}$, como a PKC e PLA2. O presente estudo objetivou avaliar o efeito do E_2 no incremento da concentração das proteínas totais no endométrio e na modificação da composição protéica de explantes endometriais de fêmeas bovinas tratadas com E_2 no 17º dia do ciclo estral. A hipótese é que a administração de E_2 em fêmeas bovinas no 17º dia do ciclo estral incrementa a concentração de proteínas no endométrio e modifica a composição protéica nos explantes endometriais. Para tanto, fêmeas bovinas mestiças (*Bos taurus taurus* vs *Bos taurus indicus*) foram tratadas no 17º dia do ciclo estral, via intravenosa, com 0mg (Grupo Controle; n=6) ou 3mg de E_2 (Grupo E_2 ; n=6) e abatidas duas horas após o tratamento. Explantes endometriais foram isolados e submetidos à extração de proteínas totais. As amostras de proteínas, referentes aos explantes de cada animal, foram avaliadas por eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida 10% SDS-PAGE e coradas com Coomassie Blue ou Nitrato de Prata. A concentração de proteínas totais não diferiu entre os grupos ($p=0,1158$) e foi de $6296,10 \pm 439,90\mu\text{g/mL}$ para o Grupo Controle e de $8426,56 \pm 1156,00\mu\text{g/mL}$ para o Grupo E_2 . Nos géis corados com Coomassie Blue foram identificadas 18 bandas protéicas e não foi observada diferença significativa ($p>0,05$) no perfil protéico dos explantes endometriais. Na coloração com Nitrato de Prata, foram identificadas 12 bandas protéicas e verificou-se no Grupo E_2 maior porcentagem relativa das bandas referentes ao peso molecular de 75 a 76kDa (8,40% vs. 4,89%; no Grupo E_2 e Controle

respectivamente; $p < 0,05$) e 108 a 110kDa (6,85% vs. 3,84%; no Grupo E_2 e Controle respectivamente; $p < 0,05$). Observou-se no Grupo E_2 menor porcentagem relativa da banda referente ao peso molecular de 90kDa (5,78% vs. 9,83%; no Grupo E_2 e Controle respectivamente; $p < 0,05$). Conclui-se que a administração de E_2 não incrementa a concentração de proteínas no endométrio, entretanto, altera a composição protéica nos explantes endometriais.

Palavras-chave: Bovino, Estradiol, Luteólise, Prostaglandina $F_{2\alpha}$.

COMPARATIVE ESTUDIES IN PROTEIN COMPOSITION OF ENDOMETRIUM EXPLANTS IN COWS TREATED WITH ESTRADIOL 17 β AT THE 17th DAY OF ESTROUS CYCLE

SUMMARY - In cows the release of prostaglandin F_{2 α} (PGF_{2 α}) can be induced in vivo by estradiol (E₂), however, the role of E₂ in the synthesis of PGF_{2 α} has not yet been clarified. Considering that plasma concentrations of PGF_{2 α} increased 3.5 hours after application of E₂ in vivo, it is believed that E₂ not only active enzymes, but also stimulates the synthesis of essential proteins for the production of PGF_{2 α} , as PKC and PLA2 . This study aimed to evaluate the effect of E₂ in increasing the concentration of total protein in the endometrium and changes in protein composition of endometrial explants from cows treated with E₂ at the 17th day of estrous cycle. The hypothesis is that the administration of E₂ in cows on the 17th day of the estrous cycle increases the concentration of protein in the endometrium and changes the composition of protein in endometrial explants. Therefore, days of the estrous cycle, crossbred cows were treated at 17th day of estrous cycle intravenously with 0 mg (Control Group; n = 6) or 3 mg of E₂ (E₂ Group; n = 6) and killed two hours after treatment. Endometrial explants were isolated and subjected to extraction of total protein. Samples of proteins related to the explants from each animal were analyzed by one-dimensional electrophoresis on polyacrylamide gel 10% SDS-PAGE and stained with Coomassie Blue or silver nitrate. The concentration of total protein did not differ between groups (p = 0.1158) and was 6296.10 $\pm$ 439.90 μ g/mL for the Control Group and of 8426.56 $\pm$ 1156.00 μ g/mL for E₂ Group. In gels stained with Coomassie Blue were identified 18 protein bands and there was no significant difference (p>0.05) in the protein profile of endometrial explants. Staining with Silver Nitrate, was identified 12 protein bands and was found in E₂ Group greater relative percentage of the bands for the molecular weight of 75 to 76kDa (8.40% vs. 4.89% in E₂ Group and Control respectively; p <0.05) and 108 to 110Kda (6.85% vs. 3.84% in E₂ Group and Control respectively, p <0.05). Observed in E₂ Group lower percentage on the band on

the molecular weight of 90kDa (5.78% vs. 9.83% in E₂ Group and control respectively; p<0.05). It is concluded that the administration of E₂ does not develop the protein concentration in the endometrium, however, modifies the proteinic composition in the endometrial explantes.

Keywords: Cattle, Estradiol, Luteolysis, Prostaglandin F_{2α}.

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

Apesar das turbulências econômicas que afligem os EUA e ameaçam transformar-se em crise de proporções mundiais, o continente asiático e outros países emergentes, com destaque para a Rússia, continuam a apresentar elevadas taxas de crescimento. Nos últimos anos, a economia da China registrou as maiores taxas de crescimento anual, enquanto a da Índia, Coréia do Sul e outros países asiáticos vêm se desenvolvendo ao ritmo de 6% ao ano, mantendo elevados saldos positivos em suas balanças comerciais.

A consequência imediata do desenvolvimento econômico, que envolve aproximadamente três bilhões de pessoas, quase metade da população do planeta, é a melhoria do padrão de vida do continente asiático, que até recentemente enfrentava privações de toda ordem. A elevação do padrão de vida começa pela melhoria da dieta alimentar, especialmente o aumento de consumo de proteínas de origem animal. De fato, o enriquecimento das nações asiáticas determinou um explosivo aumento no consumo de *commodities*, especialmente grãos, carnes e minérios.

As nações da Europa Oriental incorporadas à União Européia, por razões diversas e não menos importantes, também demonstram sinais consistentes de recuperação econômica e aumento no consumo de proteínas de origem animal. Além disso, o Oriente Médio, tradicional importador de carne bovina européia, por receio da “Encefalopatia Espongiforme Bovina” mais conhecida como “Doença da Vaca Louca”, passou a importar o produto preferencialmente dos países do Cone Sul.

Nos últimos anos, a associação destes fatores favoreceu a demanda internacional de carne bovina, que tem registrado um crescimento anual de 300 mil a 400 mil toneladas, ritmo que deverá ser mantido nos próximos 10 anos.

Desta forma, foi gerada a expectativa de evolução de 7,7 milhões de toneladas de carne bovina negociadas em 2007 para aproximadamente 10 milhões em 2017 (ANUALPEC, 2009).

Em 2008, o rebanho bovino brasileiro foi estimado em 170.670.000 animais, sendo 79% dos animais destinados à produção de carne. O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo e desde 2004 ocupa a posição de líder mundial nas exportações de carne bovina. Em 2008, a produção nacional de carne bovina foi de 9.325.000 toneladas, sendo 2.140.000 destinadas à exportação (ANUALPEC, 2008).

Assim como a pecuária, a agricultura também contribuiu de maneira efetiva no PIB e na balança comercial brasileira no ano de 2008. O setor sucroalcooleiro, aquecido pela agroenergia, tem encontrado uma grande oportunidade no mercado internacional com a busca por combustíveis renováveis. Este cenário aumenta a competitividade dentro do próprio setor agropecuário, exigindo que a pecuária bovina de corte aumente sua produtividade e lucratividade para permanecer economicamente viável.

Embora detentor do maior rebanho comercial do mundo, o Brasil ocupa a quarta posição na produção de toneladas de equivalente carcaça, sendo precedido pelos EUA, União Européia e China, respectivamente. Apesar da pecuária nacional ter demonstrado evolução nos aspectos tecnológicos, tais estimativas indicam uma eficiência na produção pecuária aquém da necessária.

Na criação de bovinos a produtividade está diretamente relacionada à eficiência reprodutiva das fêmeas, que devem apresentar um adequado intervalo entre partos, ao redor de 12 meses, gerando a produção de 1 bezerro/matriz/ano. Em 2007, o rebanho nacional era composto por 68.809.867 matrizes, destas 55.639.882 eram vacas e 13.169.985 novilhas com mais de 24 meses. No ano seguinte, o Brasil produziu 44.110.000 bezerros (ANUALPEC, 2009). Quando se estabelece uma relação entre o número de matrizes em idade reprodutiva e o número de bezerros nascidos, estima-se uma produção nacional média de 0,64 bezerro/matriz/ano. Além de tal estimativa, deve-se

salientar que no Brasil, nos últimos seis anos, houve uma grande agregação ao valor do bezerro ao desmame, que passou de um preço de US\$18,8 dólares/cabeça em 2003 para US\$47,3 em 2008, aumento estimado em 251% (ANUALPEC, 2009). Desta forma, conclui-se que a baixa eficiência na produção de bezerros nascidos reduz a lucratividade e a competitividade do setor pecuário.

Em propriedades especializadas na produção de novilhos para o abate, as baixas taxas de natalidade e as altas taxas de mortalidade dos bezerros certamente representam os principais fatores na composição dos custos. No Brasil, infelizmente, são registradas baixas taxas de natalidade e altas taxas de mortalidade que, associadas, caracterizam longos intervalos entre partos, em média 18 meses. A eficiência reprodutiva é o fator que, isoladamente, mais afeta a produtividade e a lucratividade de um rebanho.

Sabe-se que fêmeas bovinas zebuínas possuem uma gestação de aproximadamente 290 dias e que após o parto as matrizes passam por um estado fisiológico, com duração de aproximadamente 45 dias, conhecido como anestro pós-parto. Tal período permite a reestruturação do aparelho reprodutor assim como o restabelecimento dos mecanismos endócrinos responsáveis pela ciclicidade das fêmeas, tendo seu final determinado pela primeira ovulação fértil (YAVAS; WALTON, 2000). Com a duração média de um ciclo estral de 21 dias, adicionado ao período de anestro pós-parto e ao da gestação, torna-se um grande desafio obter um intervalo entre partos de 365 dias.

A mortalidade embrionária em rebanhos bovinos é uma das maiores causas de falhas reprodutivas, conforme revisado por Santos et al. (2004) e Sartori et al. (2004). Nos primeiros sete dias pós-inseminação tal mortalidade está associada a falhas de fertilização, defeitos genéticos e anormalidades no desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto. Neste período a mortalidade normalmente é inferior a 10%, entretanto, em vacas de leite sob estresse calórico, tal mortalidade pode ultrapassar 40% (SARTORI et al. 2002; 2004).

Estudos realizados na década de 70 permitiram a observação de que em bovinos os principais desafios biológicos para o estabelecimento da prenhez ocorrem no período especialmente compreendido entre os dias 15 e 19 após a fecundação, posteriormente, designado de “período crítico” (BINELLI et al. 2000).

O ciclo estral de fêmeas bovinas é mediado por um conjunto de mecanismos neuroendócrinos. A ocorrência da luteólise, entre os dias 15 e 19 do ciclo estral é de fundamental importância para determinar o fim da fase progestacional, o desenvolvimento de um folículo ovulatório e o estro. Em fêmeas bovinas um “período crítico” 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. Segundo Godkin et al. (2008) durante este período, 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 $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$). Frequentemente, tal evento fisiológico não é bem sucedido, resultando na ocorrência da luteólise, na mortalidade embrionária e em perdas representativas na pecuária.

A mortalidade embrionária associada à falha na manutenção do corpo lúteo aumenta os intervalos entre partos (HANK, 1979). Diskin e Sreenan (1980) relataram que falhas de fertilização até o 8º dia pós-inseminação são responsáveis por 10% dos casos de fracasso reprodutivo, enquanto as mortes embrionárias entre os dias 8 e 16 pós-inseminação contribuem com mais de 30% dos referidos casos. Isso justifica relatos de taxas de nascimento após única inseminação de 50 a 55% para novilhas (ROCHE et al., 1977; SREENAN; MULVEHILL, 1975), de 52% a 57% para vacas selecionadas para a produção leiteira (MAWHINNEY; ROCHE, 1978) e de 53% para vacas especializadas na produção de carne (ROCHE et al., 1977).

Em fêmeas bovinas, é de amplo conhecimento que a $PGF_{2\alpha}$ 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 $\text{PGF}_{2\alpha}$ envolve fatores endócrinos como o estradiol (E_2), a ocitocina (OT), a progesterona (P_4) e o hormônio luteinizante (LH). O papel do E_2 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 $\text{PGF}_{2\alpha}$ (THATCHER et al., 1991). Sugere-se que, possivelmente a presença do embrião atenua os efeitos do E_2 . Diante destas informações fica claro 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 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 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, a fosfolipase C (PLC), a proteína quinase C (PKC), a fosfolipase A_2 (PLA_2) e a ciclooxigenase 2 (COX-2). Cunha (2004) sugeriu que a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ *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 Bertan (2004), o E_2 estimula a síntese das proteínas PKC e PLA_2 , ambas dependentes de cálcio e envolvidas na cascata geradora de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

A melhor compreensão dos mecanismos fisiológicos pelos quais o E_2 estimula a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ poderá contribuir para a elaboração de estratégias anti-luteolíticas que favoreçam a redução da mortalidade embrionária ocasionada durante o período crítico compreendido entre o 15º e o 19º dia de gestação, favorecendo a eficiência reprodutiva.

2. HIPÓTESE

A administração de E_2 em fêmeas bovinas no 17º dia do ciclo estral incrementa a concentração de proteínas no endométrio e modifica a composição protéica nos explantes endometriais.

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do estradiol no incremento da concentração de proteínas totais no endométrio e na modificação da composição proteica nos explantes endometriais de fêmeas bovinas tratadas com E₂ no 17º dia do ciclo estral.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A) Comparar a quantidade total de proteínas extraídas de explantes endometriais de fêmeas bovinas tratadas ou não com 17β-estradiol no 17º dia do ciclo estral;

B) Estabelecer uma análise da composição proteica de explantes endometriais obtidos de fêmeas bovinas tratadas ou não com 17β-estradiol no 17º dia do ciclo estral, por meio do emprego da técnica de eletroforese unidimensional;

C) Comparar a eficiência dos corantes Coomassie Blue e Nitrato de Prata na identificação do perfil protéico de explantes endometriais submetidos à eletroforese unidimensional.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 MECANISMOS ENDÓCRINOS E MOLECULARES PELOS QUAIS A $\text{PGF}_{2\alpha}$ ENDOMETRIAL ATUA NA LUTEÓLISE

O ciclo estral das fêmeas bovinas é mediado por um conjunto de mecanismos neuroendócrinos. A regressão funcional e estrutural do corpo lúteo (CL), evento denominado de luteólise, representa um destes mecanismos. Tal evento fisiológico possibilita o crescimento final do folículo dominante, a manifestação dos sinais físicos e psíquicos de estro e a ovulação, possibilitando à fêmea bovina uma nova oportunidade de acasalamento. A prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$) é considerada o principal fator luteolítico em bovinos. Desta forma, durante o período crítico do ciclo estral, compreendido entre o 15º e 19º dias, a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ precisa ser inibida para prevenir a luteólise e garantir a manutenção da prenhez (THATCHER et al., 1986).

A luteólise é desencadeada pela ocorrência de cinco a oitos pulsos de $\text{PGF}_{2\alpha}$, liberados pelo endométrio durante um período de 2 a 3 dias, compreendido entre o 15º e 19º dias do ciclo estral (FREDRICKSON et al., 1984; KINDHAL et al., 1976; NANCARROW et al., 1973; THORBURN et al., 1973). A natureza pulsátil da produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial é imprescindível para a ocorrência da luteólise (DANET-DESNOYERS et al., 1995; OKUDA et al., 2002).

Em ruminantes, aproximadamente 98% da $\text{PGF}_{2\alpha}$ produzida pelo útero é metabolizada em 13, 14-diidro-15-ceto-prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ (PGFM) na primeira passagem pelos pulmões. Dessa forma, a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ é mensurada *in vivo* por meio do seu principal metabólito, a PGFM, que possui meia vida na circulação periférica de aproximadamente 8 minutos (PIPER et al., 1970). A concentração basal de PGFM em vacas durante a fase luteínica apresenta variações em torno de 10 a 100 pg/mL. No momento da luteólise, a PGFM é produzida em picos com duração de 2 a 5 horas, em intervalos que variam de 2

a 30 horas, com concentrações plasmáticas de 150 a 500 pg/mL (BASU; KINDAHL, 1987; KOTWICA et al., 1998).

Durante a luteólise funcional, ocorre uma inibição aguda da liberação de progesterona (P_4) pelo corpo lúteo (GORAVANAHALLY et al., 2007). A falência da síntese de P_4 é determinada pela interação entre $PGF_{2\alpha}$ e receptores localizados nas células luteais esteroidogênicas (ANDERSON et al., 2001; CHEN et al., 1998; MAMLUCK et al., 1998; OLSON et al., 2001; SCHAMS; BERISHA, 2004).

Em fêmeas bovinas foi observado que o número de receptores para $PGF_{2\alpha}$ no CL aumenta ao longo da fase luteínica. Em tal espécie, o RNAm para os receptores de $PGF_{2\alpha}$ foi identificado nas células luteais pequenas (CLP), células luteais grandes (CLG) e células endoteliais que constituem os vasos sanguíneos que integram o CL (MAMLUCK et al. 1998). Em ovinos, as CLP apresentam receptores com baixa afinidade para a $PGF_{2\alpha}$ enquanto as CLG possuem receptores de alta e baixa afinidade pela $PGF_{2\alpha}$ (JUENGEL et al., 1995a, 1995b).

Membranas das células luteais apresentam receptores específicos em sua superfície, a $PGF_{2\alpha}$ ao se ligar nestes receptores, estimula a proteína quinase C (PKC). A PKC atua na diminuição da capacitação e o transporte de colesterol para o citoplasma e mitocôndria, mediando desta forma a ação anti-esteroidogênica da $PGF_{2\alpha}$ nas CLG (ZAMBETTI; LEVINE, 1993). A PKC também atua promovendo a falência da produção de P_4 pelo CL e determinando uma “dowregulation” nos receptores de LH nas CLP (NISWENDER, 2002). Possivelmente a PKC atue aumentando a expressão e ativação das proteínas envolvidas no processo de morte celular (SCHWARTZMAN; CIDLOWSKI, 1993).

A $PGF_{2\alpha}$ também estimula a síntese de RNAm e secreção de endotelina 1 (ET-1) nas células endoteliais que constituem o sistema vascular do CL. A ET-1 possui uma grande capacidade vasoconstritora. Essa característica é mais evidente entre os dias 17 e 21 do ciclo estral, sendo cerca de 30 vezes maior que nos dias 5 e 6 do ciclo estral em fêmeas bovinas (GIRSH et al., 1996a, 1996b).

MEIDAN e colaboradores em 1999, descreveram um modelo de ação da $\text{PGF}_{2\alpha}$. Neste modelo, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ se liga a receptores localizados nas CLG determinando drástica redução na produção de P_4 , aumento na secreção de ocitocina (OT) e aumento da expressão de ET-1. Ao se ligar nos receptores presentes nas células endoteliais, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ estimula a síntese de ET-1. A $\text{PGF}_{2\alpha}$ juntamente com a ET-1 promove uma vasoconstrição nos vasos que irrigam o CL promovendo conseqüente a hipóxia de tal tecido. Tal evento potencializa a secreção de ET-1, promovendo a morte das células vasculares e esteroidogênicas. Esse processo é acompanhado por um influxo de monócitos, macrófagos e pela secreção local de citocinas inflamatórias, dentre elas o fator de necrose tumoral alfa (TNF_α). O efeito estimulatório da $\text{PGF}_{2\alpha}$ nos receptores das células endoteliais promove o recrutamento e a migração de monócitos para o CL. Esta migração também é induzida pela proteína monoquimioatrativa tipo 1 (MCP-1). A migração e a maturação dos macrófagos são acompanhadas pela ativação do TNF_α que ligado ao seu receptor específico presente em algumas células do CL desencadeia nessas células a apoptose. O processo de apoptose no CL caracteriza-se inicialmente por fragmentação nuclear, degeneração da cromatina, diminuição da célula e fragmentação de membranas, que são posteriormente fagocitadas por macrófagos.

Considerando que em ruminantes aproximadamente 98% da $\text{PGF}_{2\alpha}$ produzida pelo útero é metabolizada em PGFM na primeira passagem pelos pulmões, em fêmeas bovinas e ovinas, uma interessante particularidade anatômica foi desenvolvida para que a $\text{PGF}_{2\alpha}$ pudesse alcançar o CL antes da sua metabolização. Nestas espécies a artéria ovariana fica enovelada à superfície da veia útero-ovariana que transversalmente é extremamente tortuosa, favorecendo o transporte de moléculas da veia útero ovariana para a artéria ovariana. Sendo assim, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ produzida no corno uterino passa por meio de da veia útero ovariana para a artéria ovariana chegando ao CL ipsolateral ao corno uterino secretor de $\text{PGF}_{2\alpha}$ evitando sua passagem pela circulação periférica e impedindo a metabolização pelos pulmões (HIXON; HANSEL, 1974; PIPER et al., 1970).

Em fêmeas bovinas foi reportada a existência de uma proteína transportadora de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (PGT). Tal proteína atua mediando o transporte da $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelas vias vasculares do útero para o ovário. O RNAm para a PGT foi expresso no endométrio, miométrio e plexo útero-ovário durante o ciclo estral. No endométrio o grau de expressão do RNAm para a PGT foi baixo entre os dias 1 e 9, moderado entre os dias 10 a 15 e 19 a 21 e máximo entre os dias 16 e 18 do ciclo estral, período que coincide com a luteólise (BANU et al., 2003). Embora o desenvolvimento dos mecanismos luteolíticos endometriais seja regulado por um conjunto de eventos endócrinos e moleculares, o transporte de $\text{PGF}_{2\alpha}$ desempenha um papel fundamental no controle basal e pulsátil da liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no epitélio endometrial (BANU et al., 2008).

4.2 MECANISMOS ENVOLVIDOS NA SÍNTESE DE $\text{PGF}_{2\alpha}$ ENDOMETRIAL

A síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no endométrio de fêmeas bovinas resulta de uma complexa cascata de eventos intracelulares que ocorrem de maneira altamente coordenada. Os substratos para a produção de prostaglandinas são os fosfolípidos araquidonilados, como a plasmenilcolina, fosfatidilcolina e alquilacil glicerolfosfarilcolina (DIAZ et al., 2002; WILTBANK; OTTOBRE, 2003).

O modelo celular da biosíntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ a partir do ácido araquidônico (AA) foi descrito por Burns et al. (1997). Neste modelo, em células epiteliais endometriais a OT se liga ao seu receptor, e este associado à proteína G ativa a enzima fosfolipase C (PLC). A PLC ao ser ativado cliva o fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2) em inositol trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 se liga a receptores específicos no retículo endoplasmático, promovendo a liberação de cálcio do interior do retículo endoplasmático para o citosol. O DAG ativa uma serina/treonina da proteína quinase C (PKC). A PKC com peso molecular de 80kDa, pertence a uma família de enzimas que está envolvida no controle da função de outras proteínas, por meio da fosforilação dos grupos hidroxilo dos resíduos de aminoácidos serina e treonina destas proteínas. As enzimas PKC desempenham um papel importante no sinal de “tradução” de várias cascatas, também dependentes de cálcio para sua ativação (ALBERTS et al., 1997; SEN

et al., 2005). Nas células endometriais, a PKC uma vez ativada, fosforila a fosfolipase A2 (PLA2). O aumento da concentração de cálcio no citosol, induzido pelo IP_3 age estimulando a atividade da PLA2, enzima cálcio-dependente (CLARK et al., 1991). A PLA2 é uma enzima de 85kDa que cliva preferencialmente na posição Sn-2 da fosfatidilcolina liberando ácido araquidônico (AA) (GIJON; LESLIE, 1999). No endométrio bovino foram identificadas a PLA2 do grupo IV (PLA2G4A e PLA2G4C) e do grupo VI (PLA2G6). A forma inativa da PLA2c é localizada no citosol, no entanto, uma vez fosforilada na presença de Ca^{2+} , a PLA2c torna-se ativada, se transferindo do citosol para a membrana e o retículo endoplasmático para mobilizar AA (BURNS et al.; 2000).

A hidrólise do AA da membrana fosfolipídica pela PLA2 é fundamental na síntese de $PGF_{2\alpha}$ (COYNE et al., 2008). A seguir, o AA livre é convertido a prostaglandina H_2 (PGH_2) pela enzima cicloxigenase 2 (COX-2). Há duas isoformas de cicloxigenase (COX) que catalisam a conversão do AA para PGH_2 , a COX-1 e a COX-2. A COX-1 é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos (BALAGUER et al., 2005; COHN et al., 1997), enquanto a COX-2 é expressa apenas em alguns tecidos do organismo (SIMON, 1999). A PGH_2 por ação da enzima prostaglandina endoperoxidase H sintase (PGHS) é convertida em $PGF_{2\alpha}$ (BALAGUER et al., 2005).

A prostaglandina é determinada de maneira específica em razão do tipo de célula. A síntese das prostaglandinas específicas como a PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGD_2 , PGI_2 é catalisada pela PGE sintase, PGF sintase, PGD sintase e PGI sintase, respectivamente (BANU et al., 2008; SMITH, 1992). A síntese de $PGF_{2\alpha}$ não acontece somente pela redução da PGH_2 por meio da enzima PGF_2 sintase, mas também pela redução da PGE_2 pela enzima 9-ceto-redutase (DANET-DESNOYERS et al., 1994), que de forma reversível, converte PGE_2 em $PGF_{2\alpha}$ controlando o metabolismo de prostaglandinas (COYNE et al., 2008).

4.3 MECANISMOS ENVOLVIDOS NA LIBERAÇÃO DE $PGF_{2\alpha}$ PELAS CÉLULAS ENDOMETRIAIS

A $\text{PGF}_{2\alpha}$ assim como as outras prostaglandinas não é armazenada nas células, e sim liberada imediatamente após sua síntese (OKUDA et al., 2002). A $\text{PGF}_{2\alpha}$ é produzida principalmente pelas células epiteliais da região intercaruncular do endométrio (KIM; FORTIER, 1995) que liberam a $\text{PGF}_{2\alpha}$ por meio de da sua superfície basal (ASSELIN et al., 1996).

Armstrong e Hansel (1959) foram os primeiros a relatar sobre a participação da OT no controle da luteólise em fêmeas bovinas. Em ovinos, um mecanismo de “feedback” positivo estimulado pela OT parece promover a liberação pulsátil de $\text{PGF}_{2\alpha}$ pelo endométrio (McCRACKEN et al., 1984). A OT proveniente da neurohipófise estimula a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial e esta por sua vez, estimula a liberação de OT pelo CL, que atua estimulando ainda mais a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial, caracterizando um sistema de retroalimentação positiva. Neste modelo, a luteólise tem início devido ao aumento do número de receptores para OT no endométrio. Até recentemente este mecanismo de desencadeamento da luteólise também era aceito para bovinos. Porém, em estudos utilizando o CAP-527 (um antagonista para receptor de OT), antes e durante o período da luteólise, a duração da fase luteínica e do ciclo estral não foi alterada em bovinos e suínos (KOTWICA et al., 1997, 1999). Esses resultados evidenciam que a OT desempenharia um papel facilitador e não essencial no desencadeamento da luteólise. Acredita-se que a OT atue modulando a amplitude dos pulsos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ durante a luteólise em bovinos (OKUDA et al., 2002). Visto que a OT não é imprescindível para a ocorrência da luteólise, muitos pesquisadores vêm focalizando o E_2 como principal indutor da luteólise em bovinos.

4.4 PARTICIPAÇÃO DO ESTRADIOL NA SÍNTESE DE $\text{PGF}_{2\alpha}$

Em alguns estudos *in vivo* verificou-se que o E_2 é capaz de estimular a expressão dos receptores endometriais de OT (BEARD; LAMMING, 1994; HIXON; FLINT, 1987; SPENCER et al., 1995). Foi proposto que o estradiol produzido nos folículos ovarianos interage com os receptores de estradiol do

tipo alfa (ER_{α}) no endométrio e ocasiona o aumento da expressão gênica dos receptores de ocitocina nas células endometriais, determinante para conduzir a liberação pulsátil de $PGF_{2\alpha}$ (BALAGUER et al., 2005).

A administração de E_2 no 15º dia do ciclo estral promove a luteólise em bovinos (GENGENBACH et al., 1977; HANSEL et al. 1973). De fato, a administração de E_2 em novilhas no 13º dia do ciclo, promoveu a luteólise e o aumento nas concentrações de PGFM (WOCLAWEK-POTOCKA et al., 2006). O E_2 endógeno ou exógeno é capaz de induzir a produção de $PGF_{2\alpha}$ e promover uma diminuição nas concentrações de P_4 circulante em razão da regressão do CL (AULETTA; FLINT, 1988). Em contrapartida, a extirpação de folículos ovarianos por irradiação ou cauterização, procedimentos que ocasionam uma supressão temporária do E_2 circulante retarda a luteólise em bovinos (HUGHES et al., 1987; KARSH et al., 1970; VILLA-GODOY et al., 1981). SALFEN e colaboradores (1999) evidenciaram um atraso na luteólise em vacas cujo desenvolvimento da segunda onda folicular foi inibido. Neste estudo, a remoção de E_2 resultou no prolongamento do ciclo estral e na ausência da luteólise.

Vacas prenhes apresentam diminuição do E_2 circulante (PRINTCHARD 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. A partir dos dados reportados na literatura, admite-se que o E_2 assume um papel fundamental na luteólise, entretanto, os mecanismos envolvidos ainda não foram elucidados.

Em experimentos *in vivo*, verificou-se que a concentração sérica de PGFM (metabólito da $PGF_{2\alpha}$) aumentou 15 minutos após a injeção de OT e somente 3,5 horas após a injeção de E_2 (CASTRO E PAULA, 2003). Sugere-se por tais evidências, que o E_2 estimularia a síntese de proteínas envolvidas na cascata geradora de $PGF_{2\alpha}$, enquanto a OT ativaria enzimas presentes no meio intracelular. CUNHA (2004) sugeriu que a produção de $PGF_{2\alpha}$ *in vitro* parece não ser resultado unicamente da ativação de enzimas, mas da

dependência de eventos complexos responsáveis pela expressão de proteínas celulares.

Os receptores de estrógeno (ER), subtipos ER α e ER β 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 E₂ induzindo a transcrição de genes, sendo a ativação da via ERK1/2 a responsável pela fosforilação da PLA2c, essencial para o E₂ induzir a atividade por ambas as vias.

Schwartz et al. (2002) também identificaram efeitos sinérgicos entre as ações genômica e não genômica do E₂ sobre o crescimento de condrócitos de ratas. Esses autores observaram que o E₂ 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 E₂ e pelo E₂-BSA (estradiol associado à albumina sérica bovina), o qual não é capaz de atravessar a membrana celular, sugerindo que o E₂ 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 E₂ ou pelo E₂-BSA nos condrócitos.

Boyan et al. (2003) observaram que o E₂ e o E₂-BSA induziram rapidamente a PKC α 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 β S), mas não dependente de PLA2 ou AA. Neste estudo, o tamoxifen também bloqueou a PKC-dependente de E₂, diferentemente do ICI 182780 que apenas reduziu a síntese de DNA. Os resultados sugeriram que o E₂ aumenta a atividade da PKC por uma via envolvendo a membrana celular, e que o tamoxifen reduz a atividade da PKC por meio de mecanismos não dependentes de ER α e ER β .

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 $\text{PGF}_{2\alpha}$ (BURNS et al. 1997; DANET-DESNOYERS et al., 1995). 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 PLA2c, 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 $\text{PGF}_{2\alpha}$ no endométrio bovino; enquanto que o ácido aristolóquico, um inibidor da atividade da PLA2, bloqueou a liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ induzida por OT, por melitina e por AIF^{-4} , 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 $\text{PGF}_{2\alpha}$ (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 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 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_2 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_2 .

Burlando et al. (2002) verificaram que o E_2 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_2 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_2 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_2 também ocasionou a translocação da PLA2c para a membrana celular.

Thomas et al. (2006) constataram que o E_2 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 PLA2c para a membrana celular após o estímulo com E_2 ; além disso, a fosforilação e a translocação da PLA2c foram sensíveis à inibição da ERK e ocorreram simultaneamente com a ativação da ERK. A fosforilação da PLA2c pode ser estimulada pelo E_2 -BSA, no entanto, foi bloqueada pelo antagonista de ER.

O aumento da concentração de cálcio intracelular em explantes endometriais bovinos tratados com CI *in vitro* resultou em um aumento da liberação de $PGF_{2\alpha}$ (BURNS et al., 1998; DANET-DESNOYERS et al., 1995).

De acordo com Bertan (2004), o tratamento com E_2 *in vivo*, duas horas antes das vacas serem abatidas no 17º dia do ciclo estral, associado à adição de CI *in vitro* em explantes endometriais provenientes desses animais, exacerbou a síntese de $PGF_{2\alpha}$ quando comparado ao grupo de vacas não tratadas com E_2 *in vivo* e em explantes não tratados com CI. O mesmo foi observado em experimentos utilizando células endometriais bovinas (BEND) expostas ao E_2 e CI simultaneamente (BERTAN, 2004).

Binelli et al. (2000) observaram que o forbol éster (PDBu), um indutor de PKC, estimulou a liberação de $PGF_{2\alpha}$ 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 $PKC\epsilon$ com 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 $PGF_{2\alpha}$ do que o grupo controle, enquanto que o uso de um inibidor de PKC aboliu a secreção de $PGF_{2\alpha}$ induzida pelo PDBu.

Embora a importância do estradiol na luteólise esteja comprovada, os mecanismos pelo qual o E_2 desempenha tal função ainda permanecem desconhecidos. Segundo o modelo hipotético proposto por Bertan (2004), possivelmente o estradiol estimule a síntese das proteínas PKC e PLA2, ambas fundamentais para a síntese de $PGF_{2\alpha}$. Entretanto, ainda tornam-se necessários estudos complementares para que este modelo celular hipotético seja comprovado.

O presente estudo objetivou avaliar o efeito do estradiol no incremento da concentração das proteínas totais no endométrio e na modificação da composição protéica nos explantes endometriais de fêmeas bovinas tratadas com E_2 no 17º dia do ciclo estral. Para estabelecer tal análise comparativa foi empregada a técnica de separação das proteínas por eletroforese unidimensional.

4.5 TÉCNICA DE ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL

As técnicas de eletroforese possibilitaram grandes avanços no conhecimento das ciências da vida, proporcionando uma base única para os avanços na bioquímica, biologia molecular, genética, engenharia genética e na medicina (VESTERBERG, 1993).

A Eletroforese Unidimensional (1D-EF) de proteínas foi realizada pela primeira vez em 1937 por Arne Tiselius, que idealizou um método denominado eletroforese livre, o qual consistia na decomposição do soro sanguíneo em cinco frações protéicas principais, trabalho que lhe rendeu um prêmio Nobel. Nas últimas décadas, essa técnica tem sofrido aperfeiçoamentos constantes, possibilitando análises mais precisas.

A eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) é um método muito utilizado para a análise de massas moleculares de proteínas oligoméricas. O gel é uma matriz constituída de um polímero de acrilamida com ligações cruzadas de N-N-Metil-Bis-Acrilamida, cuja porosidade é variável de acordo com a concentração de acrilamida. Quanto maior a concentração de acrilamida, menores serão os poros da malha formada (ROCHA et al., 2005).

Antes de iniciar a eletroforese, as variáveis forma e carga nativa das proteínas devem ser eliminadas para que a separação dependa apenas de sua massa molecular. Para isso, as proteínas são misturadas com SDS, um detergente anfipático cuja função é desnaturá-las. Considerando que a forma nativa das proteínas é geralmente globular, o SDS converte a molécula protéica em uma estrutura linear, conferindo a mesma uma densidade de carga uniforme. O SDS tem alta carga negativa e uma cauda hidrofóbica que interage com as cadeias polipeptídicas numa proporção aproximada de 1,4g de SDS para cada grama de proteína, tornando-as negativamente carregadas. Na ausência do SDS, as proteínas com massas iguais podem migrar diferentemente na malha de gel devido ao diferencial de cargas de suas estruturas tridimensionais (COOPER, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2000). Além da adição do SDS, as proteínas podem ser opcionalmente expostas a

uma temperatura de 100°C na presença de um agente redutor, como ditioneitol (DTT) ou 2-mercaptoetanol, que desfazem as pontes dissulfetos (ligações S-S) das subunidades protéicas, ajudando a eliminar a estrutura tridimensional dos polipeptídeos (ROCHA et al., 2005).

Após tal tratamento, as amostras contendo as proteínas são aplicadas no topo de um gel de poliacrilamida. Na seqüência as proteínas são submetidas a um campo elétrico, circunstância em que todas as proteínas irão migrar em direção ao eletrodo positivo. Nesta técnica, a taxa de migração das proteínas é determinada pelo tamanho da molécula, condição que favorece a separação das proteínas pelos diferentes pesos moleculares. As proteínas com menor peso molecular migram pelo gel mais rapidamente e são encontradas mais próximas da extremidade inferior do gel, enquanto as proteínas com maior peso molecular encontram-se na extremidade superior (NELSON; COX, 2006). Quando se representa a mobilidade eletroforética frente ao logarítmo dos pesos moleculares conhecidos de diversas cadeias polipeptídicas (proteínas marcadoras), obtêm-se uma reta que pode ser utilizada como padrão para o cálculo do peso molecular das subunidades da proteína de interesse (ROCHA et al., 2005).

Posteriormente, a adição de um corante específico para proteínas possibilita o aparecimento de bandas protéicas, onde cada banda representa uma proteína diferente ou uma subunidade protéica. Nos métodos de coloração, os comumente utilizados são Coomassie Blue e Nitrato de Prata. O Coomassie Brilliant Blue R250 se liga inespecificamente a praticamente todas as proteínas. É menos sensível em comparação ao Nitrato de Prata, mas apresenta um bom efeito, além de ser fácil de corar. A coloração com Nitrato de Prata oferece como vantagem maior sensibilidade sobre os outros métodos, oferecendo sensibilidade cinquenta vezes maior quando comparada ao Coomassie Blue, o que permite a análise das proteínas contidas em uma amostra pouco concentrada. Esta coloração evidencia também ácidos nucléicos, glicoproteínas e lipoproteínas (ROCHA et al., 2005).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCONCIA, F.; MARINO, M. Synergism between genomic and non genomic estrogen action mechanisms. **IUBMB Life**, v.55, n.3, p.145-150, 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.

ANDERSON, L.E.; WU, Y.L.; TSAI, S.J.; WILTBANK, M.C. Prostaglandin F (2alpha) receptor in the corpus luteum, recent information on the gene, messenger ribonucleic acid, and protein. **Biology of Reproduction**, v.64, n.4, p. 1041-1047, 2001.

ANUALPEC 2008: Anuário da pecuária brasileira. São Paulo: FNP, 2008.

ANUALPEC 2009: Anuário da pecuária brasileira. São Paulo: FNP, 2009.

ARMSTRONG, D.T.; HANSEL, W. Alteration of bovine estrous cycle with oxytocin. **Journal of Dairy Science**, v. 42, n. 3, p. 533-542, 1959.

ASSELIN, E.; GOFF, A.K.; BERGERON, H.; FORTIER, M.A. Influence of sex steroids on the production of prostaglandin F_{2α} and E₂ and response to oxytocin in cultured epithelial and stromal cells of bovine endometrium. **Biology of Reproduction**, v. 54, n. 2, p. 371-379, 1996.

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

BALAGUER, S.A.; PERSHING, R.A.; RODRIGUEZ-SALLABERRY, C.; THATCHER, W.W.; BADINGA, L. Effects of bovine somatotropin on uterine

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

BANU, S.K.; AROSH, J.A.; CHAPDELAINE, P.; FORTIER, M.A. Molecular cloning and spatio-temporal expression of the prostaglandin transporter: a basis for the action of prostaglandins in the bovine reproductive system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 20, p. 11747-11752, 2003.

BANU, S.K.; LEE, J.; SATTERFIELD, M.C.; SPENCER, T.E.; BAZER, F.W.; AROSH, J.A. Molecular cloning and characterization of prostaglandin (PG) transporter in ovine endometrium: role for multiple cell signaling pathways in transport of PGF_{2α}. **Endocrinology**, v. 149, n. 1, p. 219-231, 2008.

BASU, S.; KINDAHL, H. Development of a continuous blood collection technique and a detailed study of prostaglandin F_{2α} release during luteolysis and early pregnancy in heifers. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 34, n. 7, p. 487-500, 1987.

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

BERTAN, C. M. **Mecanismos endócrinos e moleculares pelos quais o estradiol estimula a síntese de prostaglandina F_{2α} no endométrio de fêmeas bovinas**. 2004. 180f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

BINELLI, M.; GUZELOGLU, A.; BADINGA, L.; ARNOLD, D.R.; SIROIS, J.; HANSEN, T.R.; THATCHER, W.W. Interferon-τ modulates phorbol ester-induced production of prostaglandin and expression of cyclooxygenase-2 and phospholipase-2 from bovine endometrial cells. **Biology of Reproduction**,

v.63, n. 2, 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 inhibited by tamoxifen. **Endocrinology**, v.144, n.5, p.1812-1824. 2003.

BURLANDO, B.; MARCHI, B.; PANFOLI, I.; VIARENGO, A. Essential role of Ca^{2+} -dependent phospholipase A2 in estradiol-induced lysosome activation. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v.283, n. 5, p. C1461-1468. 2002.

BURNS, P.D.; GRAF, G.A.; HAYES, S.H.; SILVA, W.J. Cellular mechanisms by which oxytocin stimulates uterine $\text{PGF}_{2\alpha}$ synthesis in bovine endometrium: roles of phospholipases C and A2. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 14, n. 3, p. 181-191, 1997.

BURNS, P.D.; HAYES, S.H.; SILVA, W.J. Cellular mechanisms by which oxytocin mediates uterine prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ synthesis in bovine endometrium: role of calcium. **Domestic Animal Endocrinology**, v.15, n.6, p.477-487, 1998.

BURNS, P.D.; GRAF, G.A.; HAYES, S.H.; SILVA, W.J. Effect of oxytocin on expression of cytosolic phospholipase A_2 mRNA and protein in ovine endometrial tissue *in vivo*. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 19, n. 4, p. 237-246, 2000.

BURNS, P.D.; MENDES JUNIOR, J.O.B.; YEMM, R.S.; CLAY, C.M.; NELSON, S.E.; HAYES, S.H.; SILVA, W.J. Cellular mechanisms by which oxytocin mediates ovine endometrial prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ synthesis: role of G_i proteins and mitogen-activated protein kinases. **Biology of Reproduction**, v.65, n. 4, p.1150-1155, 2001.

CARAMBULA, S.F.; MATIKAINEN, T.; LYNCH, M.P.; FLAVELL, R.A.; GONÇALVES, P.B.; TILLY, J.L.; RUEDA, B.R.; Caspase-3 is a pivotal mediator of apoptosis during regression of the ovarian corpus luteum. **Endocrinology**, v.143, n. 4, 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 PGF_{2α}**. 2003. 202 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

CHEN, D.B.; BIRD, I.M.; ZHENG, J.; MAGNESS, R.R. 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.B.; WESTFALL, S.D.; FONG, H.W.; ROBERSON, M.S.; DAVIS, J.S. Prostaglandin F_{2α} 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.; KNOPF, J.L. A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains Ca²⁺-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. **Cell**, v. 65, n. 6, p. 1043-1051, 1991.

COHN, S.M.; SCHOLOEMANN, S.; TESSNER, T.; SEIBERT, K.; STENSON, W.F. Crypt stem cell survival in the mouse intestinal epithelium is regulated by prostaglandins synthesized through cyclooxygenase-1. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 6, p. 1367-1379, 1997.

COOPER, G.M. A célula: uma abordagem molecular. 2^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2001. 712 p.

COYNE, G.S.; KENNY, D.A.; CHILDS, S.; SCREENAN, J.M.; WATERS, S.M. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids alter the expression of genes involved in prostaglandin biosynthesis in the bovine uterus. **Theriogenology**, v. 70, n. 5, p. 772-782, 2008.

CUNHA, P. M. **O estímulo do estradiol na produção de PGF_{2α} 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.; WETZELS, C.; THATCHER, W.W. Natural and recombinant interferon- τ regulate basal and oxytocin-induced secretion of prostaglandins F_{2α} and E₂ by epithelial cells and estromal cells in the endometrium. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 6, n. 2, p.193-202, 1994.

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, n. 516, p.313-330, 1995.

DIAZ, F.J.; ANDERSON, L.E.; WU, Y.L.; RABOT, A.; TSAI, S.J.; WILTBANK, M.C. Regulation of progesterone and Prostaglandin F_{2α} production in the CL. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 191, n. 1, p. 65-80, 2002.

DISKIN, M.G.; SREENAN, J.M. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.59, n. 2, p.463-468, 1980.

FREDRIKSSON, G.; KINDAHL, H.; EDQVIST, L.E. 11-Ketotetranor PGF metabolites, a suitable indicator for measuring prostaglandin release during the normal oestrous cycle and early pregnancy in the goat. **Animal Reproduction Science**, v.7, n. 6, p.537-545, 1984.

GENGENBACH, D.R.; HIXON, J.E.; HANSEL, W. A luteolytic interaction between estradiol and prostaglandin $F_{2\alpha}$ in hysterectomized ewes. **Biology of Reproduction**, v. 16, n. 5, p. 571-576, 1977.

GIJON, M.A.; LESLIE, C.C. Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A2 activation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 65, n. 3, p. 330-336, 1999.

GIRSH, E.; MILVAE, R.; WANG, W.; MEIDAN, R. Effect of endothelin-1 on bovine luteal cell function role in prostaglandin $F_{2\alpha}$ – induced a steroidogenic action. **Endocrinology**, v. 137, n. 4, p. 1306-1312, 1996a.

GIRSH, E.; WANG, W.; MAMLUK, R.; ARDIT, F.; FRIEDMAN, A.; MILVAE, R.A.; MEIDAN, R. Regulation of endothelin-1 expression in the bovine corpus luteum, elevation by prostaglandin $F_{2\alpha}$. **Endocrinology**, v. 137, n. 12, p. 5191-5196, 1996b.

GODKIN, J.D.; ROBERTS, M.P.; ELGAYYAR, M.; GUAN, W.; TITHOF, P.K. Phospholipase A2 regulation of bovine endometrial (BEND) cell prostaglandin production. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 6, p. 44, 2008.

GORAVANAHALLY, M.P.; SEN, A.; INSKEEP, E.K.; FLORES, J.A. PKC epsilon and an increase in intracellular calcium concentration are necessary for $PGF_{2\alpha}$ to inhibit LH-stimulated progesterone secretion in cultured bovine steroidogenic luteal cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 5, p. 37, 2007.

GUZELOGLU, A.; MICHEL, F.; THATCHER, W.W. Differential effects of interferon- τ on the prostaglandin synthetic pathway in bovine endometrial cells treated with phorbol ester. **Journal of Dairy Science**, v.87, n. 7, p.2032-2041. 2004.

HANK, H.W. Infertility in dairy cattle. **Animal Reproduction**, v. 3, p. 19-29, 1979.

HANSEL, W.; CONCANNON, P.W.; LUKASZEWSKA, J.H. Corpora lutea of the large domestic animals. **Biology of Reproduction**, v. 8, p. 222-245, 1973.

HIXON, J.E.; FLINT, A.P. Effects of a luteolytic dose of oestradiol benzoate on uterine oxytocin receptor concentrations, phosphoinositide turnover and prostaglandin F-2 alpha secretion in sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 79, n. 2, p. 457-567, 1987.

HIXON, J.E.; HANSEL, W. Evidence for preferential transfer of prostaglandin F_{2 α} to the ovarian artery following intrauterine administration in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 11, n.5, p. 543-552, 1974.

HUGHES, T. L.; VILLA-GODOY, A.; KESNER, J.S.; FOGWELL, R.L. Destruction of bovine ovarian follicles: effects on the pulsatile release of luteinizing hormone and prostaglandin F₂ α -induced luteal regression. **Biology of Reproduction**, v.36, n. 3, p.523-529, 1987.

JUENGEL, J.L.; MEBERG, B.M.; TURZILLO, A.M.; NETT, T.M.; NISWENDER, G.D. Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding steroidogenic acute regulatory protein in ovine corpora lutea. **Endocrinology**, v. 136, n. 12, p. 5423-5429, 1995a.

JUENGEL, J.L.; NETT, T.M.; TANDESKI, T.R.; ECKERY, D.C.; SAWYER, H.R.; NISWENDER, G.D. Effects of luteinizing hormone and growth hormone

on luteal development in hypophysectomized ewes. **Endocrine**. v. 3, n. 5, p. 323-326, 1995.b.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecnologia da biologia celular e molecular: alguns exemplos. In: JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 7° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. P. 18 – 38.

KARSH, F.J.; NOVEROSKE, J.W.; ROCHE, J.F.; NORTON, H.W.; NALBANDOV, A.V. Maintenance of ovine corpora lutea in absence of ovarian follicles. **Endocrinology**, v. 87, n. 6, p. 1228-1236, 1970.

KIM, J.J.; FORTIER, M.A. A cell type specificity and protein kinase C dependency on the stimulation of prostaglandin E₂ and prostaglandin F_{2α} production by oxytocin and platelet – activating factor in bovine endometrial cells. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 103, n. 2, p. 239-247, 1995.

KINDAHL, H.; EDQUIST, L.E.; BANE, A.; GRANSTRÖM, E. Blood levels of progesterone and 15-keto-13,14-dihydroprostaglandin F_{2α} during the normal oestrous cycle and early pregnancy in heifers. **Acta Endocrinologica**, v. 82, n. 1, p. 134-149, 1976.

KOTWICA, G.; FRAN CZAK, A.; OKRASA, S.; KORWICA, J. Effect of an oxytocin antagonist on prostaglandin F_{2α} secretion and the course of luteolysis in sows. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 47, n. 2, p. 249-262, 1999.

KOTWICA, J.; SKARZYNSKI, D.; BOGACKI, M.; MELIN, P.; STAROSTKA, B. The use of an oxytocin antagonist to study the function of ovarian oxytocin during luteolysis in cattle. **Theriogenology**, v.48, n. 8, p. 1287-1299, 1997.

KOTWICA, J.; SKARZYNSKI, D.; JAROSZEWSKI, J.; WILLIAMS, G.L.; BOGACKI, M. Uterine secretion of prostaglandin F_{2α} stimulated by different

doses of oxytocin and released spontaneously during luteolysis in cattle. **Reproduction, Nutrition, Development**, v. 38, n. 3, p. 217-226, 1998.

MAMLUK, R.; CHEN, D.; GREBER, Y.; DAVIS, J.S.; MEIDAN, R. Characterization of messenger ribonucleic acid expression for prostaglandin $F_{2\alpha}$ and luteinizing hormone receptors in various bovine luteal cell types. **Biology of Reproduction**, v. 58, n.3, p. 849-856, 1998.

MAWHINNEY, S.; ROCHE, J.F. Factors involved in oestrus cycle control in the bovine. In: SREENAN, J.M. (Ed.). Control of reproduction in the cow. Luxembourg: EEC, 1978. p. 511-530.

McCRACKEN, J. A.; SCHRAMM, W.; OKULICZ, W. C. Hormone receptor control of pulsatile secretion of $PGF_{2\alpha}$ from ovine uterus during luteolysis and its abrogation in early pregnancy. **Animal Reproduction Science**, v.7, p.31-55. 1984.

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

NALEFSKI, E.A.; SULTZMAN, L.A.; MARTIN, D.M.; KRIZ, R.W.; TOWLER, P.S.; KNOPF, J.L.; CLARK, J.D. Delineation of two functionally distinct domains of cytosolic phospholipase A2, a regulatory Ca^{2+} -dependent lipid-binding domain and a Ca^{2+} -independent catalytic domain. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n.27, p.18239-18249, 1994.

NANCARROW, C.D.; BUCKMASTER, J.; CHAMLEY, W.; COX, R.I.; CUMMING, I.A.; CUMMINS, L.; DRINAN, J.P.; FINDLAY, J.K.; GODING, J.R.; RESTALL, B.J.; SCHNEIDER, W.; THORBURN, G.D. Hormonal changes around oestrus in the cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 32, n. 2, p. 320-321, 1973.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 4. Ed. São Paulo: Sarvier; 2006. 1202 p.

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

OKUDA, K.; MIYAMOTO, Y.; SKARZYNSKI, D.J. Regulation of endometrial prostaglandin $F_{2\alpha}$ synthesis during luteolysis and early pregnancy in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, n. 1-2, p. 255-264, 2002.

OLSON, K.K.; ANDERSON, L.E.; WILTBANK, M.C.; TOWNSON, D.H. Actions of prostaglandin $F_{2\alpha}$ and prolactin on intercellular adhesion molecule-1 expression and monocyte/macrophage accumulation in the rat corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 3, p. 890-897, 2001.

PIPER, P.J.; VANE, J.R.; WYLLIE, J.H. Inactivation of prostaglandins by the lungs. **Nature**, v. 225, n. 5233, p. 600-604, 1970.

PRITCHARD, 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.

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.

ROCHA, T.L.; Da COSTA, P.H.A.; MAGALHÃES, J.C.C.; EVARISTO, R.G.S.; De VASCONCELOS, E.A.R.; COUTINHO, M.V.; PAES, N.S.; Da SILVA, M.C.M.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. **Eletroforese bidimensional e análise de proteomes**. Brasília: EMBRAPA, 2005. 12 p.

ROCHE, J.F.; PRENDIVILLE, D.J.; DAVIS, W.D. Calving rate following fixed-time insemination after a 12-day progesterone treatment in dayre cows, beef cows and heifers **Veterinary Record**, v 101, n. 21, p. 417-419, 1977.

ROSENFELD, C.S.; YUAN, X.; MANIKKAM, M.; CALDER, M.D.; GARVERICK, H.A.; LUBAHN, D. Sequencing, cloning and localization of bovine estrogen receptor-beta (ER β) in the reproductive tract of the cow. **Biology of Reproduction**, v.58, suppl 1, p.108, 1998.

SALFEN, B.E.; CRESSWELL, J.R.; XU, Z.Z.; BAO, B.; GAVERICK, H.A. Effects of the presence of a dominant follicle and exogenous oestradiol on the duration of the luteal phase of bovine estrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 115, n. 1, p. 15-21, 1999.

SANTOS, J.E.P.; JUCHEM, S.O.; CERRI, R.L.A.; GALVÃO, K.N.; CHEBEL, R.C.; THATCHER, W.W.; DEI, C.S.; BILBY, C.R. Effect of bST and reproductive management on reproductive performance of Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 4, p.868-881, 2004.

SARTORI, R.; HAUGHIAN, J.M.; SHAVER, R.D.; ROSA, G.J.M.; WILTBANK, M.C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 4, p.905-920, 2004.

SARTORI, R.; SARTOR-BERGFELT, R.; MERTENS, S.A.; GUENTHER, J.N.; PARRISH, J.J.; WILTBANK, M.C. Fertilization and early embryonic development in Heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 11, p. 2803-2812, 2002.

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

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

SCHWARTZMAN, R.A.; CIDLOWSKI, J.A. Apoptosis, the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. **Endocrine Reviews**, v. 14, n. 2, p. 133-151, 1993.

SEN, A.; CHOUDHARY, E.; INSKEEP, E.K.; FLORES, J.A. Effects of selective protein kinase C isozymes in prostaglandin F_{2α} induced Ca²⁺ signaling and luteinizing hormone induced progesterone accumulation in the mid-phase bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 72, n. 4, p. 976-984, 2005.

SIMON, L.S. Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. **American Journal of Medicine**, v. 106, n. 5B, p. 375-425, 1999.

SMITH, W.L. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. **American Journal of Physiology**, v. 263, n. 2, pt. 2, p. F181-F191, 1992.

SPENCER, T.E.; BECKER, W.C.; GEORGE, P.; MIRANDO, M.A.; OGLE, T.F.; BAZER, F.W. Ovine interferon-tau inhibits estrogen receptor up-regulation and estrogen-induced luteolysis in cyclic ewes. **Endocrinology**, v. 136, n. 11, p. 4932-4944, 1995.

SREENAN, J.M.; MULVEHILL, P. The application of long and short-term progestagen treatments for oestrus cycle control in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.45, n. 2, p. 367-369, 1975.

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. Effect of estradiol-17 beta on peripheral plasma concentration of 15-keto-13,14-dihydro PGF2 alpha and luteolysis in cyclic cattle. **Prostaglandins**, v.31, n.4, p. 745-759, 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, n. 3, p. 256-265, 2006.

THORBURN, G.D.; COX, R.I.; CURRIE, W.B.; RESTALL, B.J.; SCHNEIDER, W. Prostaglandin F and progesterone concentrations in the utero-ovarian venous plasma of the ewe during the oestrous cycle and early pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 18, p. 151-158, 1973.

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.

VESTERBERG, O. A short history of electrophoretic methods. **Electrophoresis**, v. 14, n. 12, p. 1243-1249, 1993.

VILLA-GODOY, A.; IRELAND, J.J.; WORTMAN, J.A.; AMES, N.K.; FOGWEL, R.L. Luteal function in heifers following destruction of ovarian follicles. **Journal of Animal Science**, v. 53, sup. 1, p. 372, 1981.

WILTBANK, M.C.; OTTOBRE, J.S. Regulation of intraluteal production of prostaglandins. **Reproduction Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 91, 2003.

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

YAVAS, Y.; WALTON, J.S. Induction of ovulation in postpartum suckled beef cows: a review. **Theriogenology**, v. 54, n. 1, p. 1-23, 2000.

ZAMBETTI, G.P.; LEVINE, A.J. A comparison of the biological activities of wild-type and mutant p 53. **FASEB Journal**, v.7, n. 10, p. 855-865, 1993.

CAPÍTULO 2 - ESTUDO COMPARATIVO DA COMPOSIÇÃO PROTÉICA DE EXPLANTES ENDOMETRIAIS DE FÊMEAS BOVINAS TRATADAS OU NÃO COM 17 β -ESTRADIOL NO 17º DIA DO CICLO ESTRAL

Estudo comparativo da composição protéica de explantes endometriais de fêmeas bovinas tratadas ou não com 17 β -estradiol no 17º dia do ciclo estral

RESUMO - Em fêmeas bovinas, a liberação de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) pode ser induzida *in vivo* pelo estradiol (E_2), entretanto, o papel do E_2 na síntese de $PGF_{2\alpha}$ ainda não foi esclarecido. Considerando que as concentrações plasmáticas de $PGF_{2\alpha}$ aumentam 3,5 horas após a aplicação de E_2 *in vivo*, acredita-se que o E_2 ative não somente enzimas, mas também estimule a síntese de proteínas essenciais para a produção de $PGF_{2\alpha}$, como a PKC e PLA2. O presente estudo objetivou avaliar o efeito do E_2 no incremento da concentração das proteínas totais no endométrio e na modificação da composição protéica de explantes endometriais de fêmeas bovinas tratadas com E_2 no 17º dia do ciclo estral. A hipótese é que a administração de E_2 em fêmeas bovinas no 17º dia do ciclo estral incrementa a concentração de proteínas no endométrio e modifica a composição protéica nos explantes endometriais. Para tanto, fêmeas bovinas mestiças (*Bos taurus taurus* vs *Bos taurus indicus*) foram tratadas no 17º dia do ciclo estral, via intravenosa, com 0mg (Grupo Controle; n=6) ou 3mg de E_2 (Grupo E_2 ; n=6) e abatidas duas horas após o tratamento. Explantes endometriais foram isolados e submetidos à extração de proteínas totais. As amostras de proteínas, referentes aos explantes de cada animal, foram avaliadas por eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida 10% SDS-PAGE e coradas com Coomassie Blue ou Nitrato de Prata. A concentração de proteínas totais não diferiu entre os grupos (p=0,1158) e foi de $6296,10 \pm 439,90\mu\text{g/mL}$ para o Grupo Controle e de $8426,56 \pm 1156,00\mu\text{g/mL}$ para o Grupo E_2 . Nos géis corados com Coomassie

Blue foram identificadas 18 bandas protéicas e não foi observada diferença significativa ($p>0,05$) no perfil protéico dos explantes endometriais. Na coloração com Nitrato de Prata, foram identificadas 12 bandas protéicas e verificou-se no Grupo E₂ maior porcentagem relativa das bandas referentes ao peso molecular de 75 a 76kDa (8,40% vs. 4,89%; no Grupo E₂ e Controle respectivamente; $p<0,05$) e 108 a 110kDa (6,85% vs. 3,84%; no Grupo E₂ e Controle respectivamente; $p<0,05$). Observou-se no Grupo E₂ menor porcentagem relativa da banda referente ao peso molecular de 90kDa (5,78% vs. 9,83%; no Grupo E₂ e Controle respectivamente; $p<0,05$). Conclui-se que a administração de E₂ não incrementa a concentração de proteínas no endométrio, entretanto, altera a composição protéica nos explantes endometriais.

Palavras-chave: Bovino, Estradiol, Luteólise, Prostaglandina F_{2 α} .

1. INTRODUÇÃO

O ciclo estral de fêmeas bovinas é mediado por um conjunto de mecanismos neuroendócrinos. A ocorrência da luteólise, entre os dias 15 e 19 do ciclo estral é de fundamental importância para determinar o fim da fase gestacional, o desenvolvimento de um folículo ovulatório e o estro. É de amplo conhecimento que os pulsos de $\text{PGF}_{2\alpha}$ produzidos pelo endométrio durante o referido período, determinam a luteólise. Sabe-se ainda que a estimulação da síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ envolve fatores endócrinos como o estradiol (E_2), ocitocina (OT), progesterona (P_4) e o hormônio luteinizante (LH).

A supressão do E_2 , por meio de irradiação ou cauterização de folículos retarda a luteólise (HUGHES et al., 1987). A administração de E_2 em vacas cíclicas estimula a luteólise e promove o estro (THATCHER et al., 1986). Vacas prenhes apresentam diminuição do E_2 circulante, provavelmente em função de uma redução no desenvolvimento folicular e na produção de E_2 pelo folículo (THATCHER et al., 1991). Além disso, a administração de E_2 em vacas no 18º dia da prenhez estimula apenas de maneira modesta a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$ sugerindo que provavelmente a presença do embrião atenua os efeitos do E_2 (THATCHER et al., 1991). Diante destas informações, torna-se evidente que o E_2 desempenha um papel crucial na luteólise e que, para a manutenção da prenhez, o embrião diminui os efeitos do E_2 sobre a produção de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

A síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ 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 GTP, da fosfolipase C (PLC), da proteína quinase-C (PKC), da fosfolipase A_2 (PLA_2) e da ciclooxygenase 2 (COX-2). É possível que o E_2 estimule a síntese e/ou a atividade de moléculas envolvidas na cascata geradora de $\text{PGF}_{2\alpha}$, como enzimas e receptores para outros ligantes. Dessa forma, torna-se relevante à necessidade de ampliar os conhecimentos dos mecanismos pelos quais o E_2 promove a síntese de $\text{PGF}_{2\alpha}$ e a luteólise.

Em experimentos *in vivo*, verificou-se que a concentração sérica de 13, 14-diidro-15-ceto-prostaglandina $F_{2\alpha}$ (PGFM), um metabólito da $PGF_{2\alpha}$, aumentou 15 minutos após a injeção de OT e somente 3,5 horas após a injeção de E_2 (CASTRO E PAULA, 2003). Sugere-se por tais evidências, que o E_2 estimularia a síntese de proteínas envolvidas na cascata geradora de $PGF_{2\alpha}$, enquanto a OT possivelmente ativaria enzimas presentes no meio intracelular. Cunha (2004) sugeriu que a produção de $PGF_{2\alpha}$ *in vitro* parece não ser resultado unicamente da ativação de enzimas, mas da dependência de eventos complexos responsáveis pela expressão de proteínas celulares.

Embora a importância do estradiol na luteólise esteja comprovada, os mecanismos pelo qual o E_2 desempenha tal função ainda permanecem desconhecidos. Segundo o modelo hipotético proposto por Bertan (2004), possivelmente o E_2 estimule a síntese das proteínas PKC e PLA2, ambas fundamentais para a síntese de $PGF_{2\alpha}$. Entretanto, ainda tornam-se necessários estudos complementares para que este modelo celular hipotético seja comprovado.

O presente estudo objetivou avaliar o efeito do E_2 no incremento da concentração das proteínas totais no endométrio e na modificação da composição protéica nos explantes endometriais de fêmeas bovinas tratadas com E_2 no 17º dia do ciclo estral. Para estabelecer tal análise foi empregada a técnica de separação das proteínas por eletroforese unidimensional.

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1 ANIMAIS

Foram utilizadas 12 novilhas mestiças (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*), de idade variável (entre 36 à 48 meses), não gestantes, cedidas pela Prefeitura do Campus Administrativo da Universidade de São Paulo, na cidade de Pirassununga/SP. Inicialmente, as fêmeas foram avaliadas ginecologicamente por palpação retal e ultra-sonografia (Aparelho ALOKA modelo SSD-500; equipado com transdutor linear de 7,5 MHz) para a verificação da normalidade quanto às características do sistema genital e ciclicidade. Os animais foram mantidos em piquetes, com água à disposição. A alimentação foi baseada no pastejo (*Brachiaria decumbens* var. *marandu*) complementada com suplementação mineral. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (Protocolo nº 273/ 2003).

2.2 LOCAL DO EXPERIMENTO

As etapas referentes à avaliação ginecológica das novilhas, sincronização dos estros, administração dos tratamentos, abate das fêmeas, isolamento e congelamento dos explantes endometriais foram realizados no Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM) do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA), sediado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na cidade de Pirassununga/SP. A execução da técnica de Eletroforese Unidimensional foi realizada no Laboratório de Morfofisiologia da Placenta e Embrião (L@MPE), sediado na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Dracena/SP. A análise dos géis por programas computacionais

específicos foi realizada no Laboratório de Neurociência e Proteômica, da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga/SP.

2.3 SINCRONIZAÇÃO DOS ESTROS

Para a indução dos estros, as novilhas receberam 150µg de D-cloprostenol (N.C.Preloban® - Intervet), via intramuscular. O dia de início da aceitação de monta foi considerado como o D0. No D6 foi realizado um exame ultra-sonográfico (Aparelho ALOKA modelo SSD-500; equipado com transdutor linear de 7,5 MHz) e as fêmeas que apresentavam um folículo dominante $\geq$ 7,5mm receberam uma injeção de 100µg de gonadorelina, um GnRH sintético (Fertagil®-Intervet), via intramuscular, com o objetivo de induzir a ovulação do folículo dominante e promover a emergência de uma nova onda folicular. Para a verificação da presença de um corpo lúteo acessório foi realizado exame ultra-sonográfico (Aparelho ALOKA modelo SSD-500; equipado com transdutor linear de 7,5 MHz) no 16º dia do ciclo.

2.4 TRATAMENTO *IN VIVO*

Novilhas pareadas de acordo com a data de apresentação dos estros foram, no 17º dia do ciclo estral, não tratadas (Grupo Controle; n=6) ou tratadas via intravenosa com 3mg de E₂ (Grupo E₂; n=6) e abatidas duas horas após o tratamento. As fêmeas foram abatidas por concussão cerebral por meio do uso de pistola pneumática. Imediatamente após o abate, o sistema reprodutor foi isolado e transportado ao laboratório a 4°C.

2.5 ISOLAMENTO E CONSERVAÇÃO DOS EXPLANTES ENDOMETRIAIS

No laboratório, os úteros foram apoiados sobre uma superfície contendo gelo recoberto com uma membrana de “parafilm”, de maneira que todo o processamento dos tecidos fosse procedido a 4°C. Tal procedimento objetivou reduzir ao máximo as possíveis perdas de proteínas nas estruturas uterinas. Posteriormente foi procedida a limpeza, com gaze e solução fisiológica, da camada serosa do útero para a remoção dos restos de sangue. Em capela de fluxo laminar, com o auxílio de pinça e tesoura cirúrgica, foi realizada uma secção longitudinal na face mesometrial, do corpo e cornos uterinos, de maneira que o endométrio ficasse totalmente exposto. Em seguida, o endométrio foi isolado do miométrio. Os fragmentos de endométrio foram isolados da região inter-caruncular, do corpo e ambos os cornos uterinos. Os explantes endometriais foram acondicionados em placas de Petri contendo Meio Bicarbonato Krebs-Henseleit [KHB; NaCl 118mM, KCl 4,7mM, CaCl₂ 2,56mM, MgCl₂ 1,13mM, NaHCO₃ 25mM, NaH₂PO₄ 1,15mM, glicose 5,55mM, Hepes 20mM e vermelho fenol 0,013mM; pH 7,4]. No mesmo meio, os explantes foram submetidos a quatro lavagens consecutivas. Posteriormente, os fragmentos endometriais de um mesmo animal foram reunidos de maneira que formassem um “pool” de cada animal. Posteriormente, esses fragmentos foram acondicionados em criotubos devidamente identificados e, então, imediatamente armazenados a -20°C.

2.6 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DO TECIDO ENDOMETRIAL

Os explantes endometriais foram descongelados a 4°C e posteriormente um “pool” de fragmentos de cada animal foi pesado. Para cada 2 gramas de endométrio foram acrescentados 10mL de solução para a extração de proteínas (EDTA 1mM; EGTA 1mM; DTT 1mM; PMSF 0,5mM; NaCl 300mM; NP-40 1%; Tris 50mM pH 8,0; Glicerol 10%; Aprotinina 10µg/mL; Leupeptina 10µg/mL e

Pepstatina 10µg/mL). Tal mistura, contendo os fragmentos endometriais e a solução de extração em volume proporcional, foi colocada em um tubo de vidro e os fragmentos foram submetidos à maceração com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (Marca HEIDOLPH RZR, Modelo 2021) com velocidade de 1200rpm, até que as estruturas teciduais fossem completamente desintegradas. A solução contendo o macerado foi centrifugada a 800g a 4°C, durante 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e submetido a uma segunda centrifugação a 15000g a 4°C, durante 20 minutos. A seguir, o sobrenadante foi removido, acondicionado em microtubos e armazenado a -20°C.

2.7 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas totais contidas nas diferentes amostras de extratos endometriais foi estimada pelo Método de Bradford (BRADFORD, 1976). Para tanto, foi construída uma curva padrão contendo soluções com 0, 200, 400, 600, 800 e 1000µg de Albumina Sérica Bovina (BSA) diluída na solução de extração de proteínas utilizada no presente estudo (EDTA 1mM; EGTA 1mM; DTT 1mM; PMSF 0,5mM; NaCl 300mM; NP-40 1%; Tris pH 8,0 50mM; Glicerol 10%; Aprotinina 10µg/mL; Leupeptina 10µg/mL e Pepstatina 10µg/mL). As referidas soluções foram utilizadas em um volume de 20µL. Para as amostras foram utilizados um volume de 20µL, nas quais as amostras originais foram diluídas em uma proporção de 1:8, 1:12 ou 1:16. Utilizou-se uma diluição que possibilitasse que a leitura em absorvância alcançasse o ponto médio da curva padrão contendo BSA. Posteriormente, 1000µL do Reagente de Bradford (Marca Amresco E530), devidamente diluído na proporção de 1mL de reagente para cada 4mL de água Milli-Q®, foi adicionado a cada microtubo contendo as soluções de curva e as amostras a serem quantificadas. O reagente de Bradford contém como seu principal componente o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 em solução ácida, este ao ligar-se às proteínas, tem a sua absorvância alterada de 465nm para 595nm. Esta interação entre o corante Coomassie com a proteína estabiliza a

forma aniônica do corante, causando uma visível mudança de coloração inicialmente castanha para tons de azul, de acordo com a concentração da proteína (BRADFORD 1976). Segundo Saut et al, (2009), a determinação dos teores séricos de proteína total de soro sangüíneo de vacas Holandesas foi feita pelo método do Biureto. Hill et al, (2007) por meio da quantificação de proteínas totais séricas de bezerras holandesas com 30 horas de vida, também trabalharam com o método de Biureto. Já Niemeyer et al, (2007) para a quantificação de proteína do fluído luminal uterino de fêmeas bovinas, foram realizados por meio do método de Bradford. Tais misturas, contendo as soluções da curva e as amostras a serem quantificadas, foram submetidas ao vórtex durante 10 segundos. Finalizada a homogeneização da última amostra, após 5 minutos foi procedida a leitura das amostras em espectrofotômetro a 595nm. Após a leitura os dados foram transferidos para o Excel, lançando a seguinte equação $y = a + bx$ além do r^2 . As leituras de absorvância mensuradas nas amostras, com quantidades desconhecidas de proteínas, substituíram o y nesta equação, onde o valor determinado de x foi considerado a concentração de proteína na amostra diluída, a o intercepto e b o coeficiente angular. A partir da mensuração de proteínas contidas na amostra diluída, a concentração foi multiplicada pelo fator de diluição, determinando a quantidade de proteínas totais ($\mu\text{g/mL}$) contidas na amostra original.

2.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Extratos protéicos obtidos de explantes endometriais de fêmeas bovinas, não tratadas (Grupo Controle; $n=6$) ou tratadas via intravenosa com 3mg de E_2 (Grupo E_2 ; $n=6$) no 17º dia do ciclo estral tiveram as concentrações de proteínas totais mensuradas pelo Método de Bradford. Amostras foram submetidas à técnica de eletroforese unidimensional em Gel de Poliacrilamida 10% com SDS-PAGE para a determinação das bandas protéicas constituintes das amostras e seus respectivos pesos moleculares. Para os géis foi utilizado um padrão de peso molecular RPN800E (GE Healthcare) contendo um

conjunto de dez proteínas com os seguintes pesos moleculares: 225; 150; 102; 76; 52; 38; 31; 24; 17 e 12 kDa. A quantidade de proteína total administrada em cada ponto de aplicação de eletroforese foi de 40µg e 20µg, para os géis posteriormente corados com Coomassie Blue e Nitrato de Prata, respectivamente. Os géis foram confeccionados em triplicata para serem corados pelo Nitrato de Prata e em quadruplicata para serem corados pela coloração de Coomassie Blue Brilhante.

2.9 ELETROFORESE UNIDIMENSIONAL

Para o gel de separação foi elaborada uma solução contendo 8,34mL de água ultra pura (Milli-Q®); 5mL de solução com 1,5 M de Tris HCl com pH 8,8; 204µL de SDS a 10%; 6,6 mL de uma solução contendo 30% de Acrilamida e 2,67% de Bis-acrilamida; 100µL de Persulfato de Amônio a 10% e 10µL de TEMED. Tal solução foi devidamente homogeneizada e transferida para a placa de eletroforese. A solução contida na parte superior do gel, em contato com o ar, foi recoberta com uma solução contendo 50% de Butanol. A placa permaneceu em repouso durante 60 minutos, período requerido para a polimerização do gel. Após este período, a solução contendo 50% de Butanol, depositada sobre o gel, foi desprezada e a extremidade do gel em contato com o ar foi cuidadosamente seca com papel filtro. Para o preparo do gel de empilhamento utilizou-se 6,1mL de água Milli-Q®; 2,5mL de solução contendo 0,5M de Tris HCl com pH 6,8; 100µL de SDS a 10%; 1,33mL de solução contendo 30% de Acrilamida e 2,67% de Bis-acrilamida; 50µL de Persulfato de Amônio a 10% e 10µL de TEMED. O gel de empilhamento foi colocado sobre o gel de separação e um “pente” contendo capacidade para a formação de dez poços foi posicionado na parte superior da placa de eletroforese. Após este procedimento, aguardou-se 60 minutos para que houvesse a polimerização do mesmo. Imediatamente após a polimerização, o pente foi retirado e a extremidade do gel contendo os poços, em contato com o ar, foi ligeiramente seca com um papel filtro. As amostras foram aplicadas nos respectivos poços

em um volume final de 20 μ L, sendo 10 μ L da amostra e 10 μ L de corante da amostra (8mL de SDS a 10%, 8mL de Glicerol 50%, 1mL de Bromofenol Blue a 1%, 1mL de Tampão Tris HCl 125mM e 10% de β -mercaptoetanol). Para os géis que foram corados com Coomassie Blue, utilizou-se 40 μ g de proteína total no volume de 10 μ L da amostra. Para os géis que foram corados com Nitrato de Prata, utilizou-se 20 μ g de proteína total no volume final de 10 μ L da amostra. Após o preparo das amostras junto ao corante da amostra, as mesmas foram expostas à temperatura de 100°C durante 4 minutos, dentro de um Backer contendo água sob a condição de fervura, este apoiado em placa aquecedora. As amostras foram aplicadas nos respectivos poços. A corrida eletroforética foi realizada a 220W, 100mA, durante 3 horas (MiniV-E GE HealthCare)

2.10 COLORAÇÃO COM COOMASIE BLUE

Posteriormente à corrida, os géis de poliacrilamida foram cuidadosamente retirados das placas e imediatamente imersos em Solução Corante de Coomassie Blue (0,1g de Coomassie Blue; 40mL de etanol; 10mL de ácido acético; completando para um volume final de 100mL com H₂O Milli-Q®), durante 30 minutos, sobre plataforma agitadora. Após este período, os géis foram mergulhados em Solução Descorante (4mL de metanol; 10mL de ácido acético; completando para um volume final de 100mL com H₂O Milli-Q®), até que os mesmos fossem escaneados.

2.11 COLORAÇÃO COM NITRATO DE PRATA

Posteriormente à corrida, os géis de poliacrilamida foram cuidadosamente retirados das placas e imediatamente mergulhados em Solução Fixadora (10mL de “Silver Fixing Solution”, 100mL de Metanol, 20mL de ácido acético glacial e 70mL de água Milli-Q®), durante 30 minutos. Em seguida, os géis foram mergulhados em água Milli-Q®, e sofreram seis

lavagens consecutivas de 1 hora/cada em água Milli-Q®. Transcorrido o tempo de 6 horas, os géis foram mergulhados em uma solução de 0,001% DL-Ditiotreitol durante 40 minutos. Em seguida, os géis foram imersos em solução Corante e Reveladora (Kit Rapid Silver Staining, Sigma®; 35mL de água Milli-Q®; 5mL de solução de Nitrato de Prata e Nitrato de Amônio; 5mL de Ácido Tungstosilícico; 5mL de solução de Formaldeído, 50mL de solução de Carbonato de Sódio e H₂O Milli-Q® para completar volume final de 150mL) durante 30 minutos. Após este período, os géis foram imersos em Solução Descorante (10mL de ácido acético glacial e 180mL de água Milli-Q).

2.12 AVALIAÇÃO DA DENSITOMETRIA

Os géis foram escaneados pelo programa ImageScanner PowerLook 1120 (Amersham Biosciences). Com o uso do programa ImageMaster Platinum versão 6.0 (Amersham Biosciences) foram identificadas as bandas protéicas com pesos moleculares e posições relativas similares, inter e intra géis. Tais bandas protéicas foram nomeadas pelo peso molecular médio que obtiveram em todos os géis. Para cada amostra a densidade óptica absoluta de cada banda foi medida no local de intensidade máxima de pixels, e as densidades ópticas absolutas de todas as bandas foram somadas de forma a obter-se a densidade óptica total da amostra. A densidade óptica relativa percentual de cada banda foi então calculada pela divisão de sua densidade óptica absoluta pela densidade óptica total da amostra e o resultado multiplicado por 100.

2.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Realizou-se uma análise comparativa da concentração total de proteínas dos explantes endometriais no grupo controle e grupo tratado com E₂. Foi estimada a média e o erro padrão da média por meio do programa GraphPad

InStat Versão 3.0. Na ocorrência de diferença significativa ($p < 0,05$), foi utilizado o Teste *t* de Student.

Foram realizadas análises descritivas para as variáveis percentagens das bandas (P_BANDAS) e Peso Molecular (PES_MOL) relacionadas às avaliações obtidas por eletroforese. As análises descritivas foram realizadas por meio de procedimento PROC MEANS do programa *Statistical Analysis System*, versão 9.1.3 (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE, 1998). Conforme recomendações de Banzatto e Kronka (2006) para a porcentagem das bandas (P_BANDAS) foi utilizada a transformação de escala dos dados para “arco-seno raiz da porcentagem” (ASPBANDA), procedendo-se à análise de variância e os demais procedimentos com os dados transformados. Para apresentação dos resultados, os dados foram retornados à escala original.

Para avaliação das percentagens das bandas em escala original (P_BANDAS) e transformada (ASPBANDA), bem como para o Peso Molecular (PES_MOL), segundo os diferentes grupos comparativos, utilizou-se o procedimento PROC MIXED do programa *Statistical Analysis System*, versão 9.1.3 (SAS, 1995).

No modelo estatístico, foi considerado o efeito principal do gel, tratamento e o efeito das avaliações serem repetidas nos mesmos animais. Nestas análises adotou-se o seguinte modelo estatístico ($y_{ijkl} = \mu + a_i + g_j + t_k + e_{ijkl}$), onde y_{ijkl} refere-se a percentagem da banda, em escala original (P_BANDAS), ou transformada (ASPBANDA) ou Peso Molecular (PES_MOL) do animal i , no gel j , do tratamento k , na repetição l . No modelo, μ refere-se à constante inerente a todas as observações; a_i ao efeito aleatório do animal i , com média 0 e variância $\sigma^2_{a_i}$; g_j ao efeito fixo j -ésimo gel, sendo $j = 1$ ou 2 , (para a coloração Coomassie Blue ou Nitrato de prata). No modelo, t_k refere-se ao efeito fixo k -ésimo tratamento, sendo $k = 1$ (controle) ou 2 (tratado com estradiol). Finalmente, e_{ijkl} refere-se ao efeito aleatório residual associado à percentagem de bandas em escala original (P_BANDAS) ou transformada (ASPBANDA) ou Peso Molecular (PES_MOL) do animal i , no gel j , do tratamento k , na repetição l , com média 0 e variância σ^2_e . Quando foram verificados resultados significativos ($p < 0,05$) para fonte de variação

“tratamentos”, foi utilizado como procedimento de comparação múltipla o Teste *t* de *Student*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- EFEITO DO ESTRADIOL NO INCREMENTO DE PROTEÍNAS TOTAIS EM EXPLANTES ENDOMETRIAIS

As soluções com concentrações crescentes de BSA ($\mu\text{g/mL}$), possibilitaram a determinação de uma equação ($y = 0,0009x + 0,0405$) com o $r^2=0,9912$ (Figura 1). A quantificação das proteínas totais existentes nos extratos endometrias dos animais não tratados ($n=6$) ou tratados com 3mg de 17β -estradiol ($n=6$) foi realizada em único ensaio. Todas as amostras foram quantificadas em triplicata com o objetivo de gerar maior confiabilidade na estimativa das mensurações. Para a determinação da concentração de proteínas totais presentes nas amostras dos explantes endometriais, determinou-se como fator de diluição ideal das amostras, aquele no qual a leitura de absorvância localizasse no meio da curva, ou seja, entre 0,4 e 0,6 unidades de absorvância. Deve-se considerar que as amostras diluídas, de maneira que a leitura em absorvância coincida com o valor de absorvância do segmento central da curva padrão de proteínas, geram maior confiabilidade na mensuração. No presente estudo, o fator de diluição utilizado para que as leituras de absorvância se localizassem no meio da curva foi de 1:8, 1:12 ou 1:16, dependendo da amostra a ser mensurada.

As médias e erro padrão da média das concentrações de proteínas totais nos explantes endometriais foram de $6296 \pm 440\mu\text{g/mL}$ para o grupo controle e $8426 \pm 1156\mu\text{g/mL}$ para o grupo E_2 (Figura 2). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias ($p > 0,05$).

As concentrações protéicas dos extratos de explantes endometriais variaram entre os animais de um mesmo grupo, e foram de 4678,22 a 7973,33 $\mu\text{g/mL}$ para o grupo controle e de 5428,00 a 11351,56 $\mu\text{g/mL}$ no grupo E_2 (Tabela 1).

3.2- EFEITO DO ESTRADIOL NA MODIFICAÇÃO DA COMPOSIÇÃO PROTÉICA DE EXPLANTES ENDOMETRIAIS

3.2.1 Caracterização do peso molecular das proteínas contidas nas amostras e da porcentagem representativa de cada proteína em relação à proteína total

Na realização da corrida de eletroforese unidimensional, as amostras obtidas dos animais pertencentes ao grupo controle (n= 6; designadas C1, C2, C3, C4, C5, C6) e grupo E₂ (n= 6; designadas E1, E2, E3, E4, E5, E6) foram divididas equitativamente em dois géis. Considerando que cada gel permitia a aplicação e corrida eletroforética de dez amostras, no Gel 1 foram aplicadas as amostras C1, E1, C2, E2, C3, E3; e no Gel 2 foram aplicadas às amostras C4, E4, C5, E5, C6, E6. Desta forma, na mesma corrida eletroforética foram confeccionados simultaneamente o Gel 1 e 2. Na Figura 3, está representada uma repetição de quatro, dos géis submetidos à coloração com o Coomassie Blue (Gel 1A) e (Gel 2A). Na Figura 4, está representada uma repetição de três, dos géis submetidos à coloração com Nitrato de Prata (Gel 1B) e (Gel 2B).

O padrão de peso molecular utilizado na elaboração dos géis foi o RPN800E (GE Healthcare) que continha um conjunto de dez proteínas de pesos moleculares conhecidos (225, 150, 102, 76, 52, 38, 31, 24, 17, 12kDa). No presente estudo, verificou-se que as proteínas de baixo peso molecular contidas no PPM não tiveram uma boa definição de banda. Possivelmente, esta baixa definição decorreu em razão da concentração de 10% de acrilamida. Sabe-se que tal concentração prioriza a melhor separação das proteínas de alto peso molecular e desfavorece a separação das proteínas de baixo peso molecular. Em experimentos prévios, foram testadas as concentrações de 10, 12 e 14% de acrilamida para os extratos de explantes endometriais, onde observou-se que a concentração de 10% favoreceu o aparecimento de um maior número de bandas e com melhor definição.

A proteína marcadora com o peso molecular de 24kDa foi observada em alguns dos géis, enquanto as proteínas marcadoras de 17 e 12kDa não foram visualizadas em todos os géis. Sendo assim, para a determinação das proteínas marcadoras de peso molecular, ao programa de interpretação dos géis foram utilizadas apenas as proteínas com 225, 150, 102, 76, 52, 38 e 31kDa.

O número de bandas verificadas nas amostras protéicas coradas com Coomassie Blue diferiu entre os animais pertencentes a um mesmo grupo de tratamento. Desta maneira para fins estatísticos, foram comparadas as bandas do animal que apresentou o menor número de bandas formadas, descartando as bandas excedentes das demais. Niemeyer et al. (2007) avaliaram o perfil protéico de lavados uterinos em fêmeas bovinas cíclicas e prenhas nos dias 14, 16 e 18 depois do estro. Os mesmos autores relataram a identificação de 31 bandas protéicas diferentes, entretanto, seguindo os mesmos critérios utilizados no presente estudo, somente 21 bandas protéicas foram analisadas.

Durante a análise computacional da densitometria dos géis, corados com Coomassie Blue e Nitrato de Prata, foi gerado um gráfico com diversos picos, onde cada um representava uma determinada banda. A determinação dos picos possibilitou estimar a porcentagem relativa de cada banda em relação a quantidade de proteína total da amostra. Na Figura 5 estão representados os picos para os géis corados com Coomassie Blue e na Figura 6 para os géis corados com Nitrato de Prata.

Na Figura 7, encontram-se as médias das porcentagens das 18 bandas identificadas nos géis 1A e 2A; quando submetidos à coloração com Coomassie Blue. Não houve diferença estatística significativa ($p>0,05$) entre animais controles ou tratados com estradiol. Na Tabela 2 estão representadas as porcentagens relativas de cada banda identificada nas amostras e seus respectivos pesos moleculares em kDa. Verificou-se a presença de 18 bandas nos géis corados com Coomassie Blue.

Na Figura 8, encontram-se as médias da porcentagem das 12 bandas formadas nos géis 1B e 2B; corados com Nitrato de Prata. Com relação à porcentagem relativa das bandas, verificou-se diferença estatisticamente

significativa ($p < 0,05$) em três bandas, sendo elas as de número 6, 8 e 10. Os valores para a porcentagem das bandas 6, 8 e 10 foram de 3,84%; 9,83% e 4,89% para os animais do grupo controle e 6,85%; 5,78% e 8,40% para os animais do grupo tratados com E_2 , respectivamente. Na Tabela 3 também se encontram sumarizados os pesos moleculares das 12 bandas no gel corado com Nitrato de Prata. Em relação aos pesos moleculares das bandas 6; 8 e 10, identificou-se os pesos de 110; 90 e 76kDa para o grupo controle e 108; 90 e 75kDa para o grupo E_2 .

No presente estudo, embora o E_2 não tenha incrementado a síntese de proteínas endometriais, o mesmo alterou o perfil protéico dos explantes endometriais. A banda de número 6 apresentou maior porcentagem relativa no grupo E_2 em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$). Estima-se para a banda 6, um peso molecular de aproximadamente 108kDa. Sugere-se que tal proteína possa se referir a PLA2G4A, proteína integrante da cascata de formação da $PGF_{2\alpha}$. Tal sugestão poderá ser confirmada em estudo posterior, no qual serão aplicados nas mesmas amostras anticorpos específicos para a PLA2G4A pelo emprego da técnica de Western Blotting, técnica quantitativa e qualitativa.

Godkin et al. (2008), realizaram um estudo em que verificaram o papel da PLA2 na regulação da produção de $PGF_{2\alpha}$ em células endometriais bovinas BEND. Analisando as proteínas obtidas dos extratos celulares por Western Blotting, observaram que o anticorpo PLA2G4A reconhece uma proteína com aproximadamente 110kDa e uma proteína de massa ligeiramente inferior, de aproximadamente 107kDa, que pode ter sido um produto de sua degradação. Burns et al. (2000) observaram em fêmeas ovinas, que a síntese aguda de $PGF_{2\alpha}$ induzida por ocitocina, não teve efeito algum nas concentrações endometriais de RNAm para a proteína PLA2. Burns et al. (2000), verificou que a PLA2 foi identificada como uma proteína com peso molecular de aproximadamente 100-110kDa.

No presente estudo verificou-se uma diferença na quantidade de bandas identificadas no gel corado com Coomassie Blue comparada ao gel corado com Nitrato de Prata. De fato, Berg et al. (2004) sugeriu que a coloração com Coomassie Blue detecta as proteínas existentes em uma amostra com

concentração mínima de 0,1µg, enquanto a coloração com Nitrato de Prata detecta proteínas com concentração a partir de 0,02µg, o que a torna uma coloração mais sensível. Entretanto, a coloração por Nitrato de Prata, apresenta como desvantagem um custo mais elevado dos reagentes utilizados em relação à coloração por Coomassie Blue.

Segundo Tithof et al. (2007), ao avaliarem as distintas enzimas PLA2 na regulação da produção de PGE₂ e PGF_{2α} em células epiteliais do endométrio bovino, verificaram que a OT estimulou a produção de PGF_{2α} em cinco vezes e a de PGE₂ em duas vezes. Entretanto, quando utilizaram o Bromoenol lactone (BEL), um inibidor da PLA2G6, verificaram que o efeito da ocitocina na produção de PGF_{2α}, foi completamente abolido. verificou-se pouco efeito sobre a produção de PGF_{2α} enquanto a produção de PGE₂ não foi comprometida.

Alavi-Shoushtari et al. (2008) estudaram as variações das proteínas uterinas durante o ciclo estral em vaca por meio da coleta de fluído luminal submetida à técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% SDS-PAGE. Os mesmos autores verificaram que uma banda de 85kDa não foram encontradas no diestro, sofreu redução em estro de 10,5% para 9,5% e aumentaram em metaestro de 9,5% para 10,2%.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que não houve efeito do estradiol no incremento da concentração de proteínas totais no endométrio. Nos géis submetidos à coloração com nitrato de prata houve modificações na composição protéica dos explantes endometriais de fêmeas bovinas tratadas com E₂ no 17º dia do ciclo estral, que apresentou uma maior percentagem relativa das bandas com peso molecular de 75 a 76kDa e 108 a 110kDa e menor percentagem relativa da banda referente ao peso molecular de 90kDa.

5. REFERÊNCIAS

ALAVI-SHOUSHTARI, S.M.; ASRI-REZAI, S.; ABSHENAS, J. A Study of the uterine protein variations during the estrous cycle in the cow: molecular weights determinarion. **Animal Reproduction Science**, v. 105, n. 314, p. 302-310, 2008.

BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. **Experimentação agrícola**. 4.ed. Jaboticabal/SP: FUNEP, 2006. 237 p.

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. **Bioquímica**, 5. Ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 1059p.

BERTAN, C.M. **Mecanismos endócrinos e moleculares pelos quais o estradiol estimula a síntese de prostaglandina $F_{2\alpha}$ no endométrio de fêmeas bovinas**. 2004. 179 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BURNS, P.D.; GRAF, G.A.; HAYES, S.H.; SILVA, W.J. Effect of oxytocin on expression of cytosolic phospholipase A_2 mRNA and protein in ovine endometrial tissue *in vivo*. **Domestical Animal Endocrionology**, v. 19, n. 4, p. 237-246, 2000.

CASTRO E PAULA, L. A. **As funções do estradiol no processo da luteólise em bovinos: o papel da ocitocina na produção de $PGF_{2\alpha}$** . 2003. 202 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

CUNHA, P. M. **O estímulo do estradiol na produção de PGF2 α 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.

GODKIN, J.D.; ROBERTS, M.P.; ELGAYYAR, M.; GUAN, W.; TITHOF, P.K. Phospholipase A2 regulation of bovine endometrial (BEND) cell prostaglandin production. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 6, p. 44, 2008.

HILL, J.A.G.; COSTA, D.W.; CASTRO, M.E.F.; HARTMANN, W.; BENESI, F.J. **Proteína total, proteinograma eletroforético e gamaglutamiltransferase de bezerras com 30 horas de vida no município de campo largo, Paraná.** Revista Academica, Curitiba, v. 5, n.3, p. 295-301, 2007.

HUGHES, T. L.; VILLA-GODOY, A.; KESNER, J.S.; FOGWELL, R.L. Destruction of bovine ovarian follicles: effects on the pulsatile release of luteinizing hormone and prostaglandin F2 α -induced luteal regression. **Biology of Reproduction**, v.36, n. 3, p.523-529, 1987.

NIEMEYER, C.; SIQUEIRA, A.F.P.; GIASSETTI, M.I.; PONTES, E.O.; FEDOZZI, F.; LIMA, M.C.; BERTAN, C.M.; ARRUDA, R.P.; MIGLINO, M.A.; BINELLI, M. Protein profile of uterine washing of cyclic and pregnant cow from days 14 to 18 post-estrus. **Animal. Reproduction**, v.4, n3/4, p.77-87, 2007.

PRITCHARD, 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.

SAUT, J. P. E.; MIYASHIRO, S. I.; RAIMONDO, R. F. S.; JUNIOR, E. H. B. **Influência do período pós-parto no proteinograma de vacas holandesas, obtido através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida.** Anais

do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria, Ciência Animal Brasileira – Suplemento 1, p.244-249, 2009.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. SAS user's guide: statistic. Release 6.03. Cary, NC: SAS, 1998. 1CD-ROM.

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-17 β on peripheral plasma concentration of 15-keto-13,14-dihydro PGF_{2 α} and luteolysis in cyclic cattle. **Prostaglandins**, v.31, n.4, p.745-759, 1986.

TITHOF, P.K.; ROBERTS, M.P.; GUAN, W.; ELGAYYAR, M.; GODKIN, J.D. Distinct phospholipase A2 enzymes regulate prostaglandin E2 and F2 α production by bovine endometrial epithelial cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.5, p.16, 2007.

FIGURAS

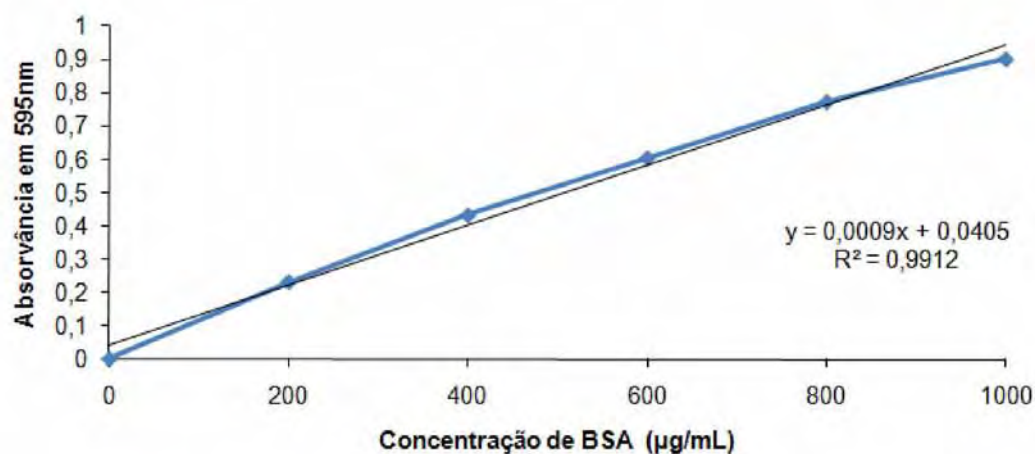


Figura 1. Curva com diferentes concentrações de BSA (0, 200, 400, 600, 800 e 1000µg/mL) estimadas pelo Método de Bradford a uma absorvância de 595nm, ilustrando o r^2 e a equação da reta utilizada para a mensuração das concentrações de proteínas totais contidas nas amostras de extratos obtidos de explantes endometriais de novilhas não tratada (Grupo Controle; n=6) ou tratadas via intravenosa 3mg de 17β-estradiol (Grupo E₂; n=6), no 17º dia do ciclo estral.

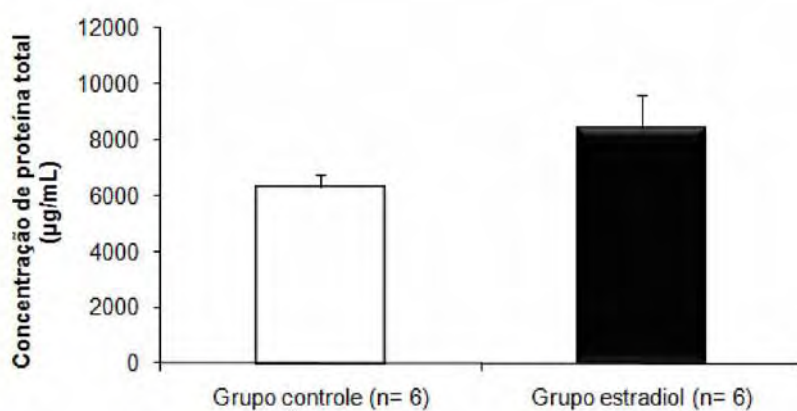


Figura 2. Média e erro padrão da média da quantidade de proteína total mensurada em extratos obtidos de explantes endometriais de novilhas não tratada (Grupo Controle; n=6) ou tratadas via intravenosa 3mg de 17 β -estradiol (Grupo E₂; n=6) no 17º dia do ciclo estral

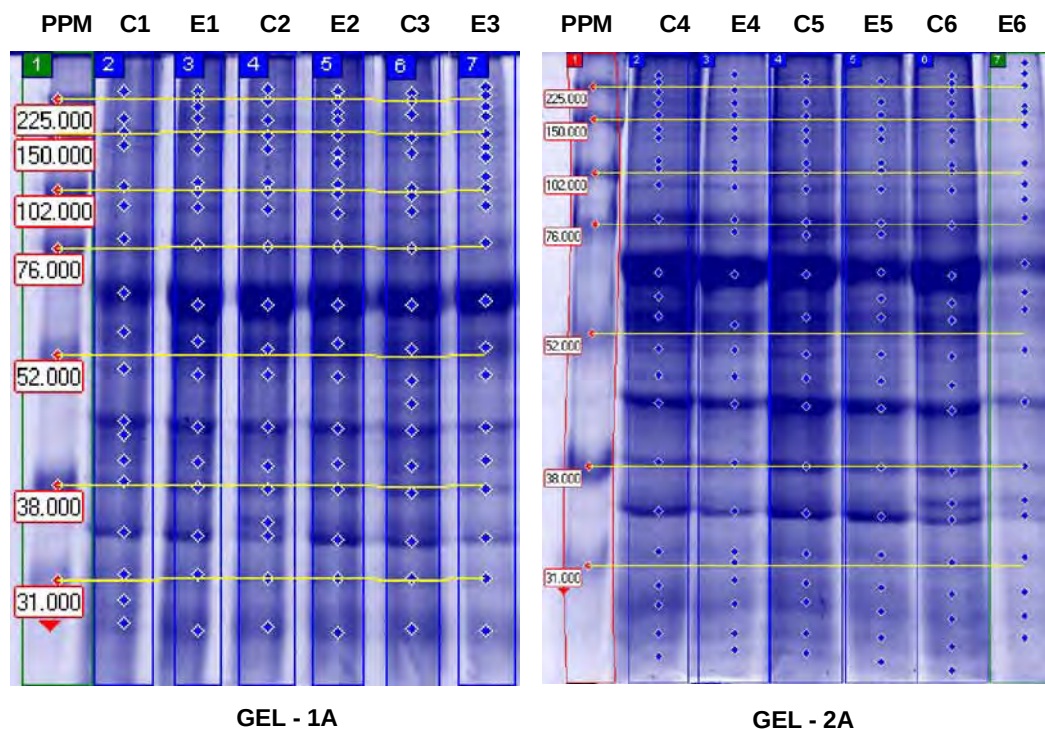


Figura 3. Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida 10% SDS-PAGE corado com Coomassie Blue. GEL 1A: Padrão de Peso Molecular (PPM) onde os pontos vermelhos referem-se respectivamente aos pesos: 225, 150, 102, 76, 52, 38, 31kDa, estando ausentes os pesos 24, 17 e 12 kDa (**Linha 1**); Animal C1 (**Linha 2**); Animal E1 (**Linha 3**); Animal C2 (**Linha 4**); Animal E2 (**Linha 5**); Animal C3 (**Linha 6**) e Animal E3 (**Linha 7**). Foram aplicados 40µg de proteínas totais extraídas de explantes endometriais obtidos de novilhas mestiças não tratadas (Animal C1, C2 e C3; Grupo Controle) e tratadas com 17β-estradiol (Animal E1, E2 e E3; Grupo E₂) no 17º dia do ciclo estral. **GEL 2A:** PPM no qual os pontos vermelhos referem-se respectivamente aos pesos: 225, 150, 102, 76, 52, 38, 31kDa, estando ausentes os pesos 24, 17 e 12 kDa (**Linha 1**); Animal C4 (**Linha 2**); Animal E4 (**Linha 3**); Animal C5 (**Linha 4**); Animal E5 (**Linha 5**); Animal C6 (**Linha 6**) e Animal E6 (**Linha 7**). Foram aplicados 40µg de proteínas totais extraídas de explantes endometriais obtidos de novilhas mestiças não tratadas (Animal C4, C5 e C6; Grupo Controle) e tratadas com 17β-estradiol (Animal E4, E5 e E6; Grupo E₂) no 17º dia do ciclo estral - representativo de 4 (quatro) repetições

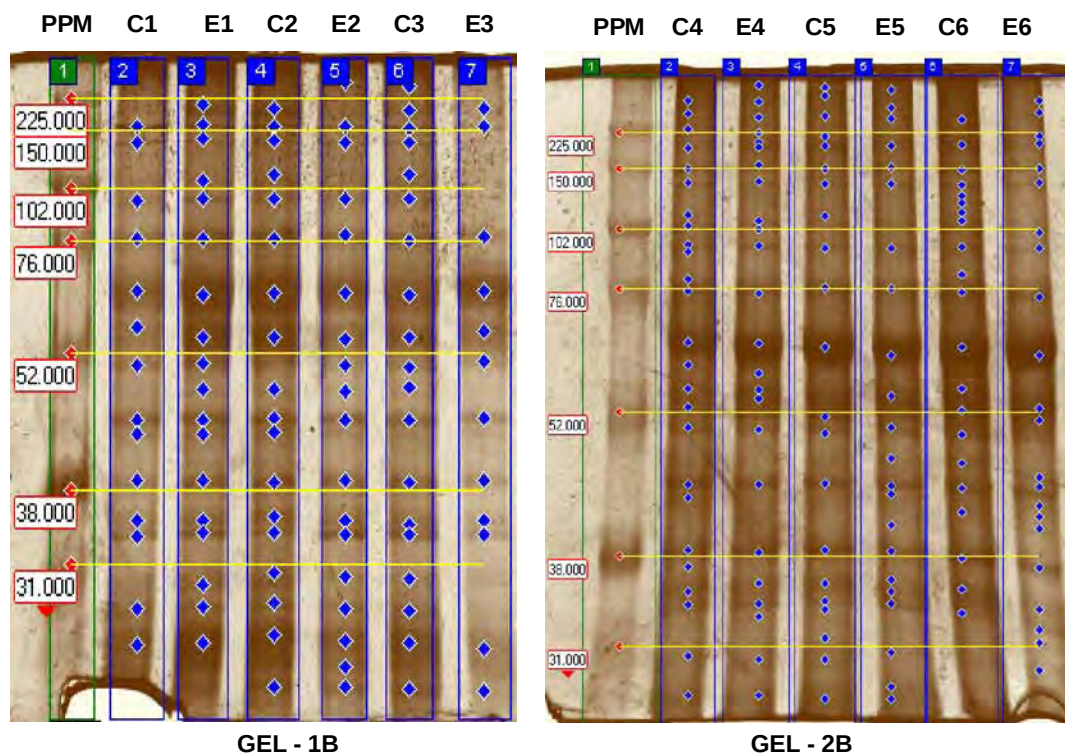


Figura 4. Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida 10% SDS-PAGE corado com Nitrato de Prata. GEL 1B: Padrão de Peso Molecular (PPM) onde os pontos vermelhos referem-se respectivamente aos pesos: 225, 150, 102, 76, 52, 38, 31kDa, estando ausentes os pesos 24, 17 e 12 kDa (**Linha 1**); Animal C1 (**Linha 2**); Animal E1 (**Linha 3**); Animal C2 (**Linha 4**); Animal E2 (**Linha 5**); Animal C3 (**Linha 6**) e Animal E3 (**Linha 7**). Foram aplicados 10 μ g de proteínas totais extraídas de explantes endometriais obtidos de novilhas mestiças não tratadas (Animal C1, C2 e C3; Grupo Controle) e tratadas com 17 β -estradiol (Animal E1, E2 e E3; Grupo E₂) no 17º dia do ciclo estral. **GEL 2B:** PPM no qual os pontos vermelhos referem-se respectivamente aos pesos: 225, 150, 102, 76, 52, 38, 31kDa, estando ausentes os pesos 24, 17 e 12 kDa (**Linha 1**); Animal C4 (**Linha 2**); Animal E4 (**Linha 3**); Animal C5 (**Linha 4**); Animal E5 (**Linha 5**); Animal C6 (**Linha 6**) e Animal E6 (**Linha 7**). Foram aplicados 10 μ g de proteínas totais extraídas de explantes endometriais obtidos de novilhas mestiças não tratadas (Animal C4, C5 e C6; Grupo Controle) e tratadas com 17 β -estradiol (Animal E4, E5 e E6; Grupo E₂) no 17º dia do ciclo estral - representativo de 3 (três) repetições

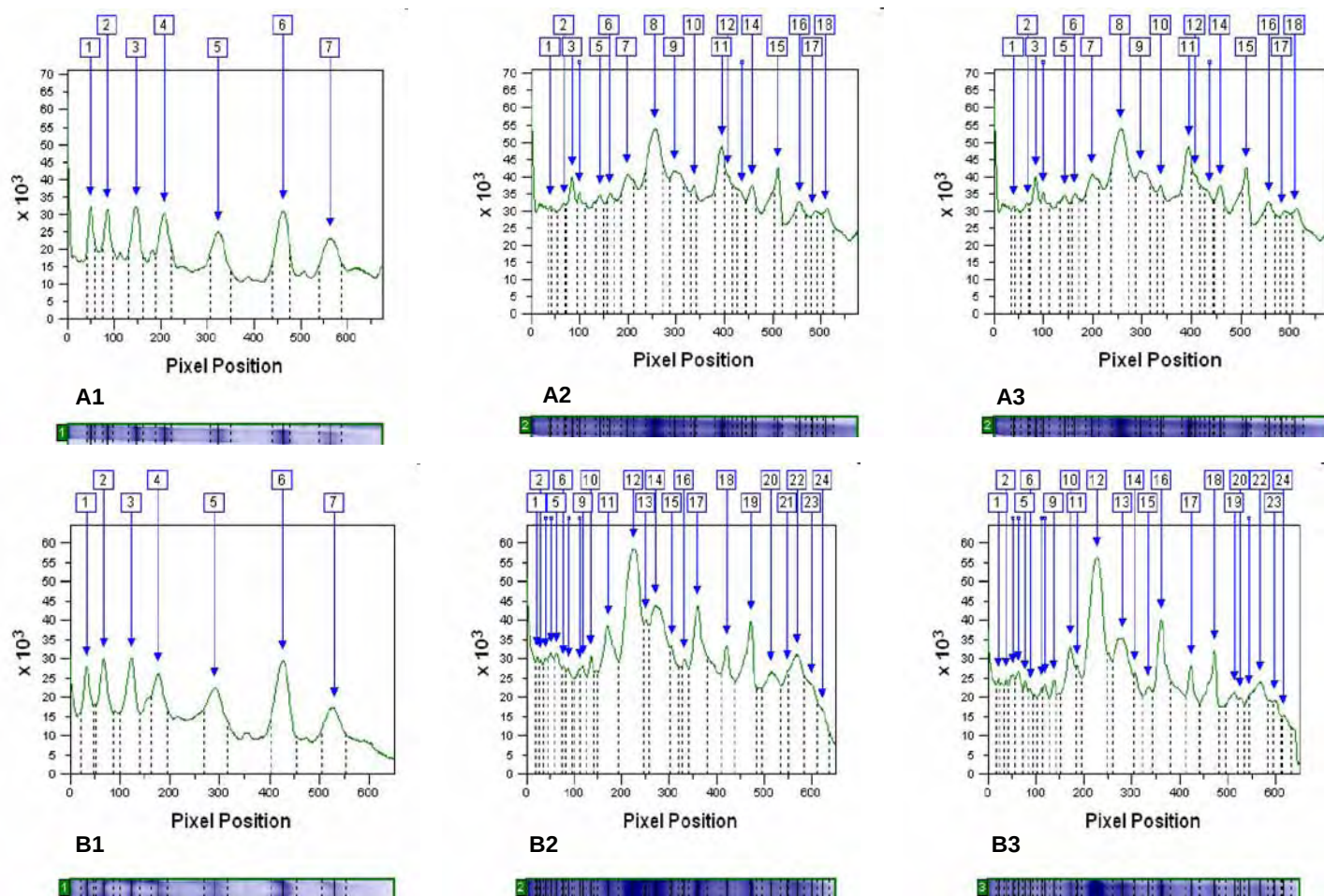


Figura 5. Análise computacional dos géis de eletroforese unidimensional identificando cada pico como uma proteína (em peso molecular) e a espessura do pico como a quantidade de proteína (porcentagem de banda), **A1 e B1** – representativo do padrão de peso molecular do gel corado com Coomassie Blue, sendo **1** representativo do **Gel 1** e **2** representativo do **Gel 2**; **A2 e B2** – representativo de uma amostra controle do gel corado com Coomassie Blue; **A3 e B3** – representativo de uma amostra tratada com 17β -Estradiol corado com Coomassie Blue.

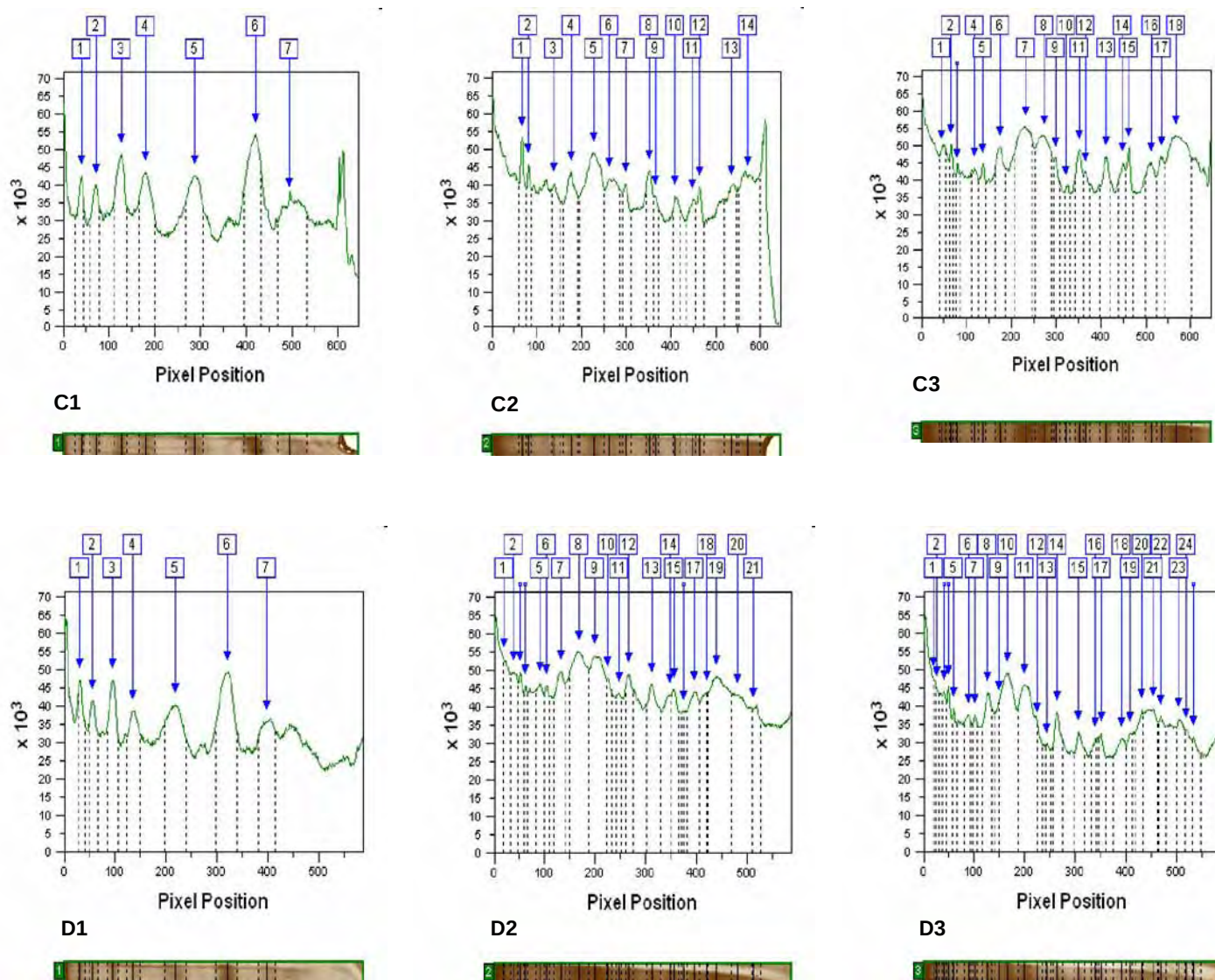


Figura 6. Análise computacional dos géis de eletroforese unidimensional identificando cada pico como uma proteína (em peso molecular) e a espessura do pico como a quantidade de proteína (porcentagem de banda), **C1 e D1** – representativo do padrão de peso molecular do gel corado com Nitrato de Prata, sendo **1** representativo do **Gel 1** e **2** representativo do **Gel 2**; **C2 e D2** – representativo de uma amostra controle do gel corado com Nitrato de Prata; **C3 e D3** – representativo de uma amostra tratada com 17 β -Estradiol corado com Nitrato de Prata

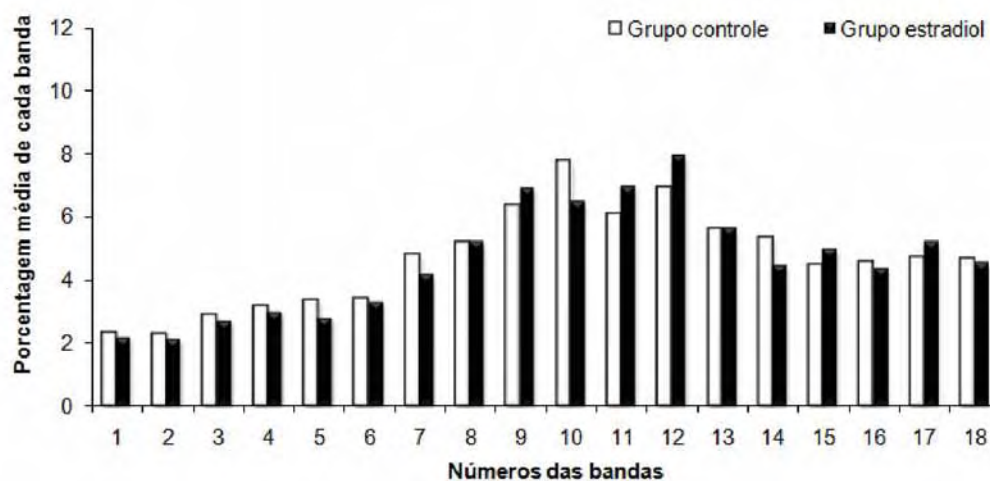
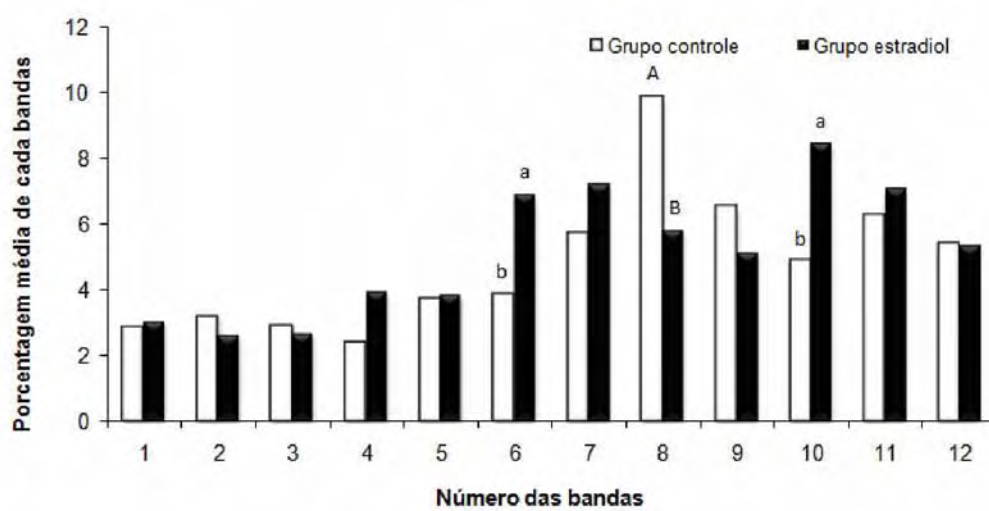


Figura 7. Representação das 18 bandas individuais identificadas no gel corado com Coomassie Blue, comparando a média das porcentagens (%) de cada banda em amostras de proteínas extraídas de explantes endometriais obtidos de novilhas mestiças não tratadas (n=6; Grupo Controle) e tratadas com 17β -estradiol (n=6; Grupo E_2) no 17º dia do ciclo estral



^{a, b} Barras seguidas por letras minúsculas diferentes, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste *t* de Student ($p \leq 0,05$)

^{A, B} Barras seguidas por letras maiúsculas diferentes, diferem entre si a 1% de probabilidade pelo teste *t* de Student ($p \leq 0,01$)

Figura 8. Representação das 12 bandas individuais identificadas no gel corado com Nitrato de Prata, comparando a média das porcentagens (%) de cada banda em amostras de proteínas extraídas de explantes endometriais obtidos de novilhas mestiças não tratadas ($n=6$; Grupo Controle) e tratadas com 17β -estradiol ($n=6$; Grupo E_2) no 17º dia do ciclo estral. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste *t* de Student

TABELAS

Tabela 1. Média e Erro Padrão da média da quantidade de proteína total de extratos obtidos de explantes endometriais obtidos de novilhas mestiças não tratadas (n= 6; Grupo controle) e tratadas com 17β-estradiol (n= 6; Grupo E₂) no 17º dia do ciclo estral

Tratamentos	Quantidade de proteína total (µg/mL)						Média ± erro padrão	p
	1	2	3	4	5	6		
Controle	5.984,89	7.973,33	4.678,88	5.973,33	6.518,22	6.648,89	6.296,10 ± 439,90	0,1158
E ₂	5.954,64	5.428,00	11.227,56	11.351,56	6.230,22	10.368,00	8.426,50± 1.156,00	

Tabela 2. Número de bandas identificadas nas colunas contendo as amostras, pesos moleculares (kDa) e porcentagem relativa de proteínas referente a cada banda presente nas amostras protéicas e estimados das linhas equivalentes para ambos os grupos, referente as proteínas totais extraídas de explantes endometriais obtidos de novilhas mestiças não tratadas (n=6; Grupo Controle) e tratadas com 17 β -estradiol (n=6; Grupo E₂) no 17º dia do ciclo estral, submetidas à eletroforese unidimensional em Gel de Poliacrilamida a 10% SDS-PAGE corados por Coomassie Blue

Número de bandas	Pesos Moleculares das bandas (kDa)	Porcentagem relativa de proteínas referente a cada banda		p
		Grupo Controle (n=6)	Grupo E ₂ (n=6)	
1	157 – 157	2,33	2,18	0,4455
2	153 – 154	2,29	2,09	0,3383
3	150 – 151	2,90	2,68	0,4636
4	145 – 147	3,17	2,95	0,4180
5	140 – 142	3,33	2,78	0,1434
6	134 – 136	3,40	3,28	0,8148
7	128 – 130	4,81	4,16	0,4623
8	121 – 123	5,19	5,27	0,9432
9	113 – 115	6,36	6,9	0,7053
10	102 – 107	7,74	6,47	0,3965
11	93 – 98	6,09	6,94	0,5241
12	83 – 88	6,91	7,9	0,5169
13	73 – 79	5,62	5,62	0,9984
14	64 – 69	5,34	4,47	0,2487
15	53 – 59	4,49	4,95	0,3998
16	43 – 48	4,57	4,34	0,6676
17	33 – 37	4,70	5,20	0,2998
18	22 – 25	4,69	4,53	0,7836

Tabela 3. Número de bandas identificadas nas colunas contendo as amostras, pesos moleculares (kDa) e porcentagem relativa de proteínas referente a cada banda presente nas amostras protéicas e estimados das linhas equivalentes para ambos os grupos, referente as proteínas totais extraídas de explantes endometriais obtidos de novilhas mestiças não tratadas (n=6; Grupo Controle) e tratadas com 17 β -estradiol (n=6; Grupo E₂) no 17º dia do ciclo estral, submetidas à eletroforese unidimensional em Gel de Poliacrilamida a 10% SDS-PAGE corados por Nitrato de Prata

Número de bandas	Pesos Moleculares das bandas (kDa)	Porcentagem relativa de proteínas referente a cada banda		p
		Grupo Controle (n=6)	Grupo E ₂ (n=6)	
1	184 – 185	2,84	3,02	0,7543
2	164 – 167	3,17	2,59	0,2088
3	150 – 152	2,90	2,61	0,5550
4	130 – 134	2,37	2,93	0,1827
5	121	3,69	3,81	0,9189
6	108 – 110	3,84^b	6,85^a	0,0426
7	98 – 99	5,70	7,18	0,3099
8	90	9,83^A	5,78^B	0,0107
9	82	6,51	5,09	0,3088
10	75 – 76	4,89^b	8,40^a	0,0183
11	69 – 70	6,25	7,03	0,7719
12	63 - 65	5,39	5,31	0,9415

^{a, b} Barras seguidas por letras minúsculas diferentes, diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste *t* de Student ($p \leq 0,05$)

^{A, B} Barras seguidas por letras maiúsculas diferentes, diferem entre si a 1% de probabilidade pelo teste *t* de Student ($p \leq 0,01$)